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

Efecto de la sobreexpresión de distintas isoformas de la Proteína Quinasa C (PKC) en la modulación del fenotipo maligno de células mamarias epiteliales. Alteración en la sensibilidad al tratamiento con retinoides

Díaz Bessone, María Inés

2016-03-28

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:
Díaz Bessone, María Inés. (2016-03-28). Efecto de la sobreexpresión de distintas isoformas de la Proteína Quinasa C (PKC) en la modulación del fenotipo maligno de células mamarias epiteliales. Alteración en la sensibilidad al tratamiento con retinoides. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Díaz Bessone, María Inés. "Efecto de la sobreexpresión de distintas isoformas de la Proteína Quinasa C (PKC) en la modulación del fenotipo maligno de células mamarias epiteliales. Alteración en la sensibilidad al tratamiento con retinoides". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-28.

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

"Efecto de la sobreexpresión de distintas isoformas de la Proteína Quinasa C (PKC) en la modulación del fenotipo maligno de células mamarias epiteliales. Alteración en la sensibilidad al tratamiento con retinoides"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el Área de Ciencias Biológicas

Autora: Lic. María Inés Díaz Bessone

Director: Dr. Alejandro Urtreger

Directora asistente: Dra. Laura Todaro

Consejero de estudios: Dr. Omar Coso

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

Buenos Aires 2016

Fecha de defensa: 28 de Marzo de 2016

RESUMEN 3
ABSTRACT 4
ABREVIATURAS 5
AGRADECIMIENTOS 6
INTRODUCCIÓN 9
Biología del cáncer 9
Neoplasia 9
La cascada metastásica 11
Cáncer de mama 15
Desarrollo de la glándula mamaria 15
Biología del cáncer de mama 17
Clasificación 19
Proteína Quinasa C (PKC) 21
Isoenzimas de la PKC 21
Activación de las PKC 23
PKC y Cáncer 25
El sistema retinoide 28
Mecanismo de acción de los RA 28
El Sistema Retinoide y Cáncer 30
El Sistema Retinoideo y PKC 32
HIPÓTESIS 34
OBJETIVOS ESPECIFICOS 34
MATERIALES Y MÉTODOS 37
RESULTADOS 44
Capítulo I: 45
Interacción entre el sistema retinoide y la vía de la PKC en un modelo mamario murino.. 45
Desarrollo del modelo celular murino 46
Proliferación celular 47
Migración celular 50
Actividad proteolítica secretada 51
Invasión celular 53
Ensayos *in vivo* 55

Capitulo II: 61
Interacción entre el sistema retinoide y la vía de las PKC en un modelo celular humano 61
Desarrollo de modelos celulares humanos 62
Modelo celular humano respondedor a la terapia retinoidea 63
Proliferación celular 63
Análisis del ciclo celular 66
Análisis de la localización de PKCα por microscopía confocal 67
Migración celular 71
Actividad proteolítica secretada e invasión: 72
Modelo celular humano no respondedor a la terapia retinoidea 73
Proliferación celular 73
Migración celular 75
Actividad proteolítica secretada 77
Invasión celular 78
Crecimiento 3D en Matrigel 79
Capitulo III: 82
Regulación transcripcional del ácido retinoico en células de mama humanas 82
Actividad de los sitios RARE 83
Actividad de los sitios AP-1 85
Regulación de la transcripción de los receptores retinoides 86
DISCUSIÓN 91
BIBLIOGRAFÍA 103

Efecto de la sobreexpresión de distintas isoformas de la Proteína Quinasa C (PKC) en la modulación del fenotipo maligno de células mamarias epiteliales. Alteración en la sensibilidad al tratamiento con retinoides

RESUMEN

El cáncer de mama representa actualmente el tipo de cáncer más frecuente en mujeres y se calcula que más de un millón de nuevos casos son diagnosticados por año en todo el mundo. Se trata de una enfermedad compleja, que presenta una variedad de subgrupos con características histopatológicas y genéticas diferentes y por lo tanto con diversas respuestas a los tratamientos.

De las múltiples vías de señalización comprometidas en la progresión maligna, algunas constituyen prometedores blancos de intervención terapéutica, entre ellas la vía de la proteína quinasa C (PKC), implicada en eventos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis y el sistema retinoideo ampliamente involucrado en diferenciación celular.

Dado que los distintos carcinomas mamarios presentan una expresión diferencial de las isoformas de PKC, desarrollamos modelos celulares mamarios (humanos y murinos) que sobreexpresan las isoformas α o δ de PKC. Utilizando estos modelos estudiamos de qué manera la sobreexpresión de PKCα o PKCδ afecta parámetros celulares implicados en la progresión tumoral y diseminación metastásica evaluando al mismo tiempo la respuesta al tratamiento con retinoides (ATRA).

Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de PKCα torna a las células más sensibles a la acción del ácido retinoico, en líneas respondedoras, mediante un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular. La sobreexpresión de PKCδ, en las células MDA-MB231, confirió un fenotipo menos agresivo, disminuyendo significativamente su capacidad invasiva. Por último la falta de respuesta de esta línea celular al ATRA, se debería a la incapacidad de trans-reprimir los sitios AP-1.

Palabras clave: Cáncer de mama, Proteina quinsasa C, Ácido retinóico.

Effect of overexpression of different isoforms of Protein Kinase C (PKC) in modulation of malignant phenotype of mammary epithelial cells. Alteration in sensitivity to treatment with retinoids

ABSTRACT

Breast cancer represents the most common kind of cancer in women and it is estimated that more than one million new cases are diagnosed each year worldwide. It is a complex disease, which presents a variety of subgroups with different genetic and histopathologic features and therefore with different responses to treatments.

Multiple signaling pathways are involved in malignant progression. Some of them are promising targets for therapeutic intervention, including protein kinase C (PKC), involved in cellular events such as proliferation, differentiation and apoptosis and the retinoid system, widely implicated in cell differentiation.

Since different mammary malignancies exhibit differential expression of PKC isoforms, we have developed (human and murine) mammary cell models overexpressing α or δ PKC isoforms. Using these models we studied how PKCα or PKCδ alters cell parameters associated with tumor progression and metastatic dissemination while we assessed the response to treatment with retinoids (ATRA).

Our results suggest that PKCα overexpression confers to the cells a retinoic acid-sensitive phenotype, through an arrest in the G0 / G1 phase of the cell cycle. Overexpression of PKCδ, in MDA-MB231 cells, induced a less aggressive phenotype, significantly reducing its invasive capability. Finally the lack of response of this cell line to ATRA treatment could be due to the inability to trans-repress AP-1 sites.

Keywords: Breast cancer, Protein kinase C, Retinoic acid.

ABREVIATURAS

ME: Matriz extracelular (ME)

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

uPA: Plasminógeno de tipo uroquinasa

MC: Medio condicionado

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

RE: Receptor de estrógenos

RPG: Receptor de progesterona

HER2: Receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

RA: Ácido retinoico

RBP4: Proteína sérica de unión a retinol

CRBP: Proteína celular de unión a retino

CRABP: Proteína celular de unión a ácido retinoico

ATRA: Forma trans del ácido retinoico

RARs: Receptores retinoicos

RXRs: Receptores rexinoideos

RARE: Elemento de respuesta al ácido retinoico

PML: Leucemia promielocítica aguda

PKC: Proteína Quinasa C

PMA: Forbol 12-miristato 14-acetato

DAG: Diacil glicerol

PI3K: Fosfatidilinositol quinasas tipo III (PI3K)

SDS: Dodecil sulfato de sodio

PBS: Buffer fosfato salino

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

3D: Tridimensional

IP: Ioduro de Propidio

AGRADECIMIENTOS

Es muy difícil para mí resumir en pocas palabras los años de esfuerzo, compromiso y apoyo de toda la gente que me rodea y no quiero dejar de agradecerles por su invaluable ayuda.

En primer lugar quiero agradecer a Alejandro, por su dirección en mis primeros pasos en la ciencia. Por darme lugar, aceptar mis ideas, y permitir mis (muchos) errores. Trabajar con la libertad con la que se lo hace en este grupo es una virtud que aprendí a valorar con el tiempo, hoy lo agradezco infinitamente. A mi directora asistente, Laura. Por sus aportes, por valorar mi trabajo y siempre encontrar la forma positiva de ver las cosas. De ustedes dos me llevo mucho más que conocimientos, sin dudas la profesional que llegue a ser algún día va a llevar parte de los dos.

A todos los jefes del Área de investigación del Instituto Roffo, Lydia, Stella, Giselle, Marina, Martín, Ana, Lucas, Gabriel, Eduardo, Andrea y Miriam. Por su colaboración en el día a día y por su esfuerzo en lograr que el área sea cada día mejor.

A Elisa en especial, por transmitirnos su pasión por la ciencia, por estar siempre al tanto del trabajo de todos y ser siempre fuente de consejos invaluables.

A todos los que forman parte de UTG, en especial a Marce, Chiari y Lucre que siempre nos reciben con una sonrisa.

A toda la gente de bioterio, el esfuerzo y dedicación que le ponen a su trabajo se refleja en el nuestro.

A Alicia, Mirta, Sil, Darío, Gabi y Leo, por hacer nuestro trabajo infinitamente más fácil.

A Yani, Barbi y Den, por compartir conmigo todos estos años con el cariño y la buena onda con que siempre me reciben.

A mis amigos del Roffo! Sin dudas su amistad fue lo mejor del doctorado. A Dami, con quien empezamos juntos este camino, desde el primer día cuando no entendíamos nada. Sin dudas no podría haber tenido un mejor compañero, me llevo un gran amigo.

Tefo, quien aunque parezca que no te escucha estuvo siempre presente como pocos.

Ro la tremenda científica no le alcanza ni por lejos a lo buena amiga, compañera, consejera que sos, toda mi admiración para vos.
Carito, este último tiempo se te extrañó horrores. Una gran amiga, me divertí mucho con vos.
Roco, compartimos tanto, gracias por tu amistad. Sos una persona hermosa que va a triunfar en lo que se proponga, porque con la pasión que le pones a todo no se puede fallar.
Lili, nadie tiene tanto amor por la ciencia. De vos aprendí muchísimo, pero sobre todo gracias tu amistad, por compartir todos estos años conmigo.
Solcito, la más buena de todas, siempre con una sonrisa. Me encantó ser tu compañera.
Jopi, sos un referente sin dudarlo como científica y aún más como amiga. Incluso desde Brasil nos seguís ayudando gracias por estar siempre presente.
Cris, lo que me divierto con vos no tiene nombre. Fuimos el mejor grupo lejos!
Marian, genia total siempre encontras tiempo para estar en todo. Vos y Lili, las mamás del grupo, son el ejemplo de que con ganas se puede.
Helena, qué decirte?! Sos una amiga genial, con tu locura haces todo más divertido. Nuestras charlas no las cambio por nada, te voy a extrañar muchísimo.
Ampi, Gabita y Ada, a pesar que hace bastante no están en el Roffo no dejamos de extrañarlas, siempre están presentes en todo lo que hacemos. Agus, Gise y Jorge, con quienes compartí menos tiempo pero sin dudas agradezco haber conocido.
Les quiero agradecer también a mis amigas de la vida, Florcha, Gonza y Peta. Son mis hermanas y nada sería lo mismo sin ustedes.
A mi familia, a papá que no sabe muy bien de qué trabajo, pero siempre me apoya en todo lo que hago. A Aldo, por tu compañía, asados y cariño. A mi hermano, por ser siempre incondicional. A mamá en especial por estar en todo lo que necesito, por ser la mamá que toda hija querría tener. A ella y mi abuela por ser mis ejemplos de mujer independiente.
Por último a Luis, gracias por contenerme, apoyarme y quererme. Esta tesis no hubiera sido posible sin vos, nada hubiera sido posible.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Biología del cáncer

Neoplasia

El cáncer se origina como consecuencia de anormalidades a nivel genético que pueden ser causadas por agentes físicos, químicos, infecciones virales y/o acumulación de mutaciones producto de errores en la replicación del ADN o bien heredadas[1]. Estas alteraciones pueden afectar genes involucrados tanto en la regulación del ciclo celular como en la angiogénesis y la invasión de tejido circundante. Alterando así los controles de proliferación celular, diferenciación y apoptosis, lo que produce un crecimiento descontrolado y la adquisición de un fenotipo invasivo. La alta tasa de duplicación celular, carente de control, lleva a la formación de una masa celular conocida como neoplasia.

En el caso de que estas células permanezcan agrupadas en una masa única y de contornos definidos, se dice que el tumor es benigno. En estas condiciones se puede conseguir la curación completa del paciente extrayendo la masa quirúrgicamente. En cambio, un tumor se considera maligno si sus células tienen la capacidad de invadir los tejidos circundantes.

Los tumores se clasifican de acuerdo con el tipo celular a partir del cual se originan, por ejemplo los que derivan de células epiteliales se denominan carcinomas mientras los que derivan de tejido conjuntivo o de fibras musculares, sarcomas. Existe también una denominación para tumores benignos y tumores malignos, por ejemplo, un adenoma es un tumor epitelial benigno con una organización de tipo glandular, siendo el tumor maligno correspondiente un adenocarcinoma. Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos son carcinomas probablemente porque los tejidos epiteliales están más frecuentemente expuestos a las diversas formas de lesión física y química que favorecen el desarrollo tumoral [2].

Un tumor es más que un conglomerado de células tumorales proliferando, más específicamente, es un tejido complejo compuesto por múltiples tipos celulares que

interaccionan entre sí. Las células aparentemente normales presentes en el tumor, como fibroblastos y adipocitos, células de la inmunidad adaptativa e innata, y células de la vasculatura linfática y sanguínea, así como células mesenquimáticas especializadas, propias de cada microambiente tisular, son por lo tanto participantes activos de la progresión tumoral. En este contexto, el desarrollo del cáncer depende en gran parte de la habilidad de las células malignas de secuestrar y explotar los procesos fisiológicos normales del huésped [3].

Tanto los tumores benignos como los malignos, tienen entonces dos componentes básicos: las células tumorales en proliferación que constituyen su *parénquima*, y el tejido conectivo que las rodea y constituye el *estroma* [4]. El crecimiento y la evolución de las neoplasias dependen en gran medida de su relación con el estroma. Dicha interacción (*crosstalk),* que ocurre a través de señales moleculares como factores de crecimiento, factores angiogénicos, citoquinas, etc. [5-7] y son esenciales para la iniciación, progresión y diseminación metastásica del tumor.

La cascada metastásica

La metástasis representa el principal limitante en cuanto a la expectativa de vida de los pacientes con tumores malignos, ya que una vez que el cáncer se ha diseminado resulta muy difícil erradicarlo completamente mediante cirugía y/o radio o quimioterapia.

La metástasis es un proceso complejo de etapas múltiples, secuenciales, selectivas e interdependientes en las que interactúan tanto factores de la célula tumoral como factores del huésped [8]. Este proceso puede dividirse en cinco pasos principales (Fig.1):

1. Invasión local
2. Intravasación
3. Diseminación
4. Extravasación
5. Establecimiento en un órgano distante

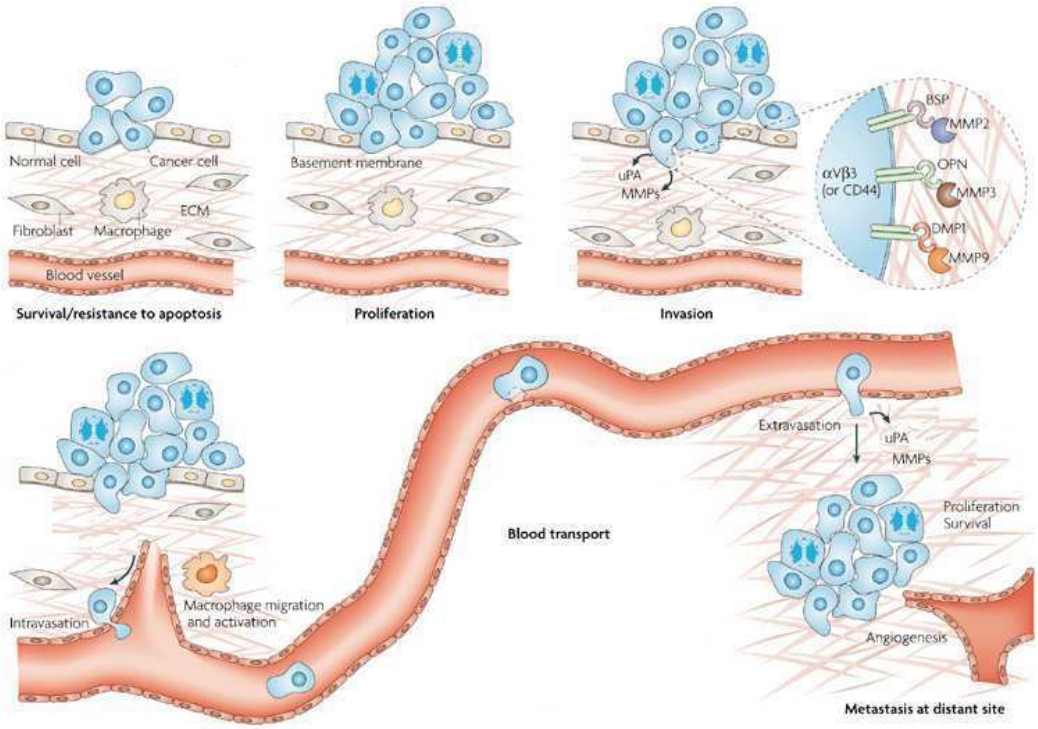


Figura 1: La cascada metastásica[9]: Las células cancerosas pueden desprenderse del tumor primario y degradar la membrana basal para invadir el estroma. La proteólisis de la matriz extracelular es mediada, entre otras proteasas, por MMPs. De esta forma la célula tumoral puede escapar por el sistema linfático o entrar en el torrente sanguíneo y en un sitio distante extravasarse, lo que involucra nuevamente la acción de proteasas. Luego de la formación de una colonia secundaria, señales de proliferación, supervivencia y angiogénesis median el establecimiento del tumor secundario.

El paso inicial, la invasión local, involucra varios procesos moleculares como la pérdida de la adhesión célula-célula y célula-matriz. Estos fenómenos generalmente están acompañados por la desregulación de moléculas de adhesión y destrucción de los componentes de la matriz extracelular (MEC) circundante, mediada por enzimas proteolíticas.

En el sitio de contacto con un tumor invasivo, la MEC es digerida por proteasas. Existen cinco clases de proteasas, que se categorizan según su mecanismo catalítico: aspartato, cisteína, metalo, serina y treonina (Tabla 1). Las células tumorales son capaces de:

i) estimular a las células vecinas para que produzcan proteasas, incluyendo las metalo-proteasas de matriz (MMPs) que son enzimas dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+} que degradan distintos tipos de colágeno incluidos en la MEC. Las mismas son secretadas en una forma latente y activadas una vez en el exterior de las células [10].

ii) inducir la producción y/ o activación de sustratos de proteasas, como las formas latentes de TGFβ, que pueden ser activadas extracelularmente por MMP-2 y MMP-9 [11].

iii) producir y secretar sus propias proteasas, o bien iv) producir factores que pueden inhibir o activar proteasas presentes localmente.

Las proteasas no sólo son esenciales para la degradación de las proteínas extracelulares y la remodelación celular fisiológica, sino que también poseen roles importantes para la señalización celular, como el clivaje de los prodominios y subsecuente activación de factores de crecimiento y citoquinas [12]. Asimismo, existen inhibidores endógenos que regulan la actividad de las proteasas como las cistatinas, serpinas y los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs), que inhiben a las cisteíno proteasas, serino proteasas y MMPs, respectivamente.

Tipo de Proteasa	Enzima	Sustratos
Serinoproteasas	uPA	Activa al plasminógeno de las matrices extracelulares a plasmina. Degrada algunas proteínas de la matriz, como la fibronectina. Degrada Laminina, fibronectina y colágeno IV. Activa a las metaloproteasas
	tPA	
	Plasmina	
Metaloproteasas (dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+})	MMP-1	El espectro de acción degradativa es bastante variado. Degradan todo tipo de colágeno incluyendo colágeno intersticial y de las membranas basales y colágeno desnaturalizado, también pueden degradar proteoglicanos y glicoproteínas
	MMP-2 y MMP-9	
	Estromelisinas	
	Matrilisinas	
Cisteinoproteasas	Catepsina B	Amplio espectro. Activa al uPA y a las metaloproteasas.
Aspartilproteasas	Catepsina D	Degrada amplia variedad de proteínas endocitadas (degradación lisosomal). También puede encontrarse en la periferia celular.

Tabla 1: Proteasas involucradas en la invasión tumoral.

Como consecuencia de la invasión, el límite de la masa tumoral se vuelve poco preciso, por lo que suele faltar un plano de clivaje bien definido con el tejido normal. El examen histológico casi siempre revela regiones que atraviesan el borde e infiltran las estructuras contiguas.

El segundo paso, la intravasación, refleja la capacidad de las células tumorales para invadir vasos sanguíneos y linfáticos. Esto nuevamente se caracteriza por la destrucción de los componentes de la membrana basal de los vasos, como colágeno IV y laminina.

La capacidad de entrar a los vasos sanguíneos o linfáticos es un prerrequisito para el tercer paso de las metástasis, que es la diseminación sistémica. Sin embargo la presencia de células tumorales en sangre no es del todo indicativa de la aparición de focos metastáticos ya que la mayor parte de las células que entran en la circulación son

rápidamente eliminadas [13]. Existen evidencias que indican que incluso en etapas tempranas de la progresión de tumores sólidos, se pueden encontrar células malignas en los ganglios linfáticos [14].

Luego de la diseminación sistémica se encuentra el cuarto paso de la cascada metastásica, que es la extravasación de las células tumorales en el órgano blanco, lo que involucra la transmigración a través del endotelio vascular sumado a la destrucción de la membrana basal.

El quinto y último paso, el establecimiento de la metástasis en un sitio distante, requiere de la capacidad de las células tumorales de dividirse, proliferar y estimular la generación de vasos sanguíneos para proveer al tumor de nutrientes y oxígeno. Las células tumorales sin circulación sanguínea crecen hasta 1-2 mm^3 y luego detienen su proliferación. Sólo crecen más allá de los 2 mm^3 cuando son capaces de generar nuevos vasos sanguíneos, ya que en ausencia de soporte vascular los tumores se vuelven necróticos o incluso apoptóticos[15] de ahí que la angiogénesis sea un factor tan importante en la progresión del cáncer.

Se considera que la metástasis no es un proceso aleatorio. Paget en 1889, propuso la teoría que se conoce como “seed and soil” (suelo-semilla), por la cual ciertas células tumorales (semillas), tienen una afinidad especial por ciertos órganos o tejidos específicos (suelo). Si bien existen factores anatómicos relacionados con la estructura del sistema vascular que influyen en la diseminación metastásica, numerosos tipos de cáncer establecen patrones particulares de colonización que no pueden ser explicados por factores meramente mecánicos [16].

Por lo tanto una exitosa interacción entre moléculas de adhesión, migración, proteólisis e invasión, angiogénesis, crecimiento tumoral y proliferación son necesarios para el establecimiento de la metástasis [17]. Cabe aclarar que el pasaje de una etapa a otra de la cascada metastásica es ininterrumpido y muchas pueden ocurrir simultáneamente.

Cáncer de mama

Desarrollo de la glándula mamaria

La glándula mamaria es un complejo órgano secretorio que consta de distintos tipos celulares: células epiteliales, que forman la red de conductos de la glándula; adipocitos, que componen una almohadilla de grasa donde los conductos están inmersos; células endoteliales vasculares que conforman los vasos sanguíneos y células estromales, como fibroblastos. Hay dos tipos principales de epitelio en la glándula mamaria: luminal y basal. El luminal forma los conductos y los lóbulos, mientras que el basal está compuesto esencialmente por células mioepiteliales, cuyo origen es estrictamente epitelial pero tienen la capacidad de contraerse, lo cual produce la expulsión de la leche (Fig.2).

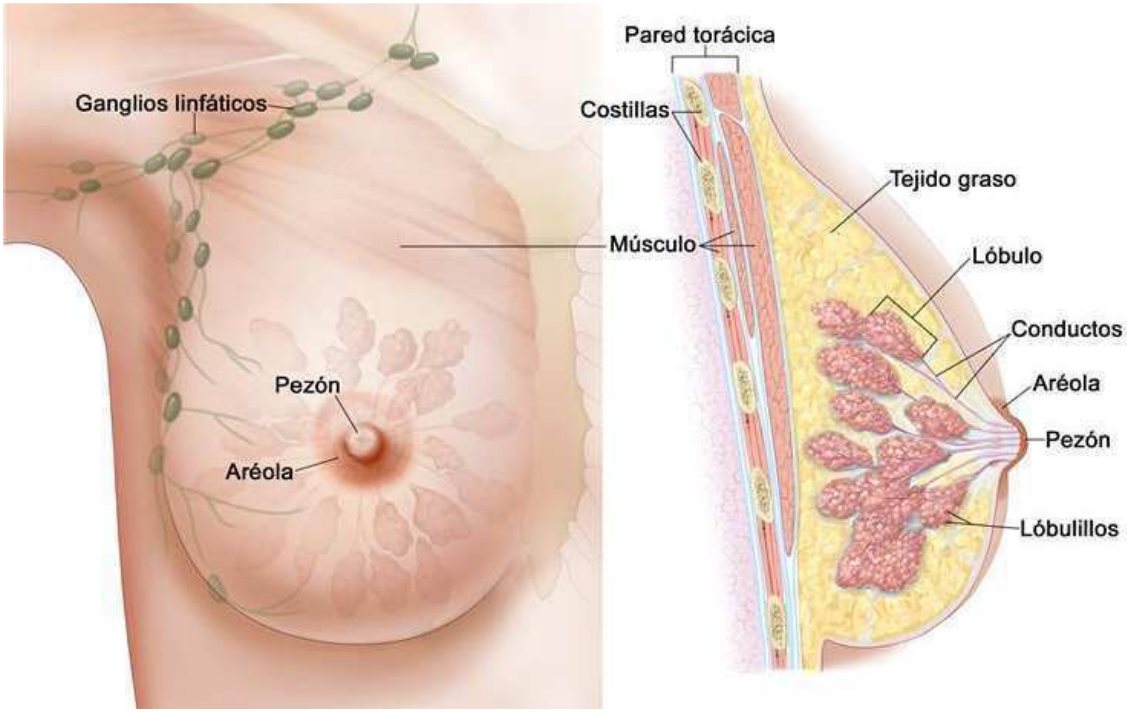


Figura 2: Vista lateral de la glándula mamaria [18]. Cada mama tiene de 15 a 20 secciones llamadas lóbulos. Cada lóbulo posee muchos lobulillos más pequeños, los cuales terminan en docenas de bulbos diminutos que pueden producir leche. Los lóbulos, lobulillos y bulbos están conectados por tubos delgados llamados conductos, que desembocan en el pezón. La grasa llena los espacios entre los lobulillos y los conductos.

La mama es un órgano que, en la mujer, sufre cambios drásticos en tamaño, forma y función. Dichos cambios se encuentran asociados al crecimiento durante la infancia, la

pubertad, el embrazo, la lactancia y la regresión que se produce al finalizar dicha etapa y durante la postmenopausia [19]. Se pueden distinguir dos fases diferentes en las modificaciones que sufre el tejido mamario, por un lado la fase de desarrollo y por otro la fase de diferenciación, las cuales tienen lugar casi simultáneamente y de manera coordinada [19]. El proceso inicial en el crecimiento ocurre con la formación de los lóbulos durante la pubertad, pero el desarrollo y la diferenciación completa de la mama, finaliza al término del embarazo [19].

El aumento del tejido glandular se debe al crecimiento y la división de los pequeños brotes terminales de los ductos primarios y secundarios. Estos crecen, dividiéndose de manera dicotómica y simpodial. Los brotes terminales luego dan origen a nuevas ramas y brotes alveolares [19, 20].

Las hormonas ováricas ejercen un rol fundamental en la regulación del desarrollo de la glándula mamaria normal. Existe un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular del epitelio mamario, a lo largo de los ciclos menstruales. Podemos decir entonces, que la glándula mamaria es un órgano dinámico, el cual sufre constantes remodelaciones controladas por hormonas y factores de crecimiento. Esto hace que las células que componen el tejido mamario sean susceptibles a mutaciones, que al acumularse llevan a adquirir algunas de las características de las células transformadas. Eventualmente, esto podría dar lugar a la carcinogénesis, produciéndose lesiones durante los diferentes ciclos de desarrollo e involución, que tienen su origen en el epitelio, en el estroma y otros tipos celulares presentes en el tejido mamario [21].

Biología del cáncer de mama

El cáncer de mama representa actualmente el tipo de cáncer más frecuente en mujeres. Se calcula que más de un millón de nuevos caso son diagnosticados por año en todo el mundo [22]. A pesar de que la detección temprana incrementa las posibilidades de cura, en la mayoría de los casos, las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad aparecen en un estadío avanzado. Por esta razón, resulta fundamental profundizar el estudio de esta patología así como desarrollar nuevos blancos terapéuticos.

Si bien existen excepciones, los tumores de mama se suelen desarrollar a partir de células epiteliales. En sus etapas iniciales, dichas células, se encuentran confinadas a los ductos. La progresión hacia la invasividad ocurre por una combinación de señales emitidas por el epitelio tumoral y los diferentes tipos celulares que componen el estroma circundante [23, 24].

Una hiperplasia atípica es una lesión premaligna que se caracteriza por presentar un número anormal de capas celulares tanto en los ductos como en los lóbulos. DCIS (Ductal Carcinoma In Situ) surgen a partir de la proliferación de células epiteliales confinadas a los conductos mamarios, mientras que LCIS (Lobular Carcinoma In Situ) lo hacen a partir de la hiperplasia de células epiteliales confinadas a los lóbulos (Fig.3). Ambas hiperplasias son lesiones precursoras a un carcinoma ductal *in situ*, el cual implica una lesión no invasiva (delimitada por la lámina basal) que contiene células anormales [25]. En algunos casos, dicha lesión puede progresar a un cáncer de mama invasivo, adquiriendo la capacidad de invadir el tejido adyacente. La metástasis se produce finalmente cuando las células tumorales se establecen en otro tejido. La vasculatura linfática es de los primeros sitios donde se realiza la diseminación de las células malignas, para luego pasar al desarrollo de la metástasis.

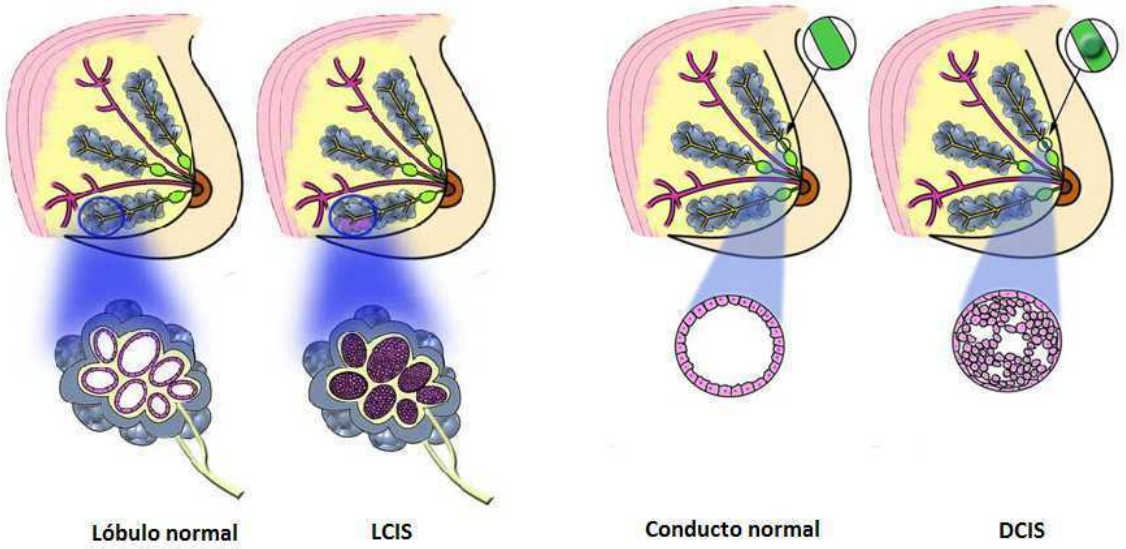


Figura 3: Cáncer no invasivo. Las células tumorales no se han diseminado fuera de los límites de las estructuras normales de la mama, sin invasión de los tejidos circundantes. Cuando las estructuras afectadas son los lóbulos se trata de LCIS, en el caso de los conductos, DCIS.

Se conocen múltiples subtipos de tumores, cada uno con sus patrones de expresión génica particular, los cuales están asociados a su progresión clínica. Una característica común a todos los tipos de tumor, es la variabilidad que existe entre las células que lo conforman [26]. Dicha heterogeneidad intratumoral explica en parte la resistencia a los diferentes tratamientos, o por qué en algunos casos el tratamiento resulta efectivo al comienzo y luego se observa resistencia.

Existen dos hipótesis las cuales tratan de explicar la alta diversidad dentro de un mismo tumor. Por un lado se encuentra la hipótesis de las células madres tumorales [23, 26-28] y por otro, el modelo de evolución clonal [26, 29]. Estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes, ya que ambos modelos proponen que el tumor se origina a partir de una sola célula que adquiere múltiples mutaciones y que ésta posee un potencial proliferativo ilimitado. Las diferencias entre las dos hipótesis radican en la célula blanco en la cual se dan los eventos de transformación. En el modelo de células madre tumorales, una célula madre normal se transforma en una célula madre tumoral, ésta se divide de manera asimétrica dando origen a células más diferenciadas y a otras células madre tumorales. En el modelo de expansión clonal, todo el proceso comenzaría a partir de una célula normal inespecífica. Ambas hipótesis también explican diferencialmente qué tipo de subpoblación

celular dará origen al tumor. En la primera de ellas, un grupo de células madres tumorales y en la segunda, cualquier célula tumoral que presente una ventaja adaptativa. Por último, otro punto donde divergen las dos hipótesis es en la resistencia a tratamientos, ya que una explica que la célula madre tumoral es intrínsecamente resistente a drogas, mientras la otra hipótesis propone que es la terapia la que realiza una selección de clones resistentes.

Clasificación

El cáncer de mama se clasifica en base al estadio clínico, la morfología celular y la presencia de receptores hormonales (receptor de estrógeno alfa, receptor de progesterona) y el receptor HER-2/neu [30, 31].

Dado que eran necesarios factores pronósticos más precisos que ayuden en las decisiones terapéuticas, a partir de los estudios de *microarrays* de cDNA se ha desarrollado la clasificación molecular de la enfermedad y se ha determinado que existen varios subtipos de cáncer de mama con diferentes patrones de expresión génica y pronóstico. Previo a la clasificación molecular, el cáncer de mama se dividía en dos grupos principales basados en la presencia o ausencia de expresión del receptor de estrógenos (RE).

El perfil de expresión genética reveló que entre los tumores RE+ existen dos subtipos: luminal A (ER+ y/o PR+, HER-2- o sin sobreexpresión) y luminal B (ER+ y/o PR+, HER-2 sobreexpresado). Estos carcinomas luminales poseen expresión moderada a alta del REα y de citoqueratinas luminales, siendo el luminal A el de mejor pronóstico clínico [23].

Por otro lado, los tumores RE- comprenden también dos subtipos: HER-2 (tumores enriquecidos en HER-2) y tipo basal (ER-, PR-, HER-2- y citokeratina5/6 + y/o HER-1 +). Estos subtipos representan un 15-25% de los carcinomas invasivos de mama, además muestran períodos libres de enfermedad cortos luego de su tratamiento y un pronóstico más sombrío [32].

Actualmente, los tumores ER + /PR + /HER-2- con baja expresión de Ki67 son clasificados dentro del subtipo luminal A, mientras aquellos tumores que presentan el mismo patrón

de expresión de receptores hormonales pero alta expresión de Ki67 son clasificados dentro del subtipo luminal B, junto con los tumores ER+ /PR+ /HER-2+ [33].

En los últimos años y gracias a la evolución de los estudios genómicos, han surgido modificaciones en la clasificación del cáncer de mama, como la identificación de un nuevo subgrupo: *Claudin-low*. Dicho subgrupo, fue identificado en tumores humanos y murinos, y también en líneas celulares de cáncer de mama humano [34]. El subtipo *Claudin-low* recibe su nombre ya que estos tumores presentan baja expresión de genes asociados a las uniones estrechas y uniones célula-célula, incluyendo genes de la familia *Claudin* [34].

Proteína Quinasa C (PKC)

Las enzimas PKC constituyen una familia de serina/treonina quinasas cuya activación lleva a la fosforilación de numerosas proteínas intracelulares que participan en importantes eventos celulares, como proliferación, apoptosis, diferenciación y transformación maligna [35-37].

La PKC fue descubierta en el año 1977 por Nishizuka y col., que identificaron en el cerebro de rata una quinasa activada por el tratamiento con calpaína (una proteasa neutra dependiente de calcio). Observaron que la proteólisis de esta enzima generaba dos dominios funcionales: uno hidrofóbico y otro con una actividad catalítica completa que no aparecía en la proezima. Debido a que la activación de la proenzima dependía de Ca^{2+} y fosfolípidos, recibió el nombre de PKC [38].

Hoy se sabe que la PKC no es una sola enzima, sino una familia compuesta por, al menos, diez isoformas. El campo de investigación de la PKC se ha ampliado enormemente en los últimos años, debido principalmente a la diversidad propia de esta familia de proteínas, cuyas isoformas presentan importantes diferencias estructurales y distribución heterogenea en los tejidos celulares, de forma que pueden activarse mediante distintos mediadores y fosforilar así sustratos específicos en determinadas localizaciones celulares concretas [37, 39].

Isoenzimas de la PKC

La familia PKC está compuesta por al menos 10 isoformas diferentes, cada una de las cuales presenta distintas características y propiedades, que se pueden clasificar en tres grupos (Fig.4).

- PKC clásicas o convencionales (cPKC): está formada por las isoenzimas α, βI, βII y γ. son activadas por Ca^{2+} y diacilglicerol (DAG).
- PKC nuevas (nPKC): comprende a los isotipos δ, ε, η y θ. Son activadas sólo por DAG.
- PKC atípicas (aPKC): Se incluyen en este grupo las isoformas ζ y ι/λ que no son estimuladas ni por Ca^{2+} ni por DAG.

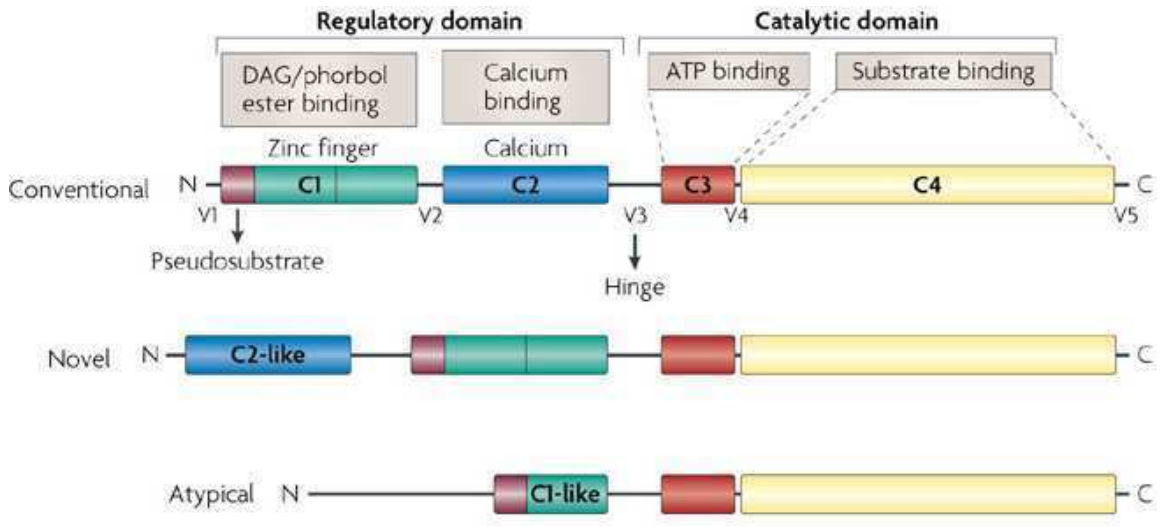


Figura 4: Representación esquemática de la estructura de la familia de las PKC [40]. Cada PKC tiene un dominio catalítico de gran homología entre las subfamilias y un dominio regulatorio que se compone de sitios que median la unión al cofactor y al sustrato.

Todas las isoformas de la PKC son codificadas por genes diferentes, excepto PKCβ1 y β2, que son variantes formadas por splicing alternativo del mismo transcripto primario.

La PKC consiste en una cadena polipeptídica simple de 80 kDa aproximadamente, con un dominio catalítico y un dominio regulatorio separados por una región variable V3 o "bisagra" [41].

El dominio catalítico está altamente conservado entre las distintas isoformas, en cambio la región regulatoria presenta diferencias entre las subfamilias, si bien hay secuencias conservadas dentro de las mismas. En todos los casos estas regiones conservadas determinan dominios proteicos que confieren una localización celular específica o tipo de activación a cada isotipo [42].

Activación de las PKC

En la regulación de la PKC intervienen varios factores que se pueden clasificar en tres grandes niveles: la unión de PKC a diferentes cofactores (lípidos y Ca^{2+}), el estado de fosforilación de la proteína y la localización celular de la misma. Además, cada isoenzima puede tener un mecanismo de activación diferente e incluso presentar múltiples procesos activadores, por lo que el estudio detallado de la regulación de la PKC es muy complejo.

Todas las isoenzimas de PKC a excepción de PKCμ [43], contienen un dominio pseudosustrato autoinhibitorio en la región reguladora de extremo amino terminal. Este dominio mantiene a la PKC en una conformación inactiva por bloqueo estérico de su sitio activo, mediante la interacción con la región catalítica [44]. De esta forma, para la activación de la PKC es necesario que se produzca el desplazamiento del pseudosustrato del sitio activo. Normalmente la activación se produce mediante la unión de determinados efectores lipídicos a los dominios C1 y C2 (ver Fig.4). La PKC es una proteína citosólica pero luego de la activación se asocia a membrana. De hecho la traslocación de la PKC del citoplasma a la membrana plasmática es utilizada experimentalmente como medida de la activación enzimática. La PKC activada se une a una serie de proteínas asociadas a membrana, llamadas Receptores para quinasas C activadas (RACK). Estas proteínas dirigen o reclutan a estas enzimas a las localizaciones subcelulares donde su actividad es requerida [45] (Fig.5).

Por otro lado, la fosfolipasa C, activada por estímulos externos, cliva el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), un componente presente en la capa interna de la bicapa lipídica de la membrana plasmática, generando dos productos: inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG).

Por un lado el IP_3, que es una molécula hidrosoluble, se libera de la membrana y difunde rápidamente en el citosol. Al llegar el retículo endoplasmático produce la liberación de calcio, aumentando rápidamente su concentración en el citosol.

El incremento de calcio y DAG activa a las cPKC y nPKC, siendo las secuencias ricas en cisteínas el sitio de interacción con lípidos y DAG. Las aPKC carecen de estas secuencias

por lo que no responden a DAG. También carecen de la región C2 asociada a la unión del calcio en las cPKC [46] (Fig. 6).

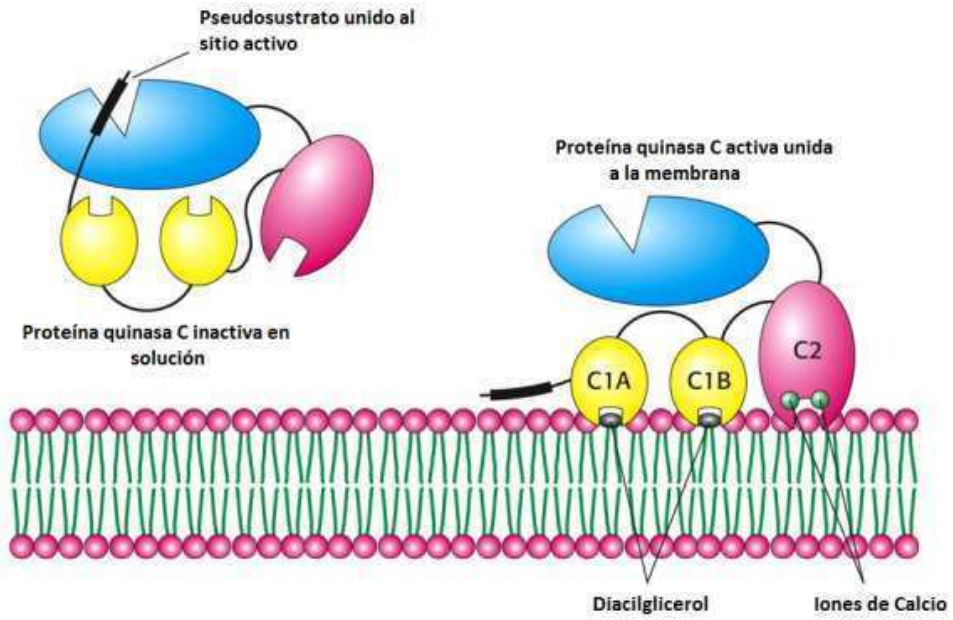


Figura 5: Regulación de las PKC por pseudosustrato: Cuando la PKC se encuentra en forma soluble en el citoplasma, el pseudosustrato se encuentra unido al dominio catalítico. Cuando los Dominios C1 se unen a lípidos de la membrana plasmática, el pseudosustrato se corre liberando la región catalítica.

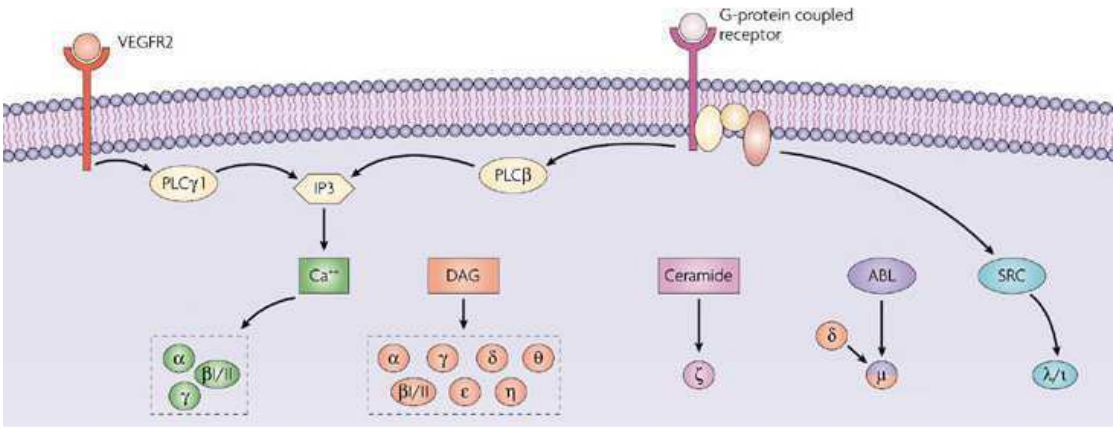


Figura 6: Activación de las diferentes familias de la proteína quinasa C [47]. Las isoformas pertenecientes a la subfamilia de las cPKC pueden ser activadas por calcio y por DAG, mientras que las nPKC son activadas únicamente por DAG. Las PKC atípicas son activadas por otras vías de señalización diferentes y no responden al calcio ni al DAG.

PKC y Cáncer

Las PKCs cobran especial interés en el campo de la investigación en cáncer por dos motivos: Por un lado forman parte de vías de señalización involucradas en diferenciación, sobrevida y apoptosis y en segundo lugar, se descubrió que las mismas eran blanco de los ésteres de forbol, productos naturales con actividad pro-tumorigénica. El éster de forbol más potente, el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), tiene la capacidad de unirse y activar isoformas de PKC. El PMA es un análogo del DAG sin embargo este último se metaboliza rápidamente, mientras que la activación por ésteres de forbol es más prolongada.

Mientras que muchas de estas conexiones entre PKC y cáncer provenían de estudios tempranos en el modelo de carcinogénesis de piel de ratón, en el cual varios agentes se aplican secuencialmente a la piel de ratones y luego son evaluados por su capacidad para formar tumores (Fig.7), ensayos en células normales y tumorales confirmaron la participación de las isoenzimas de PKC en la mitogénesis, supervivencia y transformación maligna [48].

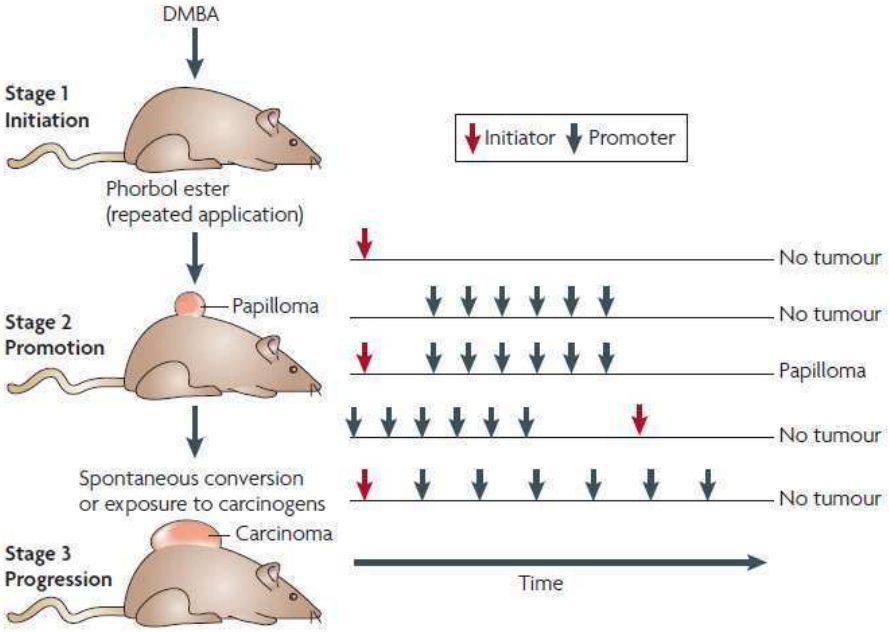


Figura 7: Modelo de carcinogénesis en piel de ratón [48]. Este modelo fue ampliamente utilizado en la definición de las etapas de la carcinogénesis. Varios agentes se aplican secuencialmente a la piel de ratones y luego son evaluados por su capacidad para formar tumores.

Si bien diversos estudios han vinculado la desregulación de las PKCs con la progresión tumoral [49, 50], ha sido un desafío establecer la contribución relativa de cada isoenzima a este proceso, debido a los diferentes roles que tienen las isoformas de PKC y al hecho de que esto varía según el tipo celular [51]. En este sentido es frecuente observar no sólo que una misma isoforma puede tener distintas funciones según el tipo celular en el que se encuentre, sino que incluso pueden tener funciones opuestas en células de un mismo tejido [51]. Un ejemplo de esto lo brinda PKCδ, que fue descripta como inhibitoria del crecimiento celular, y/o promotora de la apoptosis, en numerosos tipos celulares [52-56], mientras que otros estudios plantean que PKCδ puede actuar como un regulador positivo de la proliferación [57-59]. Se ha propuesto que este rol ambiguo de PKCδ, dependería de su estado de fosforilación [60].

Específicamente en cáncer de mama, PKCδ muestra tanto funciones de sobrevida como proapoptóticas. Por un lado PKCδ promueve la supervivencia de las células de cáncer de mama a través de la inhibición o activación de varias vías de señalización, tales como la inhibición de caspasas, inducida por ligando inductor de apoptosis (TRAIL) relacionada con el TNF [61, 62], inhibición de la actividad transcripcional dependiente de Notch1 [63], activación de AKT y el factor nuclear κB (NFkB) [57, 64], sumado a que la expresión de dicha isoforma es significativamente mayor en tumores de mama ER+ que en los ER- y está asociado a una pobre sobrevida [65].

Por otro lado, efectos proapotóticos también han sido reportados en cáncer de mama, por ejemplo en células MCF-7 el aumento de PKCδ está asociado a una disminución en la activación de las vías de ERK1/2 y AKT, así como también a la fosforilación de la proteína retinoblastoma (pRB) [54, 66],

Además de estas funciones duales, PKCδ también tiene un rol crítico en la migración e invasión de células de cáncer de mama. Se ha demostrado que en líneas celulares altamente metastásicas, la expresión de PKCδ aumenta la invasión mediante un aumento en la expresión de MMP-9 [67]. Por el contrario, el grupo de Jackson y col. ha demostrado que PKCδ inhibe la secreción de MMP-9 y disminuye la migración en células de cáncer de mama [68].

PKCα también presenta también un efecto dual, estudios demostraron que la sobreexpresión de PKCα en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 lleva a un fenotipo más agresivo y las células exhiben una mayor tasa de proliferación, crecimiento independiente de anclaje en agar blando y mayor tumorigenicidad en ratones nude [69]. En contraste, la sobreexpresión de la isoforma α de PKC resulta en un arresto del ciclo celular en varios tipos de células, por ejemplo al contrario de lo que ocurre en la MCF-7, las MCF-10 muestran un crecimiento más lento con un tiempo de duplicación significativamente mayor respecto a la línea parental [70]

Mientras que se la ha asociado con el incremento del potencial proliferativo de células tumorales mamarias [71, 72], también se ha reportado que pacientes con tumores PKCα-negativos, responden mejor a los tratamientos endócrinos que aquellos con tumores PKCα-positivos [73, 74], teniendo estos últimos menor tasa de supervivencia [75].

En este trabajo nos proponemos analizar el efecto de la sobreexpresión de dos isorformas de PKC, α y δ en modelos tumorales mamarios, murino y humanos.

El sistema retinoide

Los retinoides son una familia de moléculas de señalización relacionados con la vitamina A en términos de su estructura química. El ácido retinoico (RA) es un regulador fisiológico de un gran número de procesos biológicos, relacionados al desarrollo embrionario y de la visión, reproducción, formación ósea, hematopoyesis, diferenciación, proliferación y apoptosis [76, 77].

La vitamina A no puede ser sintetizada en especies animales, por lo cual debe obtenerse de la dieta, en forma de retinol, retinil ester o β-caroteno. Una vez ingerida es almacenada como retinil ester e hidrolizados a retinol en células hepáticas. Por otro lado el β-caroteno se absorbe por difusión pasiva al interior del enterocito, donde también es convertido en retinol [78].

El retinol tiene varias formas biológicamente activas, entre las cuales las más abundantes son la forma trans del RA (all-trans RA, ATRA) y la formas Cis del RA (9-cis RA, 9-CRA). La formación de estos compuestos a partir de retinol, implica dos etapas de oxidación. La primera es una oxidación reversible dada por la enzima retinol deshidrogenasa, y la segunda es una oxidación irreversible catalizada por la retinal deshidrogenasa [79].

Mecanismo de acción de los RA

El retinol viaja en el torrente sanguíneo unido a la proteína RBP (Retinol Binding Protein), que solubiliza y estabiliza los retinoides en soluciones acuosas. La captación del retinol por la célula blanco está dada por una proteína de transmembrana que es un receptor de RBP, llamada STRA6. Una vez dentro de la célula, el retinol se une a la proteína CRBP (Cellular retinol binding protein), que lo transporta por el citoplasma y lo expone a las enzimas capaces de metabolizarlo finalmente en RA. El RA entra al núcleo unido a la proteína CRBP, para luego acoplarse a sus receptores nucleares [80].

Hay dos tipos de receptores nucleares retinoides: receptores retinoicos (RARs) que unen ATRA y 9CRA con similar afinidad, y los receptores rexinoideos (RXRs) que unen sólo 9CRA. Cada tipo de receptor nuclear incluye tres subtipos: α, β y γ, cada uno de éstos a su vez

presentan varias isoformas, que difieren entre sí en su región amino-terminal. Existen dos isoformas principales de RARα (α1 y α2) y de RARγ (γ1 y γ2), y cuatro isoformas de RARβ (β1-β4). También, se identificaron varias isoformas de RXRα (α1 y α2), RXRβ (β1 y β2) y RXRγ (γ1 y γ2) [81].

Tanto los RARs como los RXRs son expresados de manera tejido específica reflejado su función diferencial dependiendo del contexto celular en el que se exprese. RARα se expresa en la mayoría de los tejidos humanos, en cambio la expresión de RARβ es más limitada, prevaleciendo en el tejido neural y difícilmente encontrado en piel, a diferencia de RARγ que se expresa predominantemente en este último. Los RXRs están ampliamente expresados en tejidos adultos. RXRβ se encuentra en la mayoría de los tejidos, mientras que la expresión de RXRα es más abundante en hígado, riñones, bazo y piel. En contraste RXRγ se encuentra restringido mayoritariamente a músculo y cerebro [82].

Los receptores RARs activados por unión a ligando pueden formar heterodímeros con los RXRs, y dado que tienen sitios de unión al ADN, los heterodímeros pueden unirse a una secuencia específica denominada Elementos Respondedores de RA (por su sigla en inglés RAREs) [83] (Fig.8).

En ausencia de ligando, el heterodímero RAR/RXR recluta las proteínas co-represoras N-CoR o SMRT, mSin3 y desacetilasas de histonas. Esto podría llevar a la formación de una estructura inactiva de la cromatina, previniendo la transcripción.

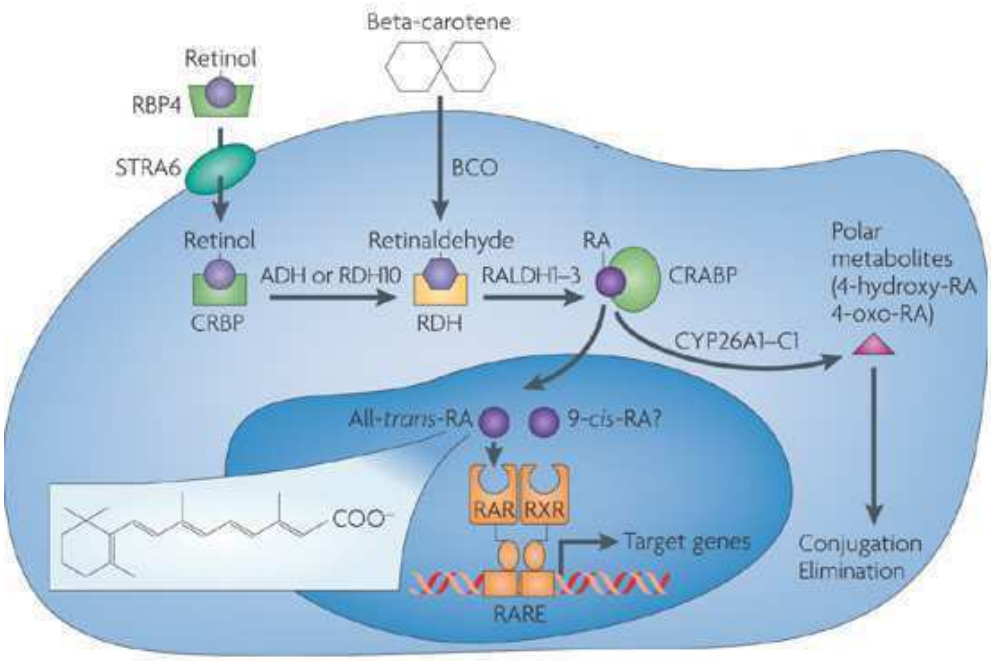


Figura 8: Metabolismo, transporte y mecanismo de acción de RA [84]. El retinol unido a RBP es incorporado a la célula mediante el receptor STRA6. En el interior de la célula se une a CRBP y es transformado en RA mediante dos etapas de oxidación. El RA es transportado al núcleo y actúa como ligando de los receptores nucleares RARs y RXRs, que se heterodimerizan. Los heterodímeros se unen a los sitios RARE y regulan la actividad transcripcional de los genes blanco.

El Sistema Retinoide y Cáncer

Numerosos estudios han dado cuenta de la relación existente entre el RA y la progresión tumoral. Así, mientras el tratamiento con retinoides disminuye la incidencia de cáncer en ratones [85], la expresión alterada de los receptores de RA se asocia con la transformación maligna tanto en tejidos animales como en líneas celulares en cultivo.

Dado que los receptores nucleares retinoideos son mediadores de la mayoría de los efectos antiproliferativos y citostáticos de los retinoides, es de esperar que cambios en su función o expresión estén involucrados en varios tipos de cáncer. Un ejemplo de este fenómeno se da en la Leucemia Promielocitica Aguda, en la cual alteraciones genéticas del gen de RARα conducen a la formación de una proteína de fusión [86]. Hace más de una década que esta enfermedad es curable y su principal tratamiento incluye la administración de ATRA [87]. También existen evidencias que indican que la expresión de

algunas isoformas de RAR, están inhibidas en ciertos tipos de cáncer [88, 89]. En queratinocitos, se considera al subtipo RARγ como supresor de tumores. De hecho, en ratones KO, la pérdida de RARγ predispone a la formación de tumores de piel [90] y RARγ está ausente en los queratinocitos de cánceres de cabeza y cuello [91].

En otros órganos como pulmón, cérvix y mama, la pérdida de RARβ está asociada a tumorigénesis. De hecho, en estos cánceres el gen de RARβ está frecuentemente delecionado o su promotor silenciado a causa de una metilación aberrante del DNA [92].

La alteración en el patrón de fosforilación de los receptores también puede derivar en el mal funcionamiento de los mismos. Así los tumores mamarios caracterizados por la sobreexpresión de un receptor tirosina quinasa como HER2/Neu, generalmente son resistentes a los efectos antiproliferativos de RA. En estos casos RARα está fosforilado de manera aberrante y por lo tanto es degradado o se suprime su actividad [86].

Dado que la actividad de los RA también depende de su transporte hacia los receptores nucleares, las proteínas de unión al RA son componentes fundamentales de este proceso. un ejemplo de ello es la pérdida de expresión de CRBP1 en tumores mamarios [93].

La competencia de los RA para regular la proliferación celular está asociada a la capacidad de los receptores RARs de interferir con la función del factor de transcripción mitogénico AP-1. Este es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por proteínas pertenecientes a las familias de c-Fos, c-Jun, ATF y JDP. Está implicado en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta a diversos estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento, estrés e infecciones virales o bacterianas. AP-1 controla, de este modo, diversos procesos celulares incluyendo diferenciación, proliferación y apoptosis [94]. Entre dichos genes se pueden mencionar metaloproteasas, VEGF y TGFβ. Se ha propuesto que la transactivación de AP-1 sería un requisito para el desarrollo tumoral *in vivo* [95]. En función de todo esto, resulta de gran interés la identificación de compuestos capaces de regular la actividad AP-1. En este sentido los retinoides han sido reportados como trans-represores de AP-1 y ésta sería la base de sus efectos citostáticos [96].

El Sistema Retinoideo y PKC

Como fue descripto anteriormente, el mecanismo de acción de los RA mejor estudiado es a través de la activación de los sitios RAREs por los receptores nucleares retinoicos. Pero recientemente se ha propuesto un mecanismo no-genómico, mediante el cual los retinoides ejercen sus efectos por vías de señalización independientes de la transcripción génica [97]. Los RA actuarían modulando la actividad de otros factores de transcripción a través de heterodímero RAR/RXR, pero independientemente de RAREs [80]. Distintos estudios demostraron que el RA, mediante RARβ, inhibe la actividad de NFκB [98] afectando la activación de PI3K en células neurales a través de la modulación de los niveles intracelulares de calcio [99].

El control ejercido por los retinoides por este mecanismo alternativo, involucra distintas vías de señalización incluyendo la de PKC [100, 101]. Se sabe que algunas isoformas de PKC son capaces de unir ATRA y dicha unión afectaría la actividad de esta enzima [102]. Por otro lado, la activación de ciertas PKCs fosforilaría a los RARs frente al estímulo con ATRA [103].

A pesar de estos datos, que dan cuenta de la existencia de una interacción entre ambos sistemas, el mecanismo por el cual los retinoides regulan PKC no está totalmente dilucidado y hasta el momento, no se ha investigado en profundidad de qué manera este *crosstalk* puede modularse a fin de revertir el fenotipo maligno de tumores mamarios con alteraciones en los niveles de expresión y/o actividad de distintos componentes de la familia de PKC.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La modulación de los niveles de expresión de PKC conjuntamente con el tratamiento retinoide es capaz de revertir el fenotipo maligno de células tumorales mamarias murinas y humanas.

A- Las isoformas α y δ de PKC podrían inducir alteraciones fenotípicas asociadas con la promoción y/o inhibición de la progresión maligna en líneas celulares derivadas de tumores de mama murinos y humanos.
B- La sobreexpresión de determinadas isoformas de PKC podría alterar la sensibilidad celular al tratamiento con retinoides.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

A1- A partir de células LM3, MDA-MB231 y T47D, generar sublíneas modificadas genéticamente a fin de sobreexpresar las isoformas α y δ de PKC mediante transfección estable con vectores plasmídicos conteniendo la secuencia completa de los genes de interés.
A2- Estudiar *in vitro* el impacto de la sobreexpresión de las isoformas de PKC antes mencionadas sobre los distintos procesos vinculados a la transformación maligna y progresión tumoral (capacidad proliferativa, progresión del ciclo celular, potencial migratorio e invasivo y producción de enzimas proteolíticas).
A3- Analizar las vías de señalización intracelular, vinculadas a proliferación y sobrevida, que estarían siendo moduladas por la sobreexpresión de las distintas isoformas de PKC, evaluando en particular las vías de MEK/ERK y PI3K/Akt.
A4- Estudiar *in vivo* la capacidad tumorigénica y metastásica de las líneas tumorales transfectadas.
B1- Analizar si la sobreexpresión de las diferentes PKCs sensibiliza a las células al tratamiento con ATRA. Evaluaremos en este punto las respuestas biológicas relacionadas

con el crecimiento celular y la progresión tumoral mencionadas anteriormente (puntos A2 y A3).

B2- Estudiar si la alteración en los niveles de PKC afecta la actividad de los receptores nucleares retinoideos.

B3- Evaluar *in vivo* la eficiencia del tratamiento con ATRA en ratones BALB/c portadores de tumores LM3 modificados genéticamente a fin de sobreexpresar diferentes isoformas PKC. Analizaremos parámetros asociados a la capacidad tumorigénica y metastásica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: LM3, derivada de un adenocarcinoma mamario murino, tumorigénico y metastásico en ratones BALB/c (Urtreger y col, 1997 [104]). T47D (ATCC n° HTB-133), establecida a partir de un carcinoma ductal de mama de una mujer de 54 años de edad. MDA-MB231 (ATCC n° HTB-26) también obtenida de un carcinoma ductal, de una mujer de 51 años.

Las tres líneas se mantuvieron mediante subcultivos sucesivos en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 80 µg/ml de gentamicina a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de dióxido de carbono en el aire.

Vectores de expresión, transfección y selección

Células de la línea LM3 fueron transfectadas con 5 µg de plásmido conteniendo la secuencia completa de PKCα o PKCδ inserta en vectores pMTH. Las líneas celulares humanas fueron transfectadas con 5 µg de plásmido conteniendo la secuencia de PKCα o PKCδ inserta en vectores EGFP-N1, lo que da como resultado proteínas de fusión con la proteína fluorescente verde (GFP).

Como agente de transfección se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células transfectadas con el vector vacío, carente del inserto de PKC, fueron utilizadas como control. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron seleccionadas mediante el agregado de 500 µg/ml de G418 al medio de cultivo, antibiótico contra el cual las células adquirieron neoresistencia.

Western blot (WB)

Cultivos subconfluentes de las diferentes líneas celulares se lisaron utilizando PBS-Tritón-X100 conteniendo inhibidores de proteasas. Luego de la cuantificación proteica, las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 9% en condiciones desnaturalizantes. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad) y la adhesión inespecífica de los

anticuerpos se bloqueó incubando dichas membranas durante 1h en buffer de bloqueo conteniendo 5% de leche descremada y 0,1% Tween-20. Luego se incubó toda la noche con un anticuerpo primario específico y finalmente se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. La detección se realizó mediante quimioluminiscencia, las placas se escanearon utilizando el sistema Foto/Analyst Express System (Fotodyne) y las bandas se cuantificaron mediante el software Gel-Pro Analyzer.

Ensayo de proliferación celular

La capacidad proliferativa se determinó evaluando el número de células durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos celulares no sincronizados de las líneas, tratados o no con ATRA (1 µM cada 24 hs durante 96 hs). En placas de 60 mm se sembraron $4x10^4$ células de cada línea celular, en el medio habitual de cultivo. A diferentes tiempos después de la siembra, células correspondientes a grupos control y tratado (n=3) fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y su número se determinó por recuento en cámara de Neubauer.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Monocapas celulares tratadas o no con ATRA por 72 hs, fueron tripsinizadas, lavadas con PBS, fijadas con etanol 70%. Esta suspensión celular fue teñida con 100 µg/ml de ioduro de propidio y las muestras fueron examinadas en un citómetro BD FACS CANTO y analizadas con los programas Diva y Flowjo (Becton Dickinson y Ashland).

Producción de enzimas proteolíticas

Preparación de medios condicionados (MC)

La secreción de metaloproteasas de matriz (MMPs), específicamente de MMP2 y MMP9, se evaluó en MC de 24 hs en ausencia de SFB. Brevemente, monocapas celulares crecidas en placas de Petri de 35 mm se lavaron durante 30 min. con PBS y posteriormente se incubaron en medio MEM libre de SFB por otras 24 hs en presencia o no de ATRA (1 µM). Finalmente los MC se recogieron, alicuotaron y guardaron a -

20°C. Los MC fueron utilizados una sola vez después de su descongelación. Las monocapas remanentes se lisaron utilizando 1% Tritón x-100 en PBS y el contenido proteico se cuantificó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

Cuantificación de la actividad de MMPs secretada

La actividad de MMP2 y MMP9 secretadas, se cuantificó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% copolimerizados con gelatina en condiciones no desnaturalizantes. Luego de la electroforesis los geles se incubaron a 37°C por 48 hs en buffer conteniendo NaCl 0,15 M, $CaCl_2$ 10 mM y 50 mM Tris-HCl pH 7,4. Finalmente los zimogramas se tiñeron con Coomassie Blue (0,1% Comassie R-250, 10% ácido acético y 30% metanol) y la actividad proteolítica se reveló como bandas claras de degradación sobre un fondo azul. Estas bandas se cuantificaron por densitometría empleando el sistema Foto/Analyst Express System (Fotodyne) y el software Gel-Pro Analyzer. Los datos se expresan en unidades arbitrarias y fueron normalizados en relación a su concentración proteica.

Para la detección de actividad gelatinolitica inespecífica, los geles se incubaron en la misma solución buffer suplementada con 40 mM EDTA. Después de la incubación, los geles se fijaron y se tiñeron con Coomassie Blue.

Ensayo de migración

La capacidad migratoria se analizó mediante ensayos de "cicatrización de heridas" (*wound healing*). Se practicaron heridas de 400 µm de ancho en monocapas subconfluentes de las distintas líneas celulares. Las células se lavaron con PBS y se incubaron en presencia o no de ATRA (1 µM) con baja concentración de SFB (2%). A distintos tiempos (0 y 12 hs) se tomaron registros fotográficos de las áreas heridas. La capacidad migratoria de las células se cuantificó calculando del porcentaje del área ocupada por células migratorias respecto al área de la herida original.

Ensayo de invasión

La capacidad invasiva celular se analizó utilizando cámaras transwell con membranas de 0,8 µm de poro (Falcon). Las caras superior de los transwells se cubrió con una solución conteniendo extracto de membrana basal (Matrigel, Corning) en una dilución 1:3 en medio de cultivo. Sobre la misma cara del transwell se siembran $1x10^5$ células en medio de cultivo suplementado con 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA) mientras que en el compartimento inferior se agregan 0,3 ml de medio de cultivo adicionado con 10% de SFB como quimioatractante.

Las células se cultivaron durante 16 hs y se fijaron con formol neutro. El compartimiento superior se limpió con un hisopo a fin de descartar las células que no invasoras. Finalmente el filtro se tiñe con DAPI y se observa en microscópio de epifluorscencia. Se determinó el número de células por campo en 10 campos seleccionados al azar.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Cincuenta mil células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio dispuestos en placas de 24 pocillos en medio de cultivo con 10% de SFB. Al día siguiente las células fueron tratadas con ATRA o DMSO como control durante 6 hs.

En los ensayos en los que se llevó a cabo la marcación de la integrina β1, se desarrollaron utilizando células vivas, con el objeto de disminuir la señal citoplasmática inespecífica. Para ello, el anticuerpo se preparó en el medio de cultivo y las células se incubaron con el mismo durante 1 hora en la estufa. Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 4% se bloquearon con BSA 3% en PBS por 1 hr. Finalmente se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 546 mouse 1:500) por 1 hr. Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas mediante un microscopio confocal Olympus FV-1000 con un objetivo de agua UPLAN APO Olympus 60x/1,20 AN. Las imágenes fueron procesadas posteriormente con el software Image J.

Cultivo 3D en Matrigel

Una suspensión celular conteniendo $5x10^3$ cél/ml se diluyó al medio con medio de cultivo conteniendo Matrigel (4%), SFB (2%) y EGF (10 ng/ml). Esta mezcla se sembró en un

portaobjeto multicámaras (Labtek, BD Biosciences) cuyos pocillos fueron previamente cubiertos por 40 µl de Matrigel puro. Luego de 96 hs, se realizó un cambio de medio en presencia o no de ATRA y se mantiene en estas condiciones durante 96 hs más a fin de tomar registros fotográficos.

Ensayo de genes reporteros

Estos ensayos se realizaron co-transfectando transitoriamente las células con 5 µg de los plásmidos RARE-Luciferasa o AP1-Luciferasa y 0,5 µg del plásmido Renilla Luciferasa como control utilizando Fugene (Roche) como agente de transfección, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas post-transfección, las células se trataron o no con ATRA (1µM). Finalmente, se midió la actividad de Luciferasa y Renilla utilizando el Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Los valores de actividad Luciferasa se normalizaron con los valores de actividad de Renilla.

Purificación de ARN y Retrotranscripción

Los niveles de transcripción de los receptores retinoides (RAR) fueron analizados por q-PCR. Para ello se sembraron las células en placas de Petri de 100 mm y se las trató por 24 hs con ATRA o DMSO como control. El ARN total fue extraído por incubación con Tri Reagent (Sigma-Aldrich) por 5 min. a temperatura ambiente. Luego se agregaron 0,2 ml cloroformo por ml de extracto de Tri Reagent inicial. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 3 min. y centrifugadas a 12000 rpm por 15 min. a 4°C. La fase acuosa fue incubada con isopropanol frío (0,5 ml) por 10 min. a temperatura ambiente en agitación suave y nuevamente centrifugada a 12000 rpm por 10 min. El precipitado de RNA fue lavado con etanol al 75%, centrifugado a 6800 rpm por 5 min., resuspendido en agua DEPC y finalmente se midió su concentración con Nanodrop. Se partió de 2 µg de RNA para la retrotranscripción a cDNA utilizando *iScript cDNA Syntesis kit* (Bio Rad) según las indicaciones del fabricante.

Real time PCR (q-PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando la mezcla preformada y optimizada de todos los componentes de la reacción (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems), exceptuando *primers* (de los cuales se agregaron 200 nM de cada uno), moldes (1 µl de cDNA) y agua, en un volumen final de 25 µl. La detección del producto amplificado se monitoreó en un equipo Applied Biosystems 7500.

El SYBR Green® PCR Master Mix corresponde a una mezcla optimizada de colorante SYBR Green I, ADN polimerasa AmpliTaqGold, dNTPs y buffer. El programa de amplificación utilizado involucra los siguientes pasos:

Activación: 95°C por 10 min., seguida de la desnaturalización: 95°C por 15 seg. Luego la hibridización/extensión: 60°C por 1 min. Los dos últimos pasos se repitieron 40 veces.

El equipo, mediante el software 7500 System SDS, determina un nivel de fluorescencia umbral en la fase exponencial de la reacción, y el número de ciclos que requiere cada muestra para alcanzar dicho umbral se conoce como Ct (*Cycle threshold*), el que está directamente relacionado con la cantidad inicial de molde presente en la *PCR*. Los resultados expresados como Ct fueron promediados, se calculó su desvío estándar y las curvas estándar se construyeron mediante cálculo de regresión.

La especificidad de la reacción se evalúa generando curvas de desnaturalización (curvas de *melting*) de los productos de la mezcla de amplificación al finalizar el protocolo de *q-PCR*.

Para el cálculo de la expresión relativa se utilizó el método denominado "Delta Delta Ct" (ΔΔCt). Mediante este método los datos obtenidos para el gen de interés se normalizaron respecto a un gen de expresión constitutiva, en este caso el gen utilizado fue GAPDH. Luego, los datos de expresión del gen de interés normalizados se compararon respecto a una muestra que se seleccionó como referencia. Finalmente los resultados se expresaron como niveles de expresión relativos a esa muestra. La fórmula aritmética que describe estas relaciones es 2-ΔΔCt, donde:

ΔΔCt = ΔCt muestra incógnita - ΔCt muestra referencia

ΔCt = Ct gen de interés - Ct gen constitutivo

Las secuencias de los *primers* utilizados fueron las siguientes:

RARα: *forward* 5´- GGTCGGCGATGGTGAGGGT -3´

reverse 5´- TGGGCAAATACACTACGAACAACAG -3´;

RARβ: *forward* 5´- GATTTCTACACTGCGAGTCCGTC -3´

reverse 5´- GTGGAGATGGGGGGCTTG -3´

RARγ: *forward* 5´- TCAAAGCTGCCTGCCTAGAT -3´

reverse 5´- GTCGGAGAAGGTCATGGTGT -3

GAPDH: *forward* 5´- TGCACCACCAACTGCTTAGC

reverse 5´- GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Ensayos *in vivo*

Ratones

Para los ensayos *in vivo*, se utilizaron ratones hembra BALB/c, de 2 a 4 meses de edad, obtenidos del Bioterio del Instituto "A. H. Roffo". El agua y la comida fueron administrados *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos de acuerdo con la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" del NIH. Estos protocolos aplicados cuentan con la aprobación del CICUAL institucional.

Tumorigenicidad y desarrollo de metástasis espontáneas

Ratones anestesiados fueron inoculados ortotópicamente con $2x10^5$ células viables en 0,2 ml de MEM. Al momento de la palpación de los tumores, los ratones recibieron el tratamiento a través de la inserción subcutánea de un pellet conteniendo o no ATRA (10 mg). El tamaño de los tumores se midió con un calibre, dos veces por semana, determinando el largo y ancho de los tumores, para luego calcular el volumen utilizando la fórmula V= ¾ (π× L x 2 A), donde L es el diámetro mayor y A el diámetro menor. Los ratones fueron sacrificados 40 días luego de la inoculación del tumor y se extrajeron los pulmones que se fijaron en solución Bouin. El número y tamaño de las metástasis en la superficie pulmonar fueron determinados mediante disección bajo lupa estereoscópica. Demás órganos incluyendo hígado, riñones y bazo fueron también examinados para detectar la presencia de nódulos metastásicos.

RESULTADOS

Capítulo I:

Interacción entre el sistema retinoide y la vía de la PKC en un modelo mamario murino

Desarrollo del modelo celular murino

Es sabido que distintas isoformas de PKC pueden funcionar como oncogenes o genes supresores de tumores en un mismo tejido. Por otro lado, se ha postulado que los retinoides ejercen algunos de sus efectos sobre la diferenciación celular y la reversión del fenotipo maligno a través de interacciones con isoformas de PKC, modulando principalmente PKCα (generalmente asociada a proliferación) y PKCδ (usualmente asociada a inhibición del crecimiento y diferenciación).

Con el fin de estudiar tanto el efecto de la sobreexpresión de distintas isoformas de PKC en el tejido mamario, así como la interacción entre las vías de señalización de los retinoides y la PKC, se desarrolló un modelo murino en el que células de la línea LM3 sobreexpresan las isoformas α o δ de PKC. Para ello se transfectó dicha línea celular con un vector plasmídico conteniendo la secuencia completa de PKCα, PKCδ o el vector carente del inserto de PKC, como control. Para generar las sublíneas de forma estable las células transfectadas se seleccionaron con geneticina, antibiótico contra el cual las células adquirieron neo-resistencia. Obtuvimos de esta manera las sublíneas celulares LM3-PKCα, LM3-PKCδ y LM3-Vector en las que se confirmó, mediante ensayos Western blot, el aumento en los niveles de expresión de ambas enzimas (Fig.9).

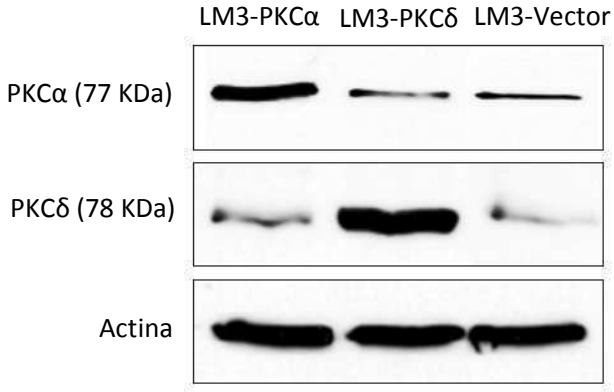


Figura 9: Sobreexpresión de PKCα y PKCδ en células LM3. Lisados celulares, preparados a partir de las distintas sublíneas derivadas de LM3, fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 9% y revelados con anticuerpos contra diferentes isoformas de PKC (50 µg/calle). Las bandas corresponden a la proteína endógena junto a la sobreexpresada. Se muestra un experimento representativo. Similares resultados se obtuvieron en dos experimentos independientes.

Proliferación celular

Con el objeto de establecer cuál es el efecto de la sobreexpresión de las isoformas α y δ de PKC en la modulación de la capacidad proliferativa de la línea celular LM3 se realizaron curvas de crecimiento comparativas, tal como se describió en la sección materiales y métodos.

El análisis de la tasa de proliferación celular reveló que la línea LM3-PKCα presenta un tiempo de duplicación significativamente menor que las células control (14,8±2,3 hs vs 21,2±3,1 hs). En cambio la sobreexpresión de PKCδ no alteró la capacidad proliferativa (tiempo de duplicación: 20,1±2,4 hs) (Fig. 10).

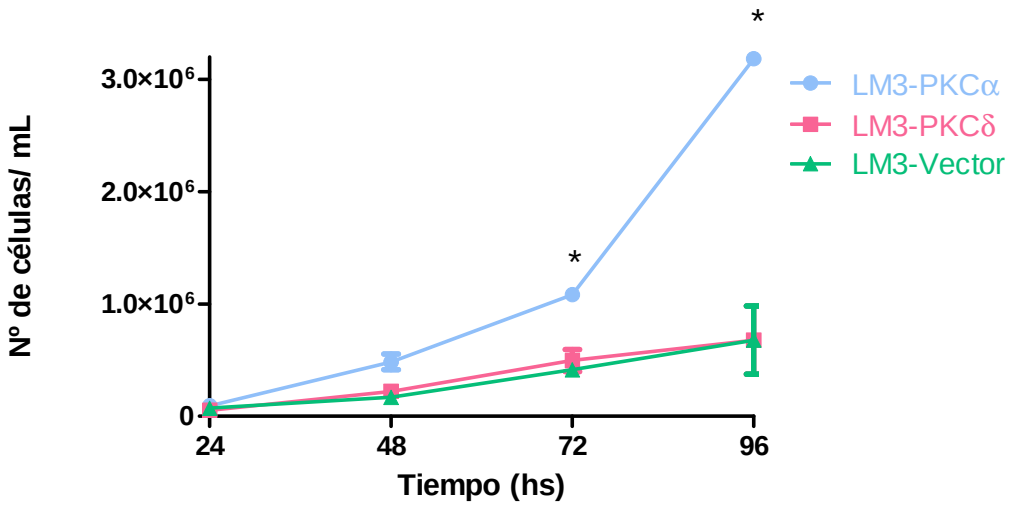


Figura 10: Efecto de PKCα y PKCδ sobre el tiempo de duplicación poblacional. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células LM3 transfectadas. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado.*p <0,05 *vs* células LM3-Vector (ANOVA). La figura muestra el resultado de un experimento representativo de dos ensayos independientes (n=3).

Dado el conocido efecto citostático y diferenciador del ácido retinoico, quisimos evaluar si el tratamiento con ATRA es capaz de modular diferencialmente la capacidad proliferativa de las sublíneas modificadas genéticamente. Para ello se llevó a cabo el ensayo de proliferación antes mencionado en presencia de dicho retinoide.

La línea LM3-PKCα mostró una importante reducción en su capacidad proliferativa luego del tratamiento con ATRA. Si bien se observó una tendencia en la inhibición del crecimiento a partir de las 48 hs, la misma alcanzó significación estadística 24 hs más tarde (Tiempo de duplicación: 24,3±4,2 hs vs 14,8±2,3 hs para las células LM3-PKCα tratadas y sin tratar respectivamente) (Fig.10).

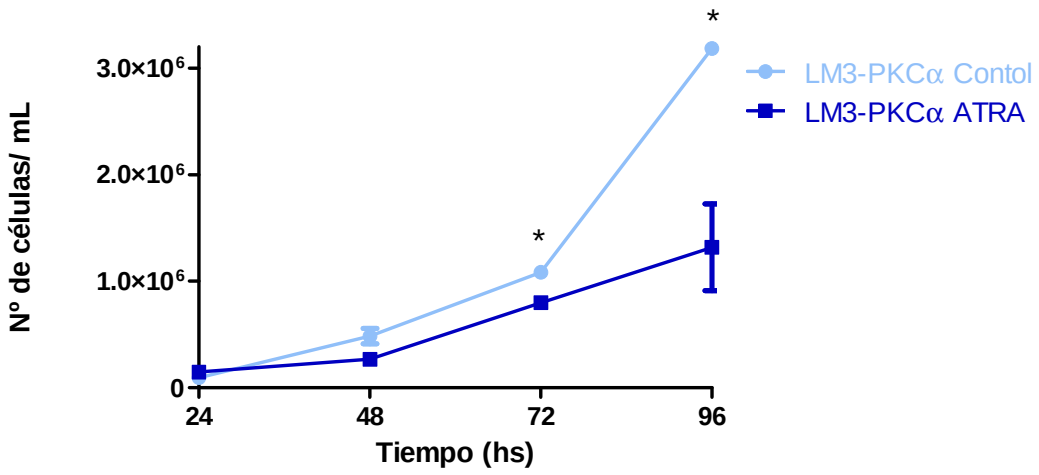


Figura 10: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el tiempo de duplicación poblacional de células LM3-PKCα. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células LM3-PKCα. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado.*p <0,05 *vs* células LM3-PKCα no tratadas (test *t* de Student). La figura muestra el resultado de un experimento representativo de dos ensayos independientes (n=3).

Por otro lado, la exposición al ATRA no alteró la capacidad proliferativa de las líneas LM3-PKCδ ni LM3-Vector (Fig.11 y 12 respectivamente).

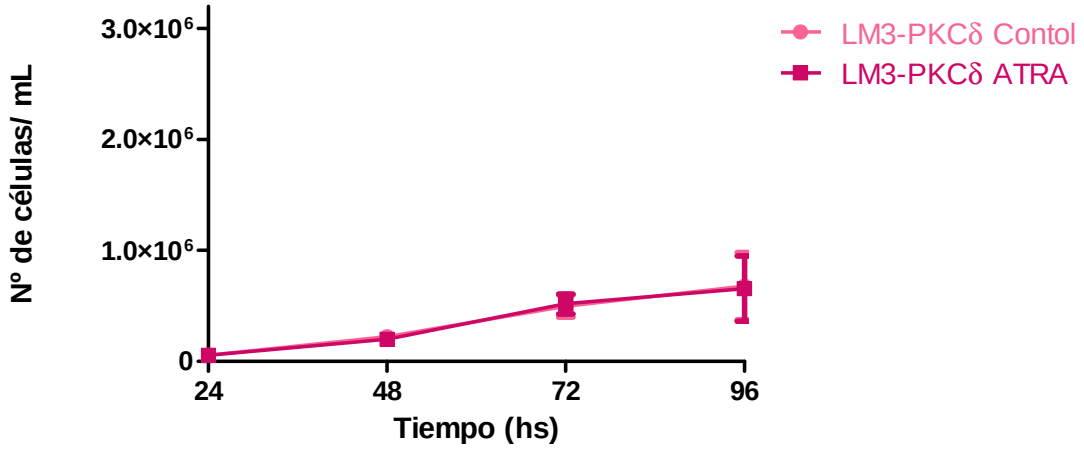


Figura 11: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el tiempo de duplicación poblacional de células LM3-PKCδ. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células LM3-PKCδ. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado. La figura muestra el resultado de un experimento representativo de dos ensayos independientes (n=3).

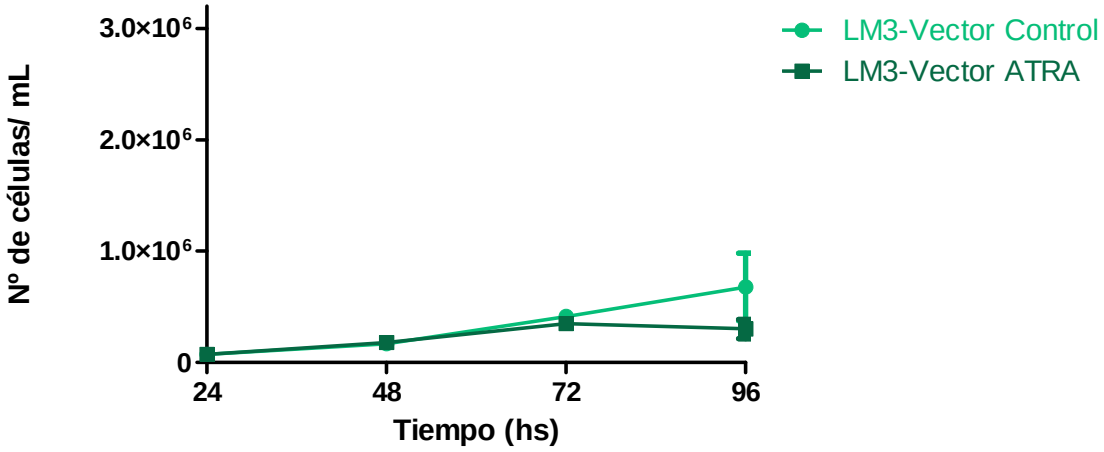


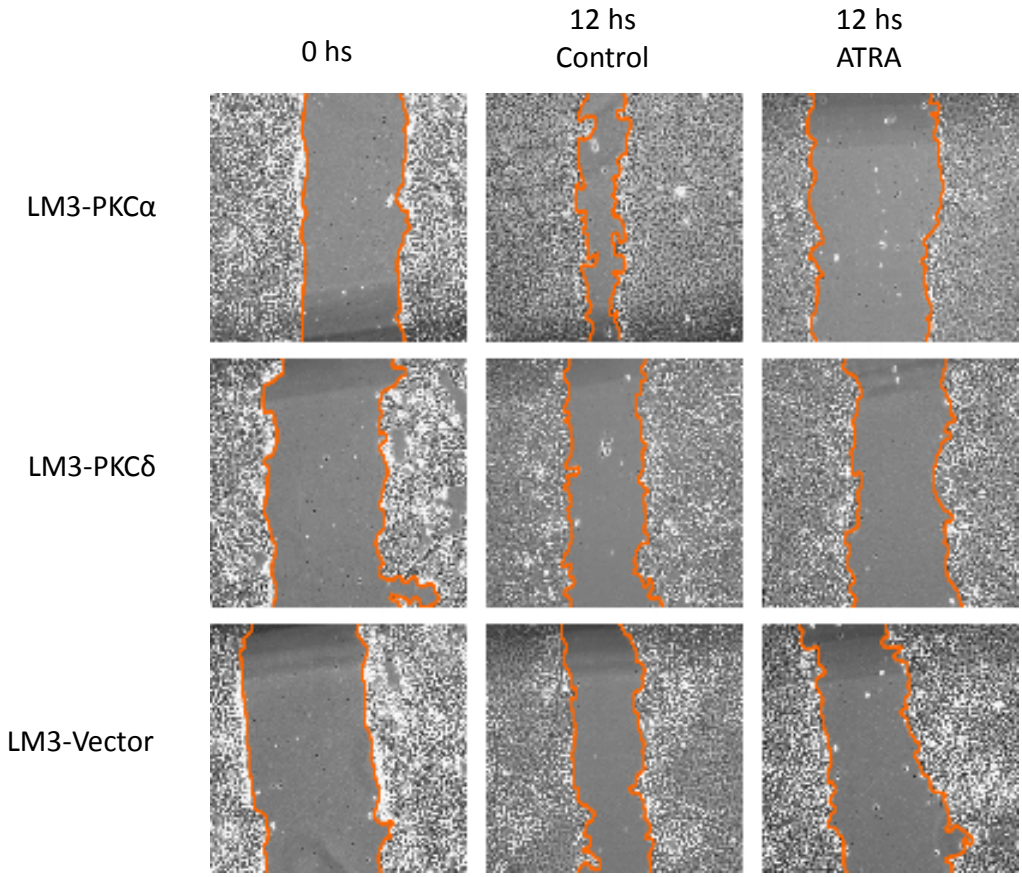
Figura 12: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el tiempo de duplicación poblacional de células LM3-Vector. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células LM3-Vector. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado. La figura muestra el resultado de un experimento representativo de dos ensayos independientes (n=3).

Migración celular

Con el objeto de analizar si la sobreexpresión de las isoformas α y δ de PKC están involucradas en procesos *in vitro* vinculados a la diseminación metastásica, se llevaron a cabo ensayos de "cicatrización de herida". Por otro lado, y a fin de evaluar si el tratamiento retinoide afecta dicho proceso en las distintas sublíneas, se repitió el ensayo en presencia del retinoide (ATRA) en el medio de cultivo.

Pudimos determinar que las células LM3-PKCα presentan una mayor capacidad migratoria respecto a los demás transfectantes (PKCδ y Vector). Sin embargo, esta sublínea fue la única capaz de responder al tratamiento retinoide, con una reducción significativa en la cicatrización de la herida (Fig.13 A y B).

A.



B.

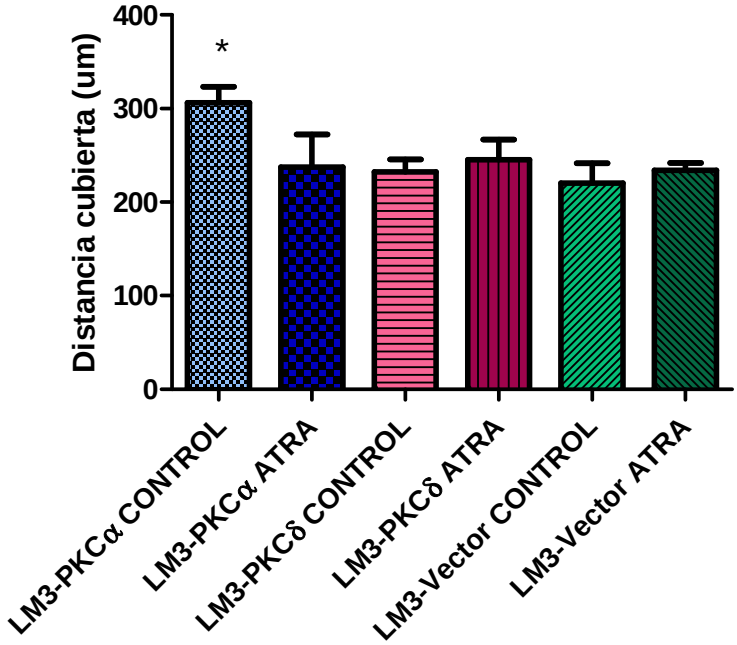


Figura 13: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la capacidad migratoria de células que sobreexpresan distintas isoformas de PKC. Monocapas subconfluentes de las líneas celulares LM3-PKCα, LM3-PKCδ, LM3-Vector fueron "heridas" a tiempo 0 permitiendo que las células migraran hacia el área libre de células por 12 hs en presencia o no del tratamiento retinoide. El mismo campo fue fotografiado a tiempos 0 y 12 hs (panel A). La migración celular fue cuantificada calculando el área ocupada por las células migratorias respecto al área original libre de células (panel B). Los datos en el panel B corresponden a la media ± D.S. (n=4). *p<0,05 *vs* células LM3-PKCα tratadas con ATRA (ANOVA). Los resultados son representativos de tres ensayos independientes.

Actividad proteolítica secretada

Una de las principales características del epitelio de la glándula mamaria es que atraviesa profundas remodelaciones y cambios morfológicos durante los ciclos de crecimiento e involución mamaria. La adquisición de una correcta organización tisular depende en parte de las enzimas de degradación de la matriz extracelular, como las MMPs. Así mismo la

actividad de estas enzimas puede estar alterada en condiciones patológicas y se encuentra aumentada en varios tipos de cáncer invasivo.

Con el fin de analizar si la sobreexpresión de las distintas isoformas de PKC altera la actividad proteolítica y si hay una respuesta diferencial al tratamiento con ATRA, se midió la actividad de MMP 2 y 9 secretada al medio condicionado en las tres sublíneas celulares mediante zimografías directas de geles co-polimerizados con gelatina.

Observamos un marcado incremento en la actividad MMP-9 secretada por la línea LM3-PKCδ (Fig. 14). Por otro lado, la sobreexpresión de PKCα no alteró la actividad secretada de dicha proteasa (Fig. 14).

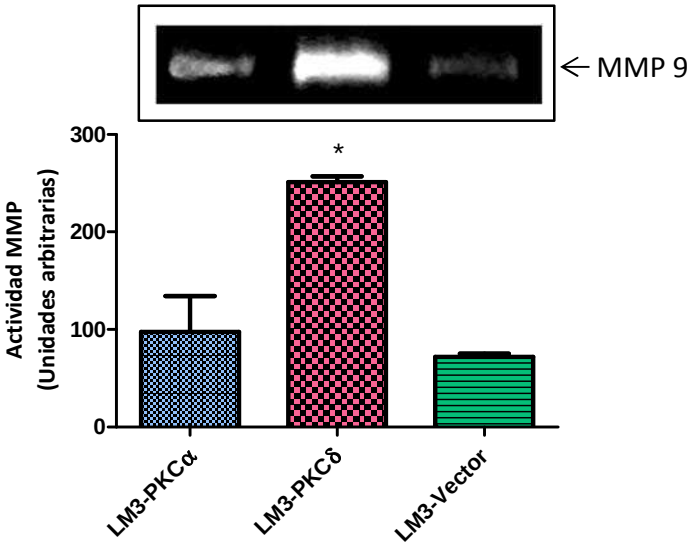


Figura 14: Efecto de la sobreexpresión de PKCα y PKCδ sobre la actividad de MMP-9 secretada. La actividad de MMP-9 fue analizada mediante zimografía utilizando MC de cultivos de células LM3 transfectadas con PKCα, PKCδ o el Vector vacío. Las bandas líticas fueron cuantificadas como se describió en la sección materiales y métodos referidas a la concentración proteica de las monocapas. Los datos están expresados como la media ± D.S. (n=3), son representativos de tres ensayos independientes, *p<0,05 *vs* células control (ANOVA).

Por otro lado, analizamos el efecto del ATRA sobre la actividad proteolítica secretada por las diferentes sublíneas (Fig. 15).

El ATRA incrementó la actividad MMP-9 secretada por las células LM3-PKCα y LM3-Vector, mientras que en las células LM3-PKCδ, cuyos niveles eran elevados basalmente, el

aumento de la MMP-9 no alcanzó significación estadística respecto a la misma sublínea sin tratar (Fig. 15).

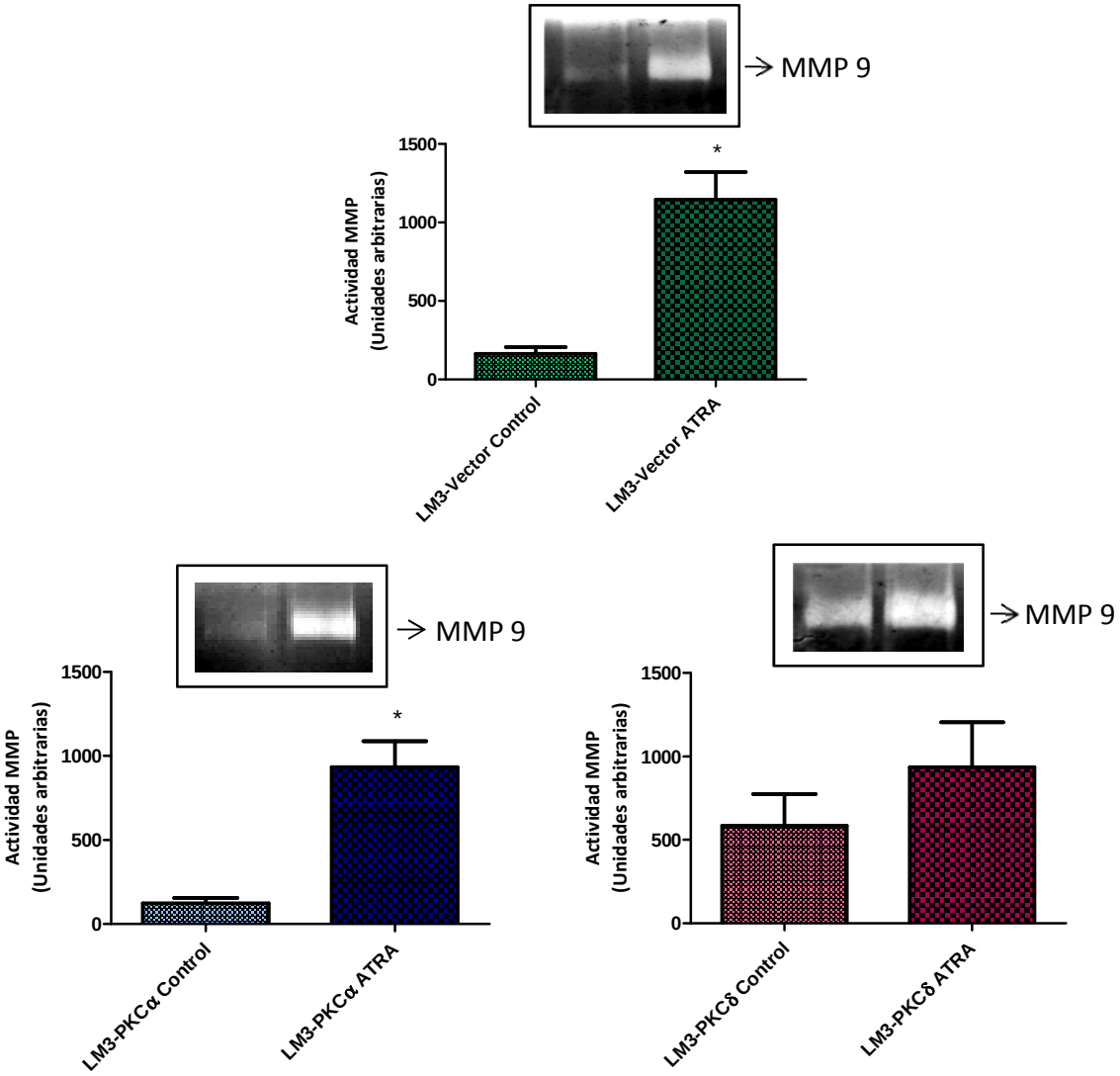


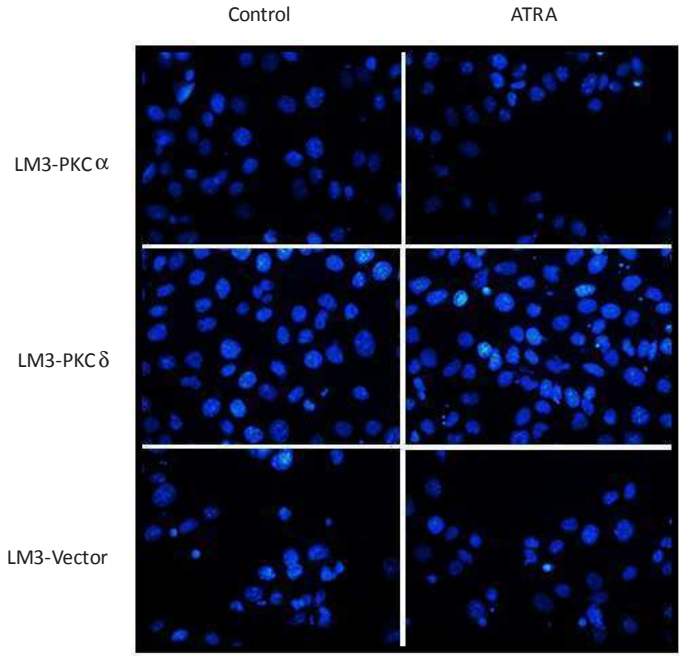
Figura 15: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la actividad de MMP-9 secretada. La actividad de MMP-9 fue analizada mediante zimografía utilizando MC de cultivos de células LM3-PKCα, LM3-PKCδ y LM3-Vector tratadas o no con ATRA. Las bandas de lisis fueron cuantificadas como se describió en la sección materiales y métodos. Los datos están expresados como la media ± D.S. (n=3) y son representativos de tres ensayos independientes. *p<0,05 *vs* células de la misma línea celular sin tratar (ANOVA test de Tukey).

Invasión celular

La disrupción de las membranas basales por parte de las células tumorales es uno de los requisitos básicos para completar distintos pasos de la cascada metastásica que culmina

con el establecimiento de un tumor secundario. Por esta razón y en función de los resultados obtenidos en los ensayos de migración celular y actividad de enzimas proteolíticas secretadas, nos propusimos estudiar de qué manera la sobreexpresión de las isoformas α y δ de PKC es capaz de afectar la capacidad invasiva de la línea LM3 utilizando cámaras transwell, tal como se detalla en la sección de materiales y métodos. También analizamos el efecto del tratamiento retinoide en cada una de las sublíneas celulares. Los resultados obtenidos demuestran que si bien el ATRA no produce un efecto significativo en ninguna de las tres sublíneas celulares, la sobreexpresión de PKCδ le confiere un importante aumento en la capacidad invasiva de las células LM3 (Fig. 16), lo cual es coincidente con lo observado en el análisis de la actividad proteolítica secretada.

A.



B.

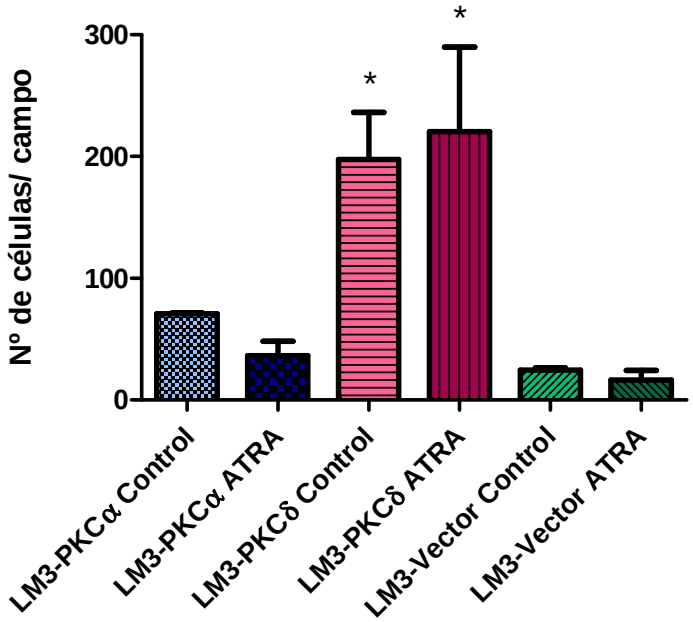


Figura 16: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la capacidad invasiva. La capacidad invasiva de las células LM3-PKCα, LM3-PKCδ y LM3-Vector, tratadas o no con ATRA, fue analizada utilizando cámaras transwell recubiertas con Matrigel. Luego de 16 hs de incubación, las células fueron fijadas, teñidas con DAPI y observadas en microscopio de fluorescencia (Panel A) Se cuantificaron células de 10 campos al azar como se describió en la sección materiales y métodos. Los datos están expresados como la media ± D.S. (n=3) y son representativos de tres ensayos independientes (Panel B), *p<0,05 *vs* células Vector control (ANOVA test de Tukey).

Ensayos *in vivo*

A fin de determinar el efecto de la sobreexpresión de las diferentes isoformas de PKC sobre el comportamiento celular *in vivo*, células de las tres sublíneas fueron inoculadas ortotópicamente en ratones singenéicos BALB/c.

De la misma manera que la sobreexpresión de PKCα induce un incremento en la capacidad proliferativa *in vitro*, las células LM3-PKCα indujeron *in vivo* la formación de tumores que, comparados con las células vector, mostraron un aumento en su tasa de crecimiento (Fig.

17). Esta misma sublínea celular presentó además un importante incremento en la capacidad metastásica espontánea en pulmón (Fig. 18). Por otra parte las células LM3-PKCδ, no mostraron cambios significativos ni en el crecimiento tumoral local, ni en la capacidad metastásica en comparación con la línea control (Fig. 17 y 18).

En relación al tratamiento retinoide, sólo los tumores LM3-PKCα respondieron al ATRA mostrando una importante reducción del crecimiento tumoral y del número de metástasis espontáneas (Fig. 18 y 19).

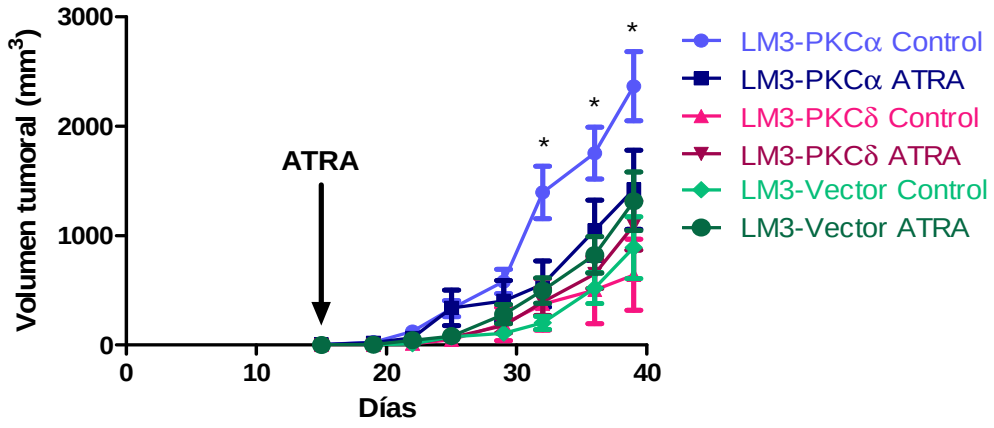
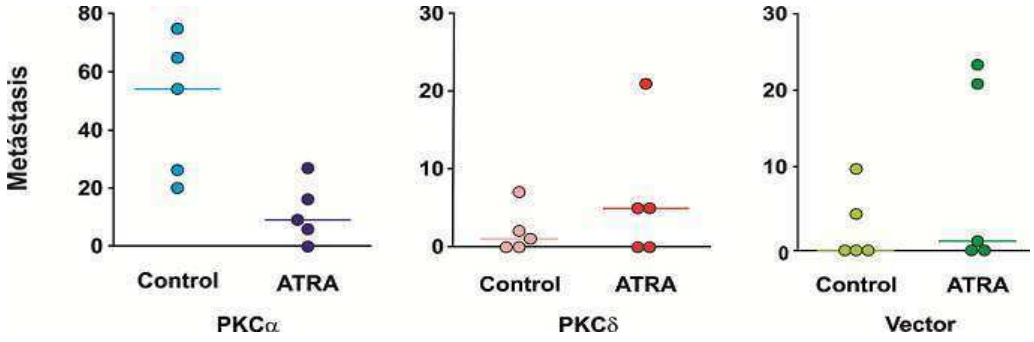


Figura 17: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Células Correspondientes a las tres sublíneas fueron inoculadas ortotópicamente en ratones BALB/c. Se calculó el volumen tumoral a partir de los dos diámetros perpendiculares. El crecimiento tumoral se evaluó por 25 días post tratamiento retinoide. La figura muestra el resultado de un experimento representativo de dos ensayos independientes (n=5). *p<0,05 *vs* células LM3-PKCα tratadas con ATRA y *vs* células control (Kruskal-Wallis).



	LM3-PKCα		LM3-PKCδ		LM3-Vector	
	Control	ATRA	Control	ATRA	Control	ATRA
Mediana	55	9 *	1	5	0	1
Rango	(20-75)	(0-27)	(0-7)	(0-21)	(1-10)	(0-20)

Figura 18: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la capacidad metastásica espontánea en pulmón. Los ratones portadores de tumores fueron sacrificados luego de 25 días de tratamiento, y se extrajeron los pulmones que fueron fijados en solución Bouin. El número de nódulos en la superficie pulmonar fue determinado bajo lupa estereoscópica. La figura muestra los resultados de un experimento representativo de 2 ensayos independientes.*$p<0,05$ *vs* células de la misma línea sin tratar (Kruskal-Wallis).

El análisis de los cortes histológicos de los tumores, generados por las tres sublíneas derivadas de LM3, reveló que los tumores de LM3-PKCα presentan un centro necrótico de gran tamaño, así como también una invasión completa de la capa muscular, dermis y epidermis, presentando incluso ulceraciones en la misma. Cuando los ratones inoculados con dichas células son sometidos al tratamiento retinoide, los tumores evidencian un centro necrótico de tamaño significativamente menor, y si bien las células tumorales invaden la capa muscular, la dermis y epidermis adyacentes al tumor se encuentran intactas (Fig. 19).

Por otro lado al analizar los tumores generados a partir de LM3-PKCδ y de las células control, pudimos observar que presentan centros necróticos de menor tamaño comparados con los de LM3-PKCα y que si bien la dermis y epidermis están afectadas por el tumor, la invasión no afecta a toda la dermis adyacente. En cuanto al tratamiento retinoide en los ratones inoculados con estas dos sublíneas celulares, no se observaron diferencias respecto a los ratones control (Fig. 20 y 21).

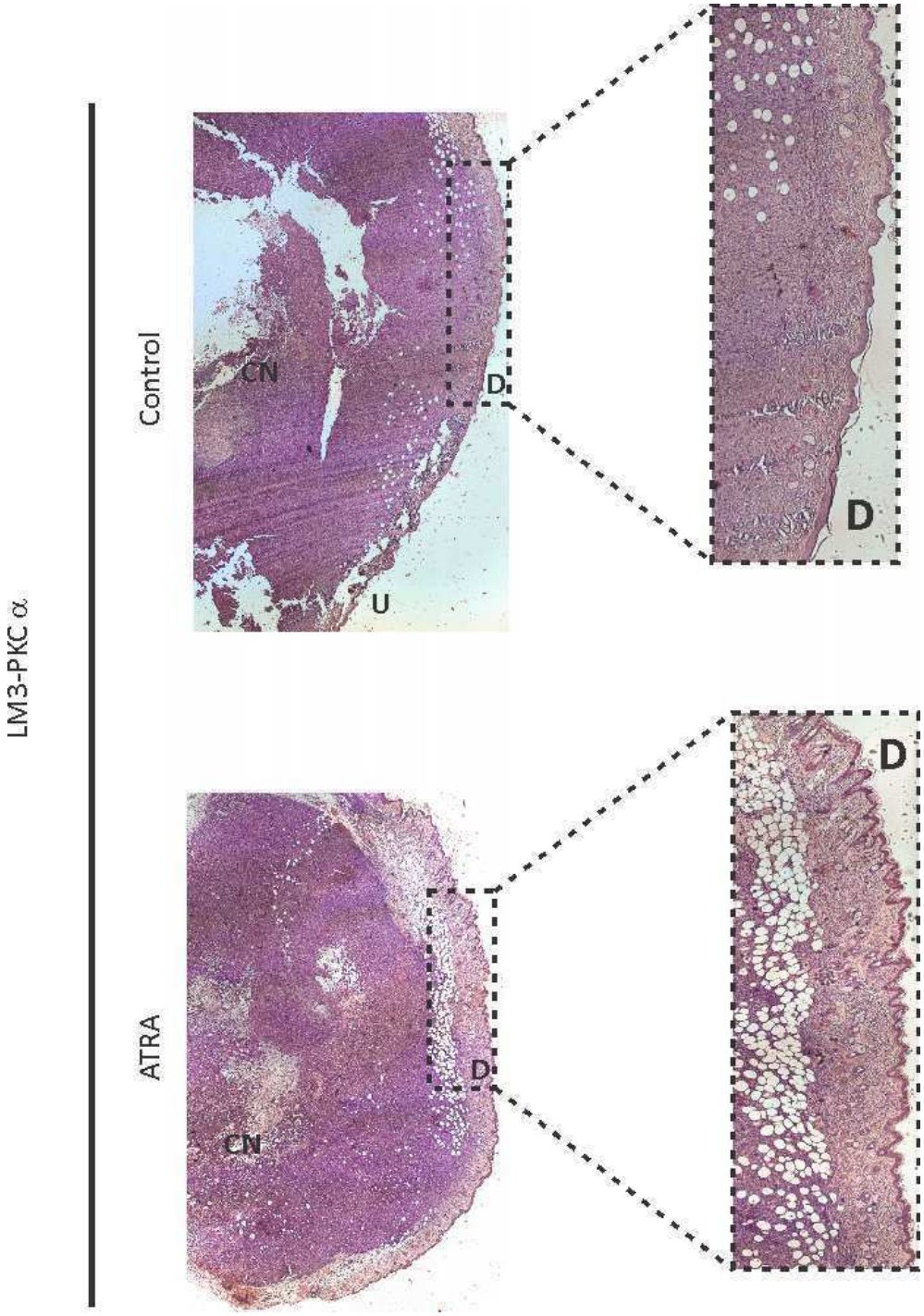


Figura 19: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Cortes histológicos de tumores mamarios teñidos con hematoxilina-eosina, generados a partir de la inoculación de células de la sublínea LM3-PKCα en ratones BALB/c sometidos o no al tratamiento con ATRA. CN: Céntro necrótico, D: Dérmis, U: Ulceración de epidermis.

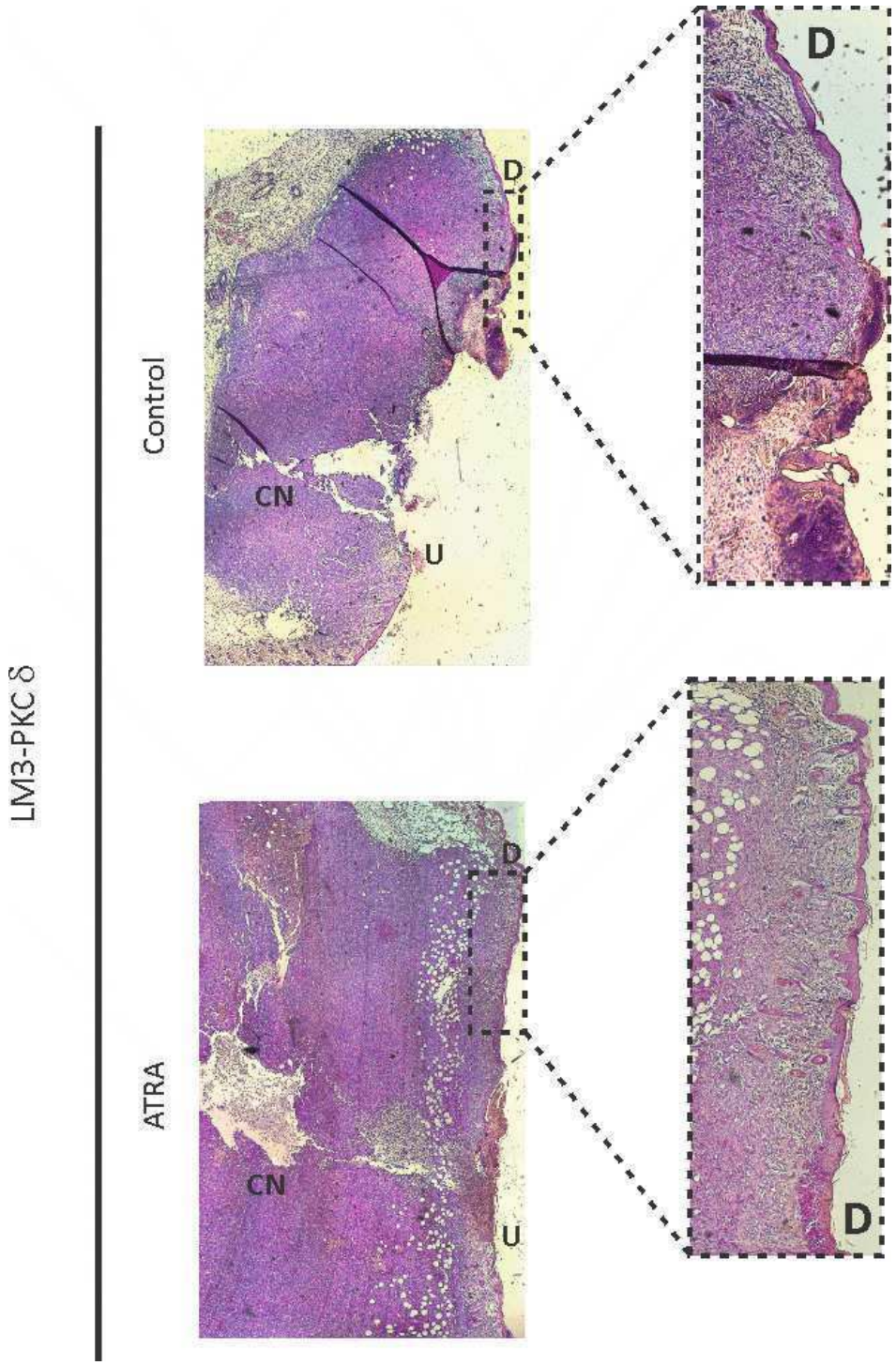


Figura 20: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Cortes histológicos de tumores mamarios teñidos con hematoxilina-eosina, generados a partir de la inoculación de células de la sublínea LM3-PKCδ en ratones BALB/c sometidos o no al tratamiento con ATRA. CN: Céntro necrótico, D: Dérmis, U: Ulceración de epidermis.

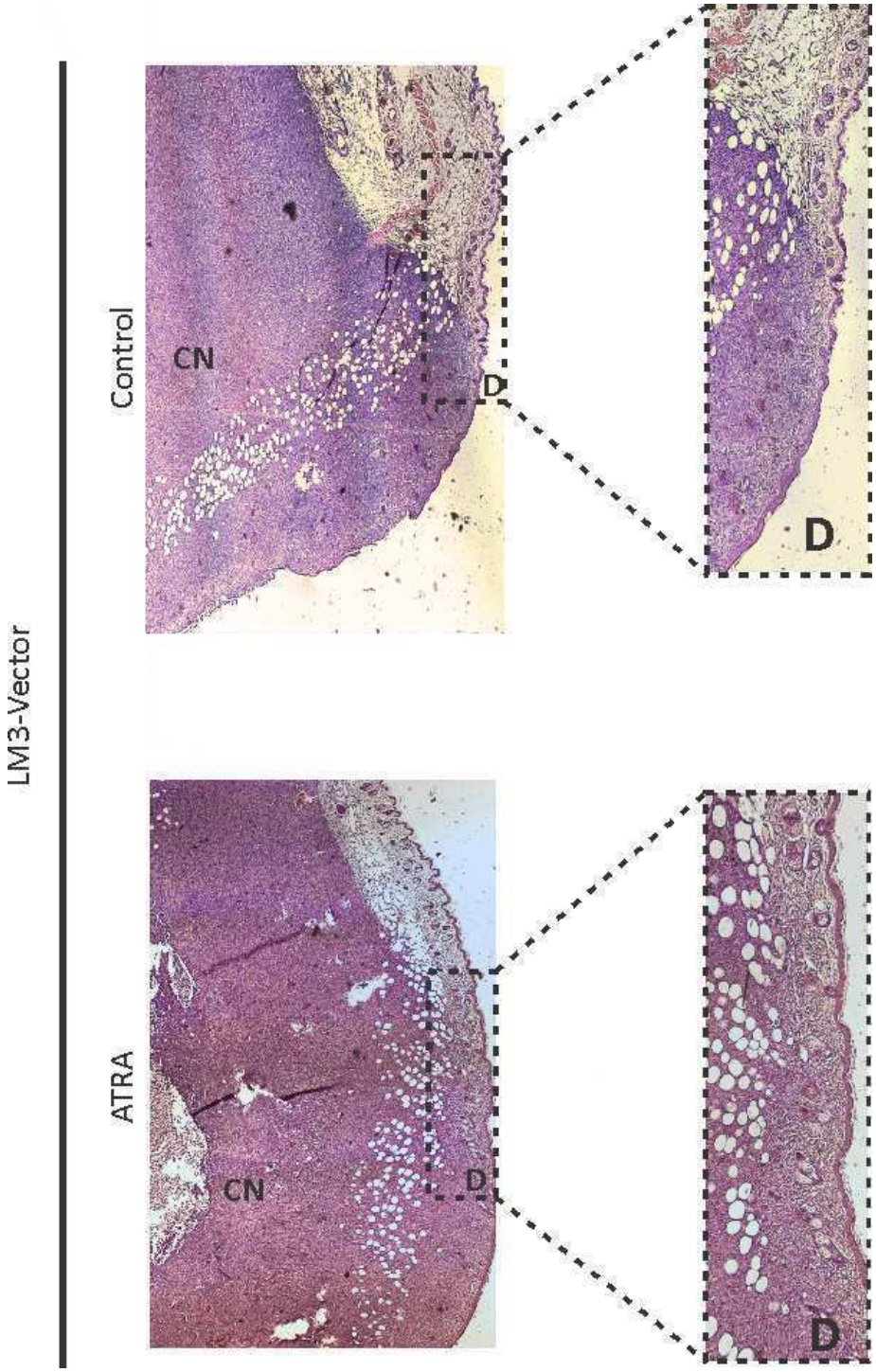


Figura 21: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Cortes histológicos de tumores mamarios teñidos con hematoxilina-eosina, generados a partir de la inoculación de células de la sublínea LM3-Vector en ratones BALB/c sometidos o no al tratamiento con ATRA. CN: Céntro necrótico, D: Dérmis, U: Ulceración de epidermis.

Capitulo II:

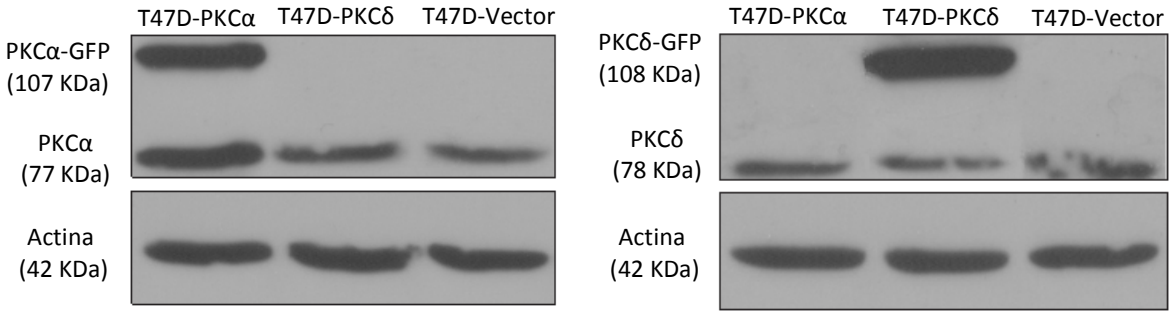
Interacción entre el sistema retinoide y la vía de las PKC en un modelo celular humano

Desarrollo de modelos celulares humanos

La investigación en ratones llevó a grandes avances en el tratamiento de enfermedades complejas, aunque este modelo pre clínico no siempre es fehaciente [105, 106].

Dado los resultados obtenidos en la línea celular murina, que indicarían una interacción entre las vías de PKC y el sistema retinoide que podría ser abordada como punto de intervención terapéutica, decidimos contrastar nuestra hipótesis utilizando modelos celulares humanos.

Para ello se emplearon dos líneas celulares tumorales mamarias humanas con características diferentes, por un lado la línea T47D, positiva para receptor de estrógenos (ER+), y respondedora a al efecto inhibitorio de los retinoides, y por otro lado la MDA-MB231, usualmente utilizada como control negativo en la respuesta al tratamiento retinoide . Estas líneas fueron transfectadas en forma estable para sobreexpresar PKCα o PKCδ, según se describe en materiales y métodos (Fig. 22). A partir de estos modelos se analizó la forma en que la sobreexpresión de distintas isoformas de PKC altera la respuesta al tratamiento con ATRA.



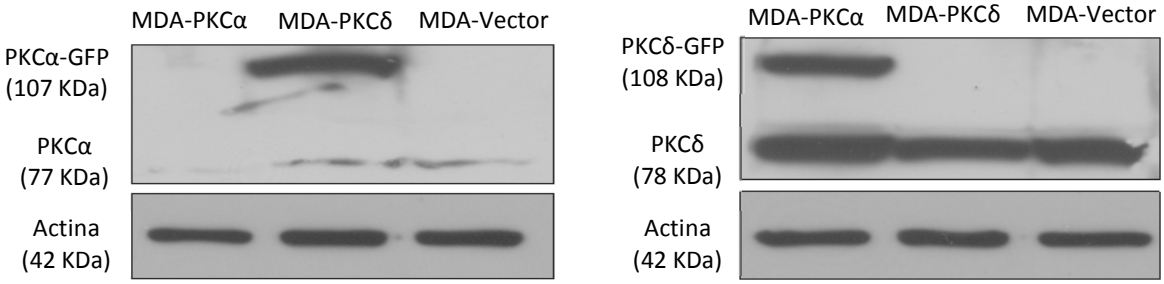


Figura 22: Sobreexpresión de PKCα y PKCδ en células MDA-MB231 y T47D. Los lisados celulares preparados a partir de células MDA-MB231 y T47D transfectadas con pGFPN1-PKCα, pGFPN1-PKCδ o pGFPN1 fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 9% y revelados con anticuerpos contra diferentes isoformas de PKC (50 µg/calle). Las bandas de corresponden a la proteína endógena y a la proteína de fusión con GFP resultado de la sobreexpresión. Se muestra un experimento representativo. Similares resultados se obtuvieron en dos experimentos independientes.

Modelo celular humano respondedor a la terapia retinoidea

Proliferación celular

En primer lugar analizamos la tasa de proliferación de las sublíneas derivadas de la T47D. A diferencia de lo observado en la línea murina, en este caso la sobreexpresión de PKCα no le confiere un aumento en la capacidad proliferativa, no habiendo diferencias entre las sublíneas de T47D (Fig. 23).

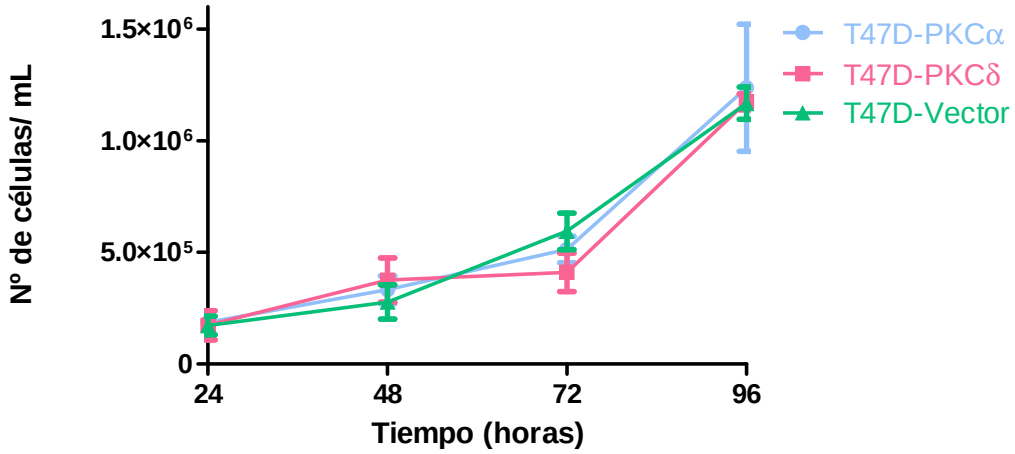


Figura 23: Efecto de PKCα y PKCδ sobre el tiempo de duplicación poblacional. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de

células T47D transfectadas. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado. La figura muestra el resultado de un experimento representativo de tres ensayos independientes (n=3).

Existen evidencias bibliográficas que indican que esta línea celular responde al tratamiento retinoide con una reducción en la tasa proliferativa. Pudimos corroborar que el ATRA produce una disminución significativa de la proliferación a las 96 hs en todas las sublíneas celulares derivadas de T47D (Figs. 24, 25 y 26). Sin embargo, es importante destacar una respuesta mayor y más temprana en las células que sobreexpresan PKCα, siendo el efecto significativo a las 72 hs y manteniéndose en el tiempo (Fig. 25).

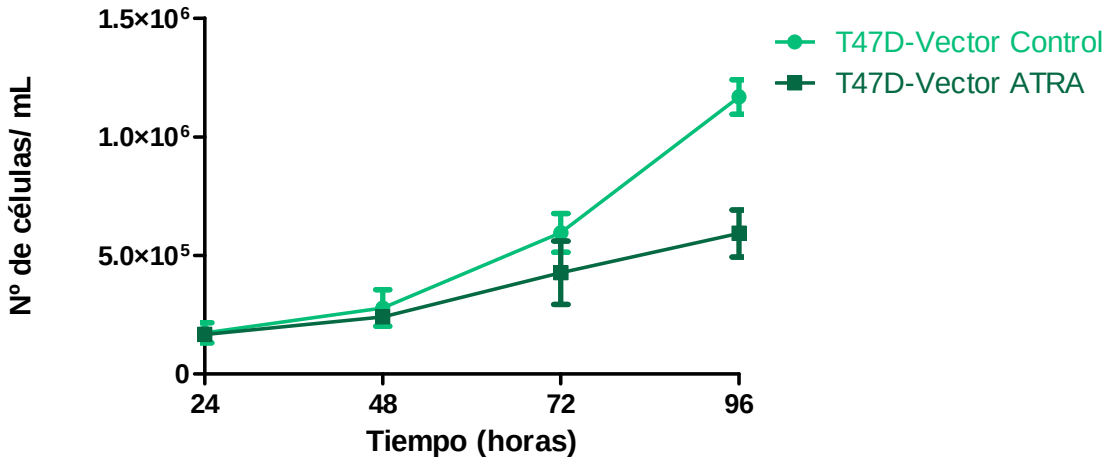


Figura 24: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el tiempo de duplicación poblacional de células T47D-Vector. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células T47D-Vector. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado.*p <0,05 *vs* T47D-Vector tratadas con ATRA (ANOVA test Tukey). La figura muestra el resultado de un experimento representativo de tres ensayos independientes (n=3).

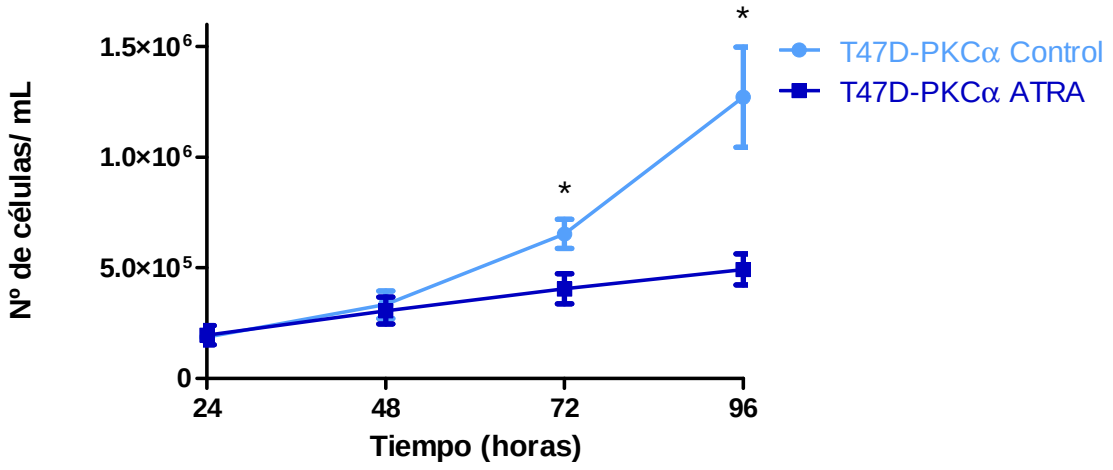


Figura 25: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el tiempo de duplicación poblacional de células T47D-PKCα. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células T47D-PKCα. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado.*p <0,05 *vs* T47D-PKCα tratadas con ATRA (ANOVA test Tukey). La figura muestra el resultado de un experimento representativo de tres ensayos independientes (n=3).

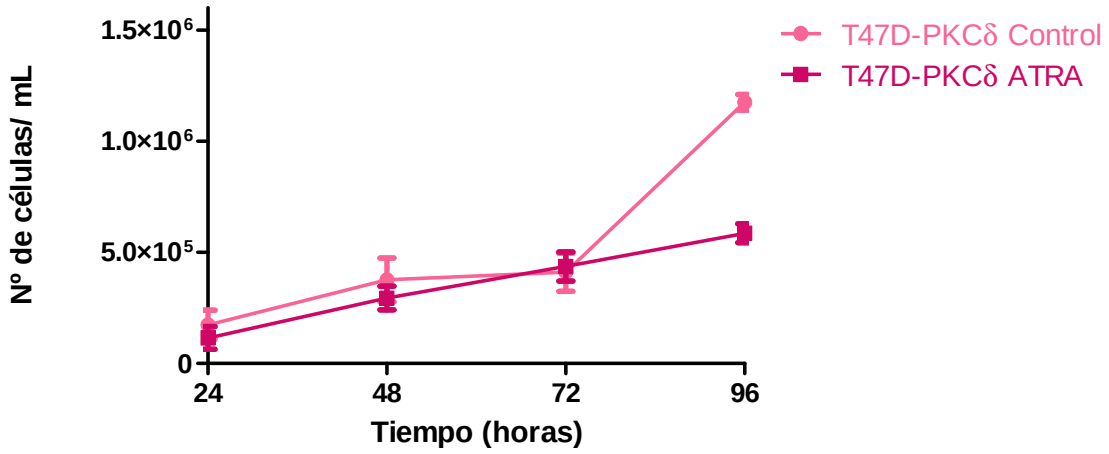


Figura 26: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el tiempo de duplicación poblacional de células T47D-PKCδ. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células T47D-PKCδ. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado.*p <0,05 *vs* T47D-PKCδ tratadas con ATRA (ANOVA test Tukey). La figura muestra el resultado de un experimento representativo de tres ensayos independientes (n=3).

Análisis del ciclo celular

Dado que el tratamiento con ATRA llevó a una reducción de la capacidad proliferativa, quisimos ahondar en el mecanismo que media este fenómeno. Se ha reportado que el ATRA puede inducir apoptosis en ciertos tipos celulares pero, usualmente induce detención del ciclo celular y diferenciación.

Por lo tanto analizamos el estado de fosforilación de ERK y AKT, moléculas de conocida incidencia en la progresión del ciclo celular. Pudimos ver que el estado de fosforilación de ERK no es alterado por el tratamiento con ATRA en ninguna de las sublíneas de T47D. En cambio es notorio el efecto del retinoide en la fosforilación de AKT tanto en la línea control como en las transfectantes (Fig. 27).

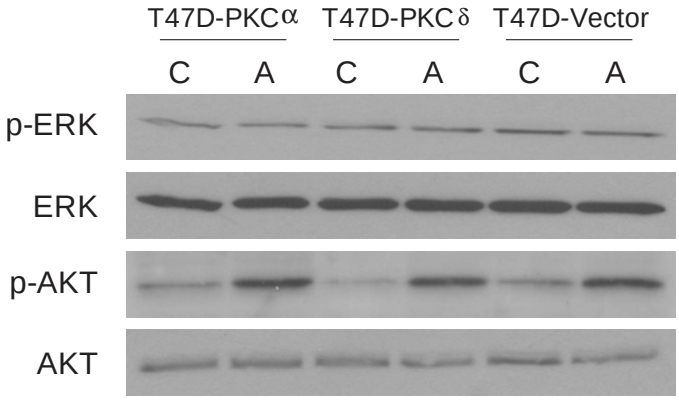


Figura 27: Análisis de los niveles de ERK y AKT fosforilados en células T47D. Los lisados celulares preparados a partir de células T47D-PKCα, T47D-PKCδ y T47D-Vector, tratadas o no (C) con ATRA (A) durante 15 min, fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 9% y revelados con anticuerpos contra ERK o AKT fosforilados utilizando ERK y AKT totales como control de carga respectivamente (50 µg/calle). Se muestra un experimento representativo. Similares resultados se obtuvieron en dos experimentos independientes.

Es ampliamente conocido que AKT está involucrado en el proceso de supervivencia celular, en este sentido cabe destacar que hay fuertes evidencias de que el efecto diferenciador de los retinoides involucra un aumento en la sobrevida [107].

Por otro lado, ni ERK ni AKT explican las diferencias observadas entre las sublíneas de T47D en el ensayo de proliferación. Por lo tanto para determinar fehacientemente si se trata de un arresto del ciclo, llevamos a cabo un análisis del mismo por citometría de flujo con ioduro de propidio como se explicó en la sección de materiales y métodos. En este ensayo pudimos observar un aumento significativo del porcentaje de células que sobreexpresan PKCα en fase G1 cuando son tratadas con ATRA (13% de aumento en fase G1) (Fig. 28), con la contraparte de la disminución del porcentaje de células en las fases S y G2. Si bien la diferencia no es significativa en las fases S y G2 por separado, sí lo es cuando se analizan juntas. Dado que este ensayo se llevó a cabo luego de 72 hs de tratamiento con ATRA, sólo detectamos el arresto del ciclo celular en las T47D-PKCα y no en las células control o T47D-PKCδ.

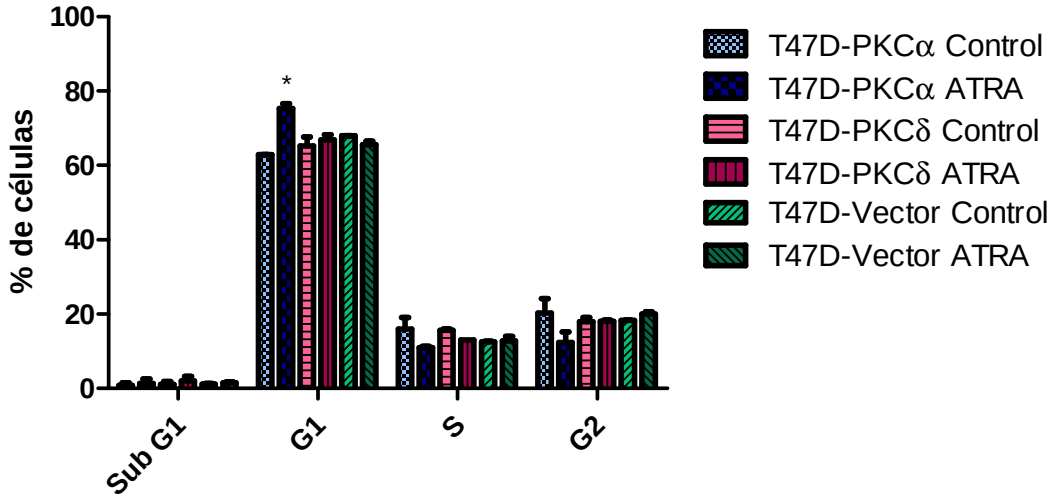


Figura 28: Análisis del ciclo celular en células T47D. Células T47D-PKCα, T47D-PKCδ y T47D-Vector fueron fijadas y teñidas con ioduro de propidio y luego analizadas en citómetro de flujo como se explicó en la sección de materiales y métodos, luego de 72 hs de tratamiento con ATRA. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado.*p <0,05 (ANOVA test Tukey) Se muestra un experimento representativo. Similares resultados se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Análisis de la localización de PKCα por microscopía confocal

Está reportado que las distintas isoformas de PKC llevan a cabo sus funciones en diferentes compartimentos sub-celulares. Un ejemplo de esto detectado por nuestro grupo de trabajo es la translocación de PKCδ a la fracción de membranas mediante la

activación con PMA y al núcleo cuando se aplica el tratamiento con ATRA. En este sentido nos interesó indagar si la mayor respuesta al tratamiento retinoide de las T47D transfectadas con PKCα se debía a la re-localización de la misma.

Dado que el vector utilizado para la transfección genera una proteína de fusión con GFP, utilizamos microscopía confocal para estudiar la ubicación sub-celular de la PKCα (Fig. 29). Como puede observarse la PKCα se distribuye uniformemente en el citoplasma al igual que el GFP de las células control T47D-Vector, sin detectarse cambios luego del tratamiento con ATRA. A fin de comprobar si la PKCα transfectada era funcionalmente activa se realizó un tratamiento con PMA que activa distintas isoformas de PKC translocándolas a membrana. En la Figura 29 se observa que el tratamiento con PMA transloca la proteína PKCα-GFP a la membrana y no así a la GFP sola.

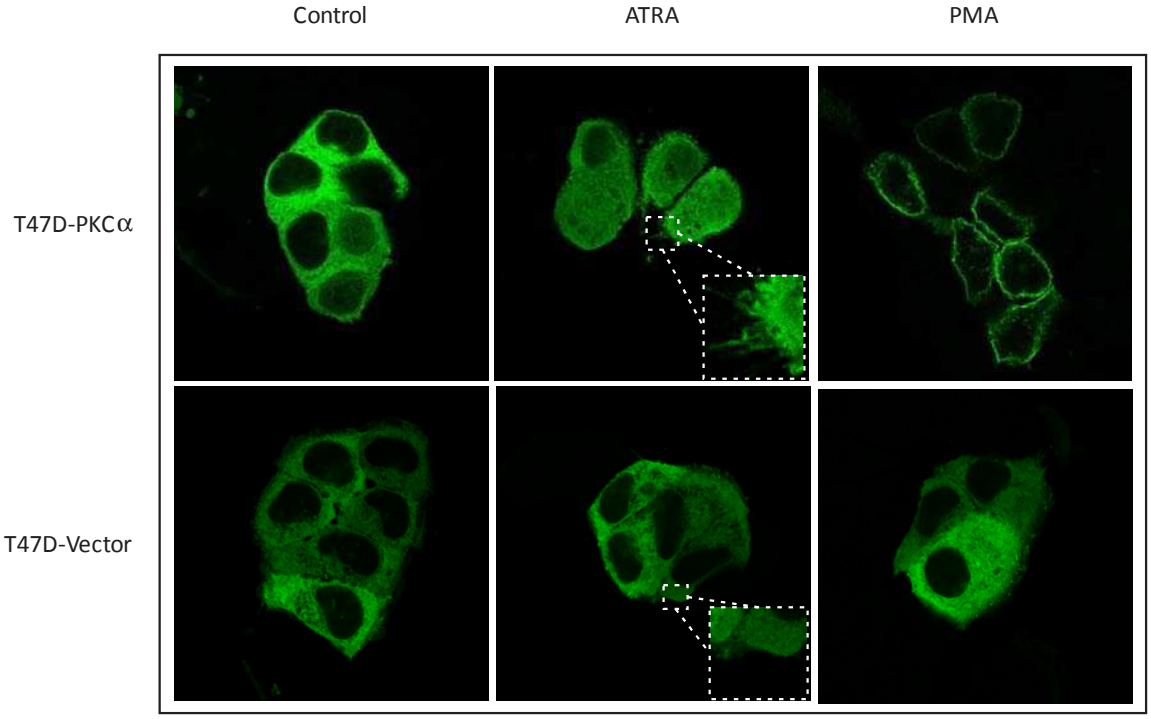


Figura 29: Distribución de las PKCα-GFP en células T47D. Células T47D-PKCα y T47D-Vector fueron fijadas y observadas en microscopio confocal como se explicó en la sección de materiales y métodos luego de 6 hs de tratamiento con ATRA y 15 min de tratamiento con PMA.

Paralelamente notamos que la forma y disposición de las células T47D-PKCα diferían luego del tratamiento con ATRA, volviéndose más aplanadas y con prolongaciones del tipo de

lamelipodios. Para confirmar este resultado llevamos a cabo un análisis de los puntos de adhesión focal, mediante tinción por inmuno fluorescencia de β1 integrina (Fig. 30).

Pudimos observar que en las células control, tratadas o no con ATRA, no existen diferencias en la formación de puntos focales. En cambio, en las células T47D-PKCα vemos un aumento en la cantidad de puntos de adhesión focal luego del tratamiento con ATRA.

Observando las células en una rotación de 90°, pudimos detectar que tanto en las células control como en las transfectadas con PKCα, el tratamiento con ATRA cambia la distribución de la β1 integrina, acumulándose en la cara celular en contacto con la superficie, siendo más marcado en las células que sobreexpresan PKCα.

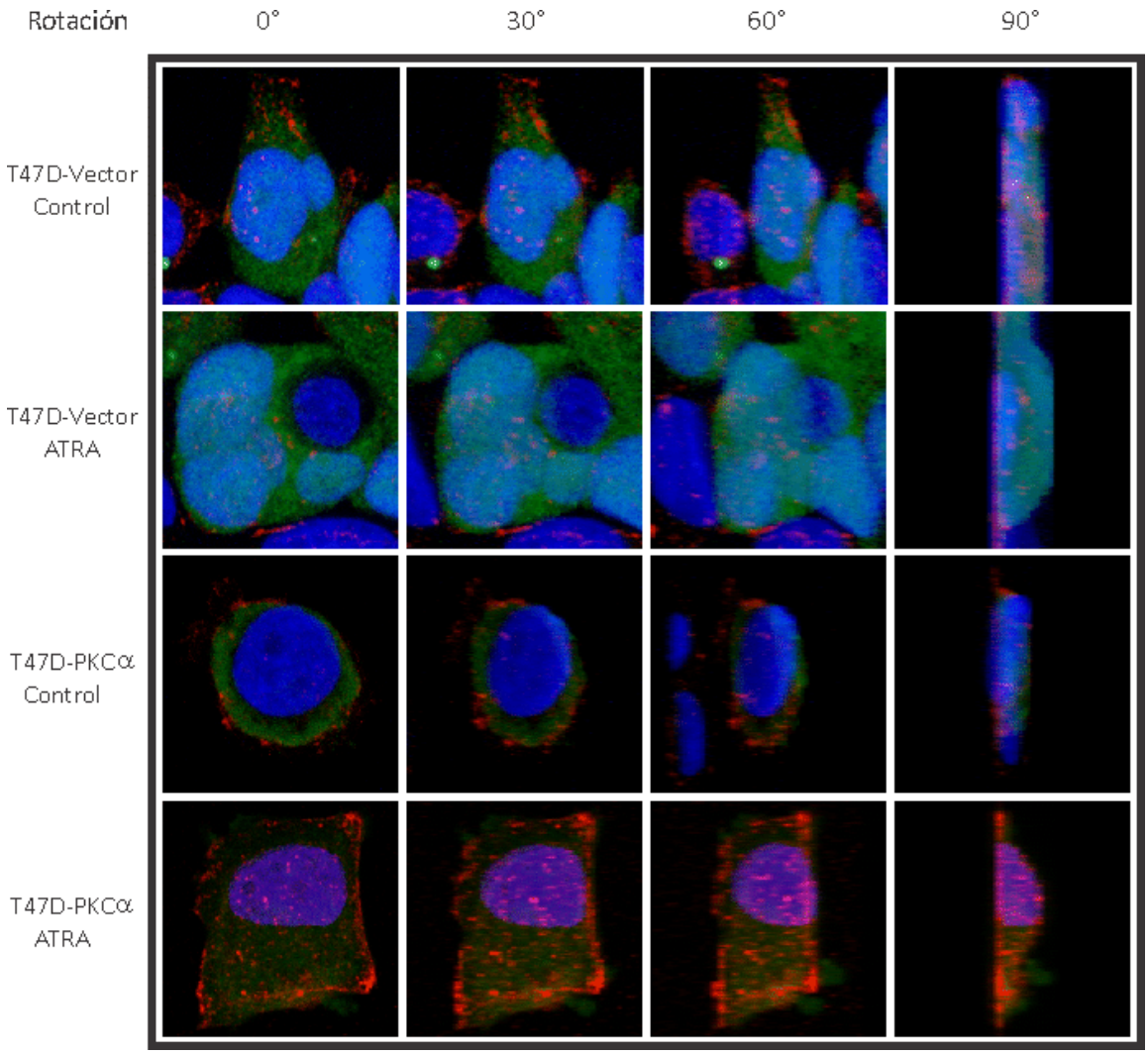


Figura 30: Formación de puntos de adhesión focal en células T47D. Células T47D-PKCα y T47D-Vector fueron teñidas para β1 integrina por inmuno fluorescencia fijadas y observadas en microscopio confocal como se explicó en la sección de materiales y métodos.

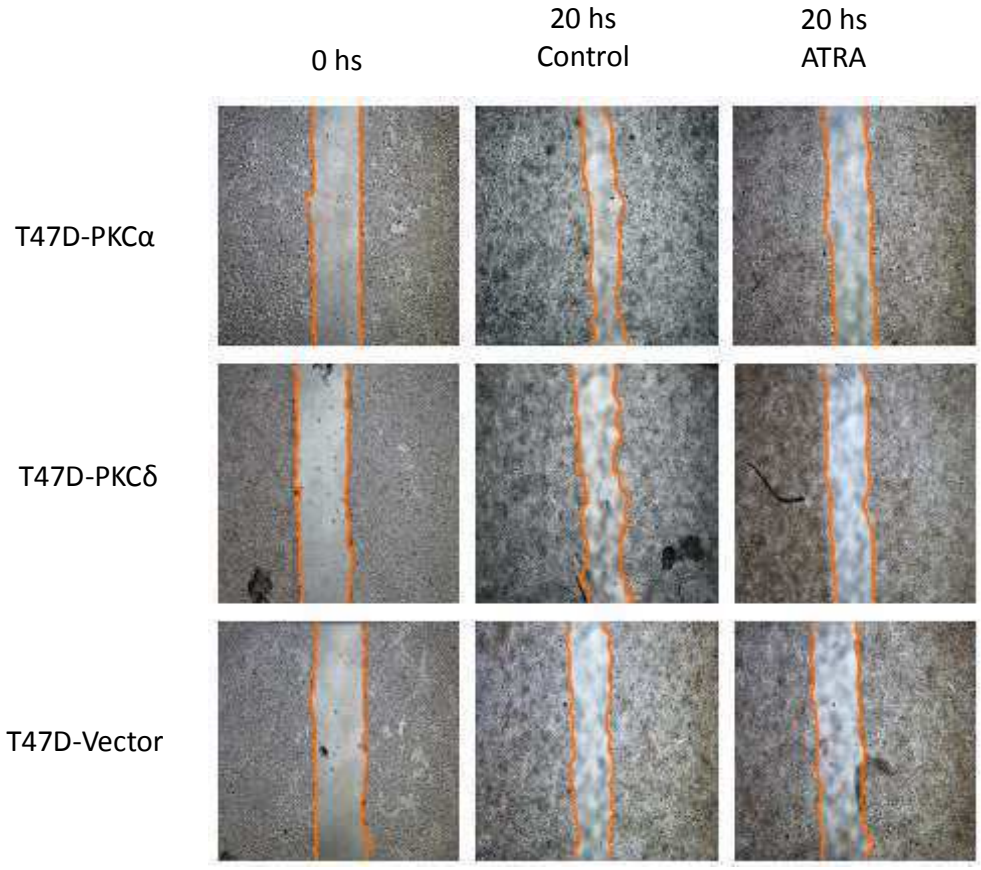
Como analizaremos más adelante en la discusión, la mayor adherencia al sustrato por parte de las células podría implicar un menor potencial proliferativo.

Migración celular

Entre los factores involucrados en la diseminación metastásica, decidimos analizar en primera instancia la capacidad migratoria de las sublíneas de T47D a fin de determinar si la sobreexpresión de las distintas isoformas de PKC afecta la respuesta al tratamiento con ATRA.

Mediante el ensayo de "cicatrización de herida", pudimos determinar que tanto la línea control como la que sobreexpresa PKCα responden al tratamiento retinoide disminuyendo significativamente la capacidad migratoria (Fig. 31). En cambio no se observan diferencias en la línea T47D-PKCδ cuando la misma es tratada con ATRA.

A.



B.

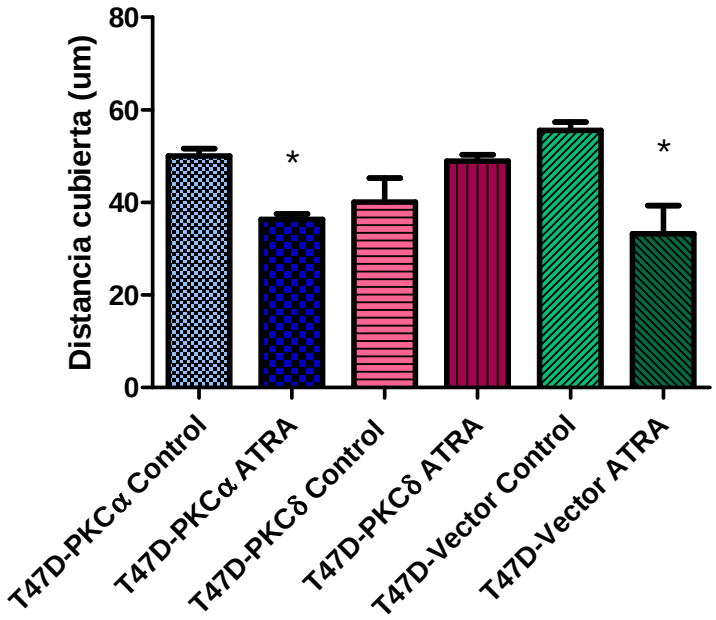


Figura 31: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la capacidad migratoria de células que sobreexpresan distintas isoformas de PKC. Monocapas subconfluentes de las líneas celulares T47D-PKCα, T47D-PKCδ, T47D-Vector fueron "heridas" a tiempo 0 permitiendo que las células migraran hacia el área libre de células por 20 hs en presencia o no del tratamiento retinoide. El mismo campo fue fotografiado a tiempo 0 y 20 hs (Panel A). La migración celular fue cuantificada calculando el área ocupada por las células migratorias respecto al área original libre de células. Los datos en el panel B corresponden a la media ± D.S. (n=4). *p<0,05 *vs* misma línea celular sin tratar (control). (ANOVA). Los resultados son representativos de tres ensayos independientes.

Actividad proteolítica secretada e invasión:

Tal como se analizara en el modelo murino LM3, el siguiente paso fue estudiar la producción de MMPs y la capacidad invasiva, factores también implicados en la diseminación metastásica. Las células T47D no mostraron una actividad de MMP detectable y un potencial invasivo casi nulo, tal como lo reportaron otros autores [108]. Por esta razón, resultó imposible detectar diferencias que permitieran establecer el rol tanto de la sobreexpresión de las PKC como del tratamiento con ATRA en estos eventos celulares.

Modelo celular humano no respondedor a la terapia retinoidea

Proliferación celular

En primer lugar buscamos analizar si la capacidad proliferativa de esta línea se ve afectada por la sobreexpresión de distintas isoformas de PKC. No obtuvimos diferencias significativas. Así tanto la línea que sobreexpresa PKCα como la que sobreexpresa PKCδ presentaron la misma tasa de proliferación que la línea control (Fig. 32).

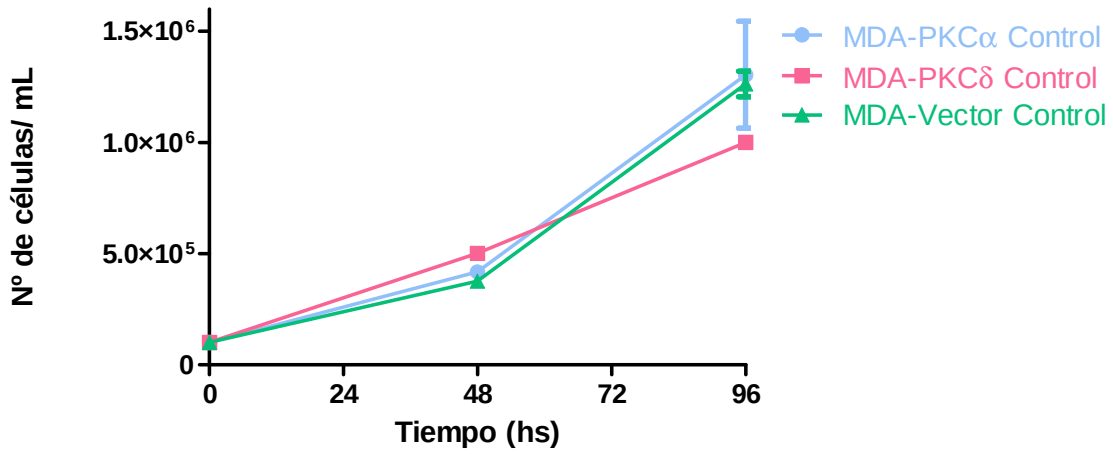


Figura 32: Efecto de PKCα y PKCδ sobre el tiempo de duplicación poblacional. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células MDA-MB231 transfectadas. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado. La figura muestra el resultado de un experimento representativo de tres ensayos independientes (n=3).

Por otro lado quisimos determinar, al igual que en los demás modelos celulares analizados, LM3 y T47D, alguna de las isoformas de PKC sobreexpresadas sensibiliza a las células al tratamiento con ATRA. Los resultados obtenidos indican que ni PKCα ni PKCδ afectaron la tasa de crecimiento de las células MDA-MB231 en respuesta al tratamiento retinoide. Es importante destacar que está descripto bibliográficamente que este modelo celular presenta alta resistencia a los efectos citostáticos y diferenciadores del ATRA [109] (Fig. 33, 34 y 35).

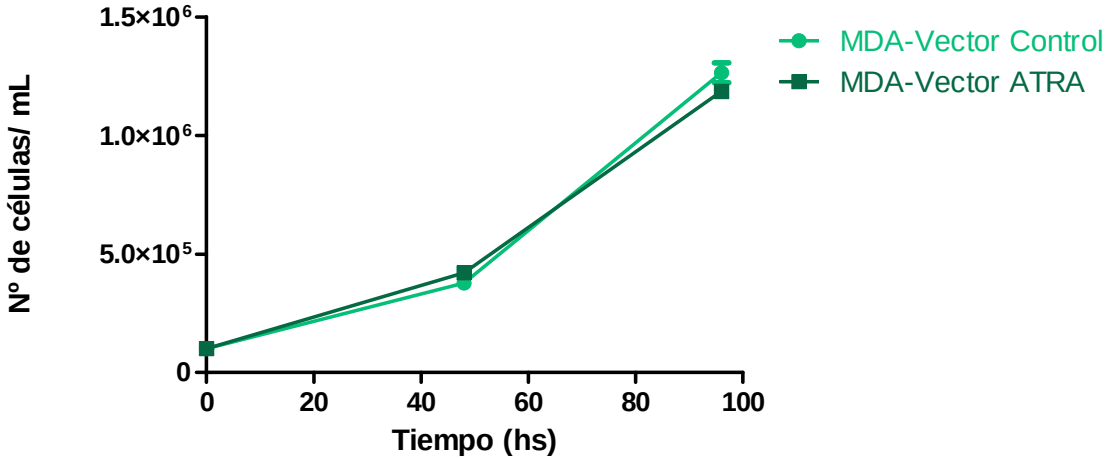


Figura 33: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el tiempo de duplicación poblacional de células MDA-Vector. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células MDA-Vector. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado. La figura muestra el resultado de un experimento representativo de dos ensayos independientes (n=3).

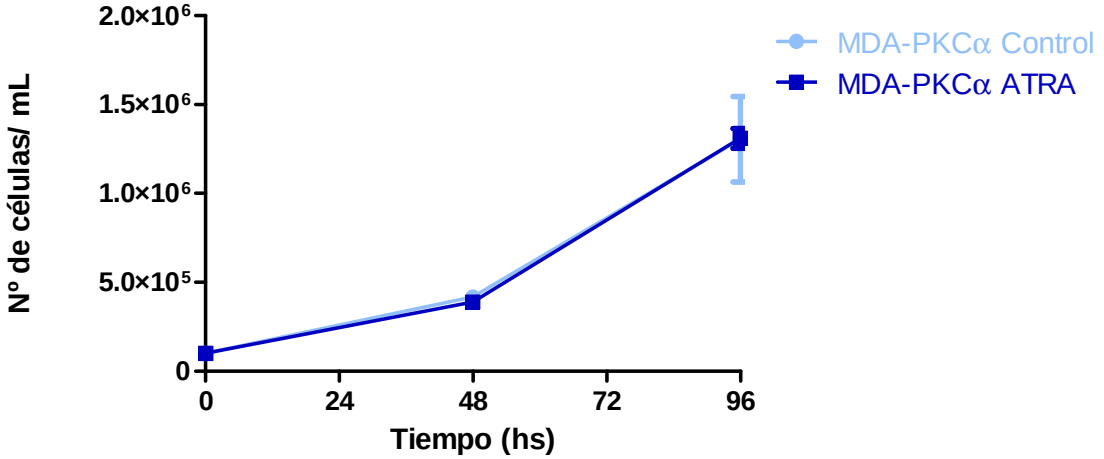


Figura 34: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el tiempo de duplicación poblacional de células MDA-PKCα. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células MDA-PKCα. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado. La figura muestra el resultado de un experimento representativo de dos ensayos independientes (n=3).

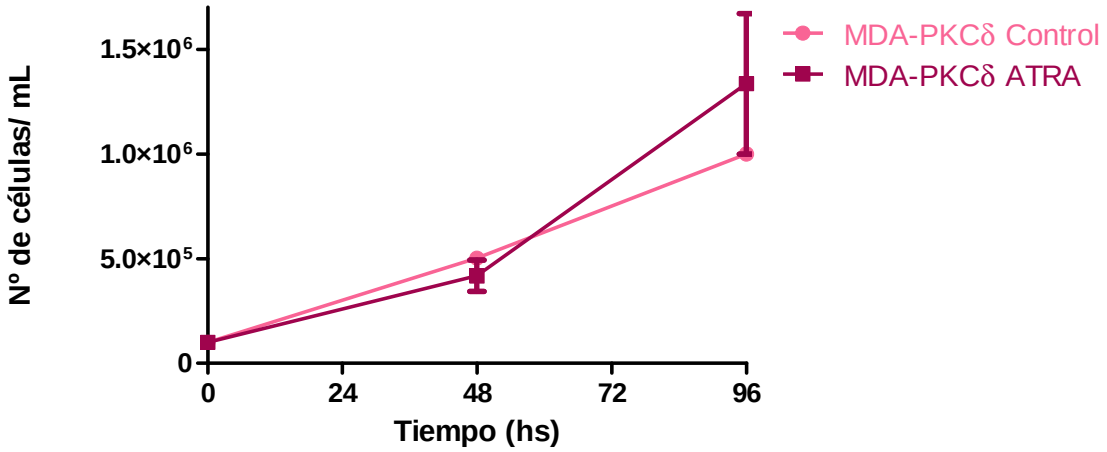
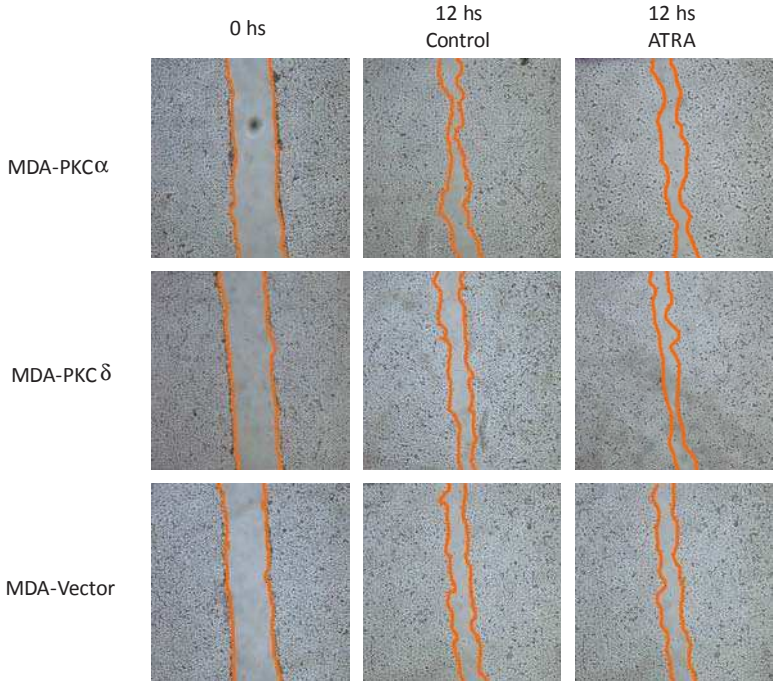


Figura 35: Efecto del tratamiento con ATRA sobre el tiempo de duplicación poblacional de células MDA-PKCδ. El número de células se evaluó a diferentes tiempos durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos no-sincronizados de células MDA-PKCδ. Cada punto representa la media ± D.S. de determinaciones realizadas por triplicado. La figura muestra el resultado de un experimento representativo de dos ensayos independientes (n=3).

Migración celular

Mediante el análisis de la capacidad migratoria de estas sublíneas celulares pudimos determinar que no hay un efecto significativo dependiente de la sobreexpresión de cada isoforma de PKC ni de la respuesta al tratamiento con ATRA (Fig. 36). Solo podemos destacar que la tasa migratoria de las células MDA-MB231 fue superior a la de la línea T47D.

A.



B.

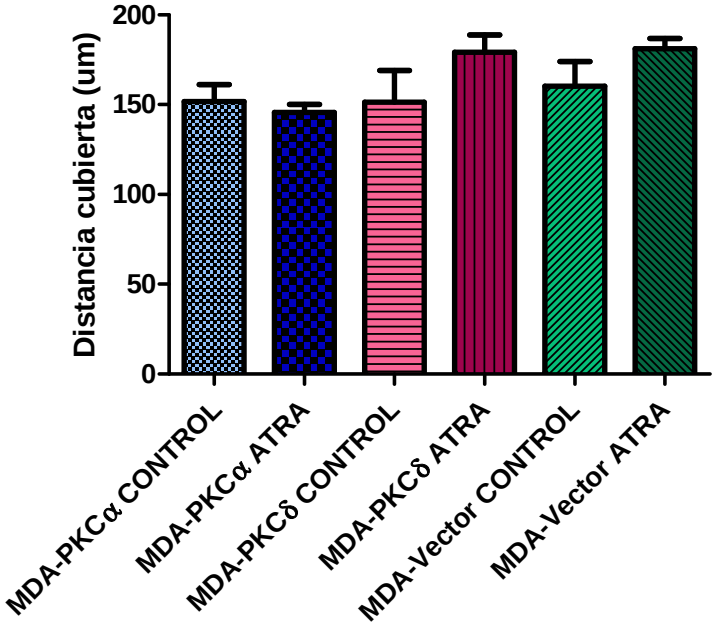


Figura 36: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la capacidad migratoria de células que sobreexpresan distintas isoformas de PKC. Monocapas subconfluentes de las líneas celulares MDA-PKCα, MDA-PKCδ, MDA-Vector fueron "heridas" a tiempo 0 permitiendo que las células migraran hacia el área libre de células por 12 hs en presencia o no del tratamiento retinoide. El mismo campo fue fotografiado a tiempos 0 y 12 hs (panel A). La migración celular fue cuantificada calculando el porcentaje de área ocupada por las células migratorias respecto al área original libre de células (panel B). Los datos en el panel B corresponden a la media ± D.S. (n=4). Los resultados son representativos de dos ensayos independientes.

Actividad proteolítica secretada

Con la intención de analizar los procesos involucrados en la cascada metastásica estudiamos la actividad proteolítica secretada de MMP2 y MMP9 mediante zimografía. En primer lugar quisimos examinar si la sobreexpresión de alguna de las isoformas de PKC afecta dicha actividad. Como se observa en la Fig. 37 la actividad de MMP-2 se ve significativamente reducida por sobreexpresión de PKCδ.

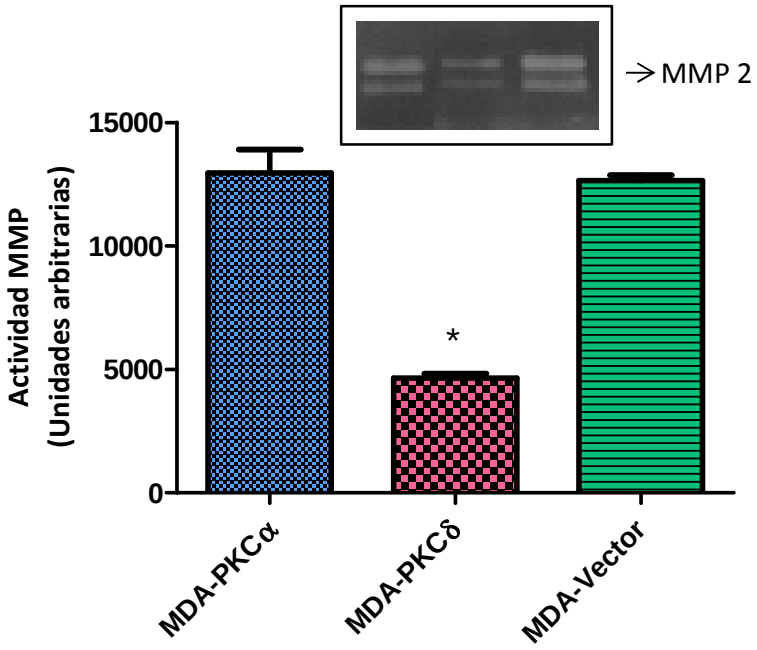


Figura 37: Efecto de la sobreexpresión de PKCα y PKCδ sobre la actividad de MMP-2 secretada. La actividad de MMP-2 fue analizada mediante zimografía utilizando MC de cultivos de células MDA transfectadas con PKCα, PKCδ o Vector. Las bandas de lisis fueron cuantificadas como describió en la sección materiales y métodos. Los datos están expresados como la media ± D.S. (n=3), son representativos de dos ensayos independientes, *p<0,05 *vs* células control (ANOVA).

Por otro lado, al analizar el efecto del tratamiento con ATRA en las tres sublíneas pudimos determinar que el tratamiento retinoide no produce cambios en la actividad proteolítica secretada ni en la línea control, ni en las líneas que sobreexpresan las distintas PKC (Fig. 38).

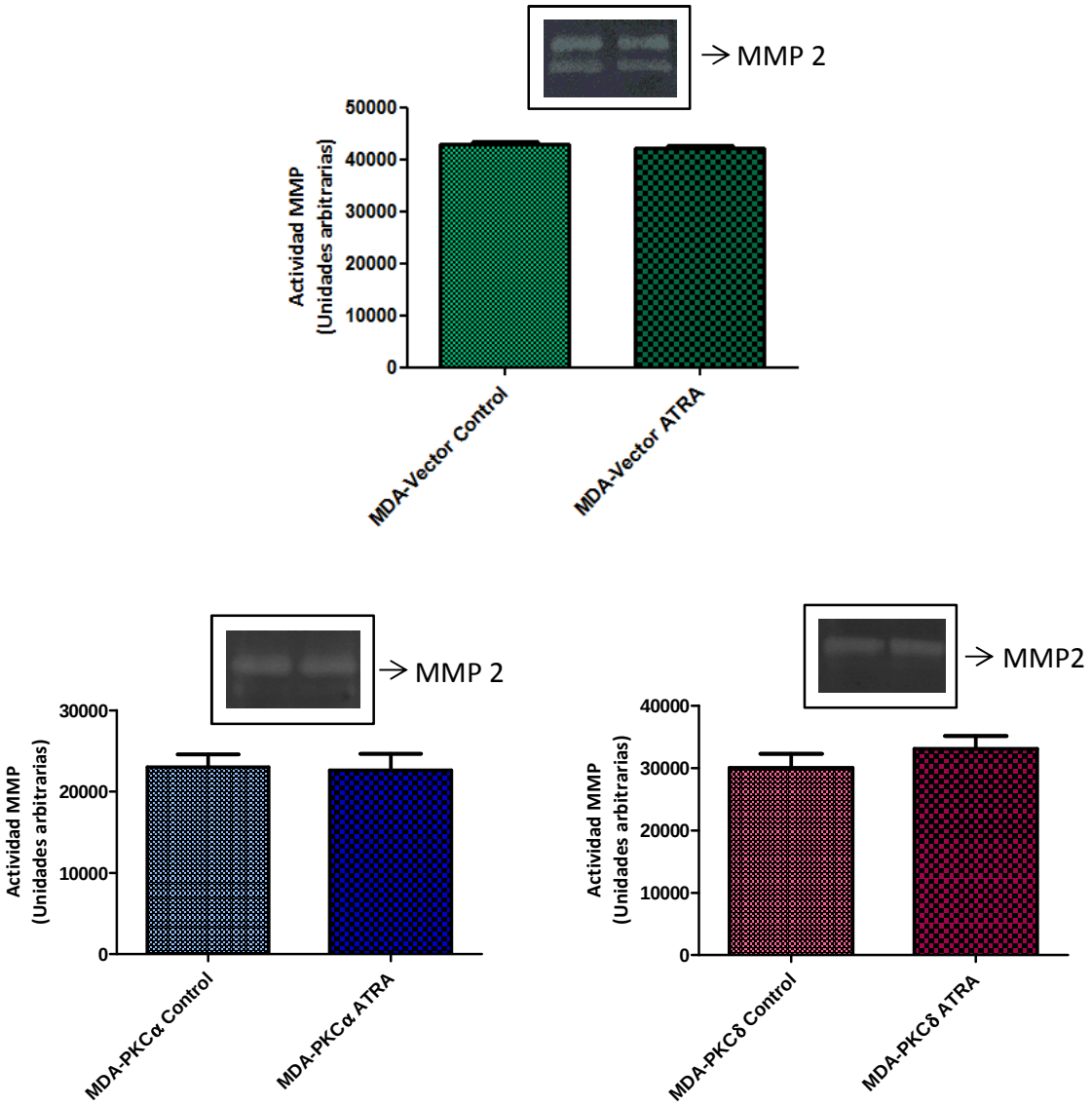


Figura 38: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la actividad de MMP-2 secretada. La actividad de MMP-2 fue analizada mediante zimografía utilizando MC de cultivos de células MDA-PKCα, MDA-PKCδ y MDA-Vector tratadas o no con ATRA. Las bandas de lisis fueron cuantificadas como se describió en la sección materiales y métodos. Los datos están expresados como la media ± D.S. (n=3) y son representativos de dos ensayos independientes.

Invasión celular

Dados los resultados obtenidos en relación a la actividad proteolítica secretada, resultó interesante indagar en la capacidad invasiva de estas células tumorales. Mediante ensayos

con cámaras transwell pudimos observar que la línea MDA-PKCδ presentó una capacidad invasiva significativamente menor que la de la línea control (Fig. 39), lo que concuerda con lo obtenido en el análisis de la actividad proteolítica secretada.

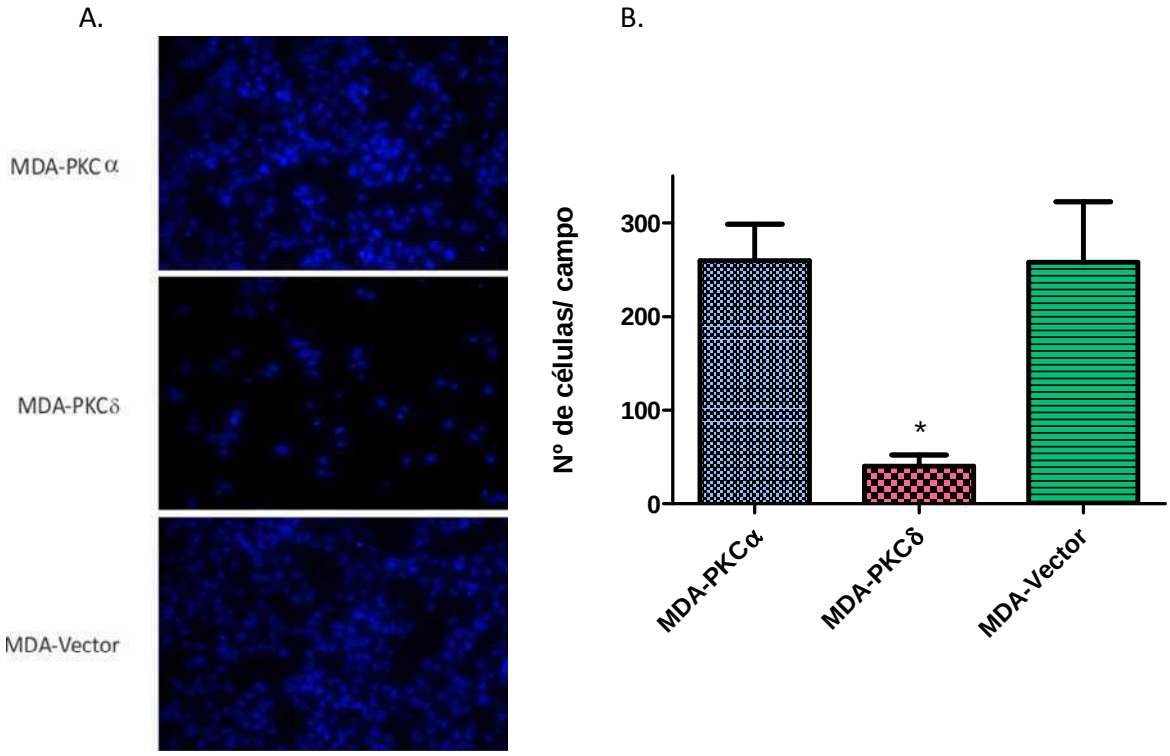


Figura 39: Efecto de la sobreexpresión de PKCα o PKCδ sobre la capacidad invasiva. La capacidad invasiva de las células MDA-PKCα, MDA-PKCδ y MDA-Vector fue analizada utilizando cámaras transwell recubiertas con Matrigel. Las células fueron fijadas, teñidas con DAPI y observadas en microscopio de fluorescencia (Panel A). Se cuantificaron células de 10 campos al azar como se describió en la sección materiales y métodos. Los datos están expresados como la media ± D.S. (n=3) y son representativos de dos ensayos independientes (Panel B), *p<0,05 *vs* células MDA-Vector (ANOVA test de Tukey).

Al no detectarse efectos del ATRA en la actividad proteolítica secretada (al igual que en las demás características *in vitro* evaluadas), decidimos no analizar el afecto del retinoide en los ensayos de invasión.

Crecimiento 3D en Matrigel

La mayoría de los estudios realizados *in vitro* se llevan a cabo en cultivos celulares en monocapa sobre una superficie plástica. Esta forma de cultivo no reproduce la anatomía y

fisiología de un tejido, lo que impide el estudio de ciertas características observadas *in vivo*. Se ha demostrado que las señales de la matriz extracelular son fundamentales en el establecimiento de las características tisulares de las líneas celulares, ya sean de estirpe normal como provenientes de tumores.

Estudios anteriores en células de mama [110] han demostrado que la forma de organización de las células cuando crecen en cultivo en 3D en Matrigel está estrechamente ligada a la malignidad de dichas líneas celulares, estableciendo que las líneas epiteliales de mama no malignas forman colonias redondeadas de células polarizadas y crecimiento reducido. En tanto las líneas de fenotipo maligno forman estructuras desorganizadas, con elongaciones que invaden la matriz.

Dado que la sobreexpresión de distintas isoformas de PKC en células MDA-MB231 modificó características asociadas con la invasividad, decidimos estudiar su comportamiento en un ambiente que reproduzca las interacciones célula-célula y célula-matriz observadas *in vivo*. Para ello cultivamos las células de las tres sublíneas en extracto de membrana basal como se desarrolló en la sección de materiales y métodos.

El resultado obtenido demuestra que tanto la línea control como la que sobreexpresa PKCα crecen formando colonias con una morfología estrellada, desorganizada y con proyecciones celulares que invaden la matriz adyacente (Fig. 40), lo que es característico en células de alto grado de malignidad.

Por otro lado, las células MDA-PKCδ formaron colonias más redondeadas y si bien no pudimos apreciar la presencia de lumen, las mismas son más organizadas e incapaces de invadir la matriz (Fig. 40).

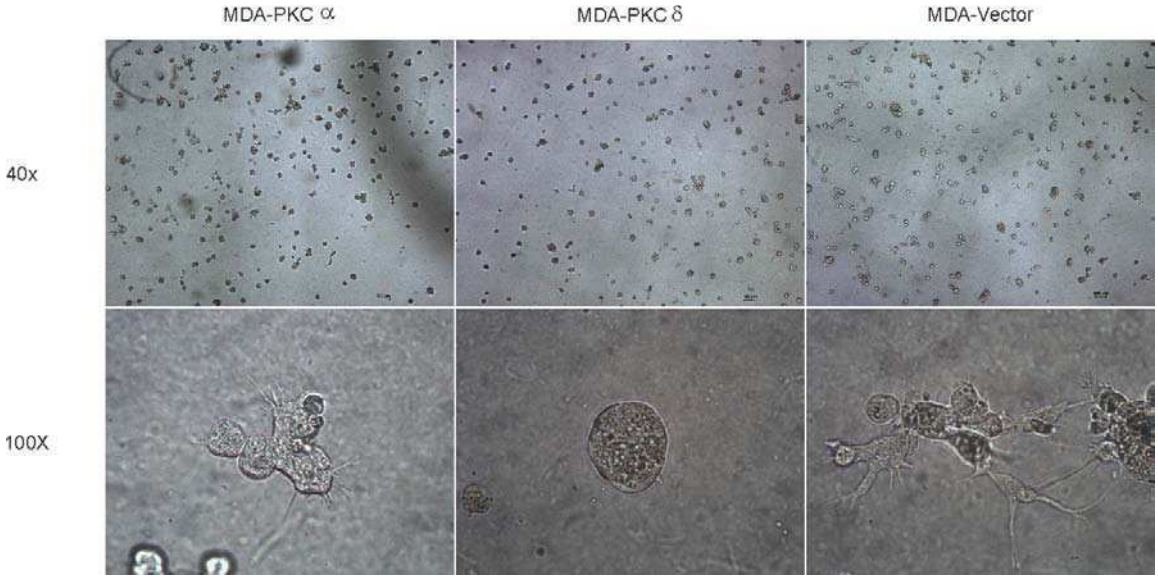


Figura 40: Efecto de la sobreexpresión de PKCα y PKCδ sobre el crecimiento 3D en Matrigel. Se evaluó el crecimiento de células MDA-PKCα, MDA-PKCδ y MDA-Vector sobre una superficie cubierta con Matrigel (coating) tal como se describe en la sección de materiales y métodos.

Capitulo III:

Regulación transcripcional del ácido retinoico en células de mama humanas

Actividad de los sitios RARE

A fin de comprender los mecanismos asociados a la respuesta diferencial de las líneas humanas al ácido retinoico, nos propusimos estudiar si existen diferencias a nivel transcripcional de los genes blanco del ácido retinoico.

Los retinoides viajan al núcleo para unirse a los receptores nucleares RARs, los cuales a la vez se unen a los elementos respondedores al RA (RAREs) en los genes blanco [83]. Dado que el tratamiento con ATRA afectó de forma diferencial a las células T47D que sobreexpresan distintas isoformas de PKC, produciendo un arresto del ciclo celular más rápida y contundentemente en las T47D-PKCα, quisimos estudiar si la regulación de los sitios RARE estaba involucrada. Para ello, se transfectaron células de las 3 sublíneas de T47D con una construcción RARE-Luciferasa y se las sometió al tratamiento con ATRA o DMSO como control.

Como era de esperarse el tratamiento con ATRA aumentó en todas las líneas celulares la actividad de los sitios RARE (Fig. 41). Pero no se detectaron diferencias significativas entre las sublíneas de T47D.

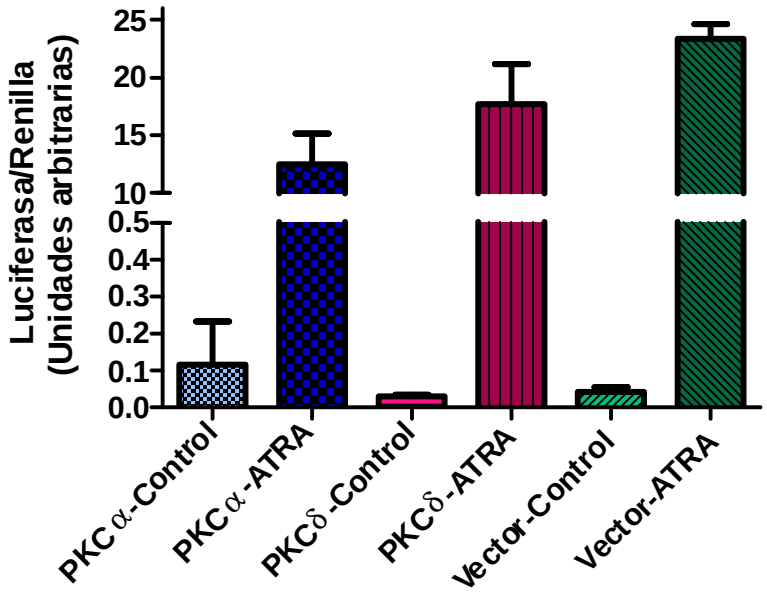


Figura 41: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la actividad de los sitios RARE. La actividad de RARE fue analizada mediante ensayo de actividad luciferasa utilizando una construcción RARE-Luc. La actividad luciferasa es expresada en Unidades Arbitrarias (UA). Se muestra un experimento representativo de tres independientes (n=3). * p<0,05 *vs* células de la misma sublínea sin tratamiento (control). ANOVA test de Tukey.

Si bien en las células MDA-MB231 no pudimos detectar ningún efecto biológico modulado por el ATRA, nos propusimos analizar a qué nivel se ve truncada la acción del retinoide.

A fin de conocer si los receptores de ácido retinoico son funcionales en estas células y al mismo tiempo si son afectados por la sobreexpresión de PKCα o PKCδ, llevamos a cabo el ensayo de genes reporteros con el plásmido conteniendo el constructo RARE-Luciferasa antes mencionado.

El resultado obtenido demuestra que los receptores nucleares retinoides son funcionales, resultando en una activación de los sitios RARE cuando las células son tratadas con ATRA (Fig. 42). Por otro lado, se pudo observar que la sobreexpresión de las distintas isoformas de PKC no altera la respuesta al tratamiento.

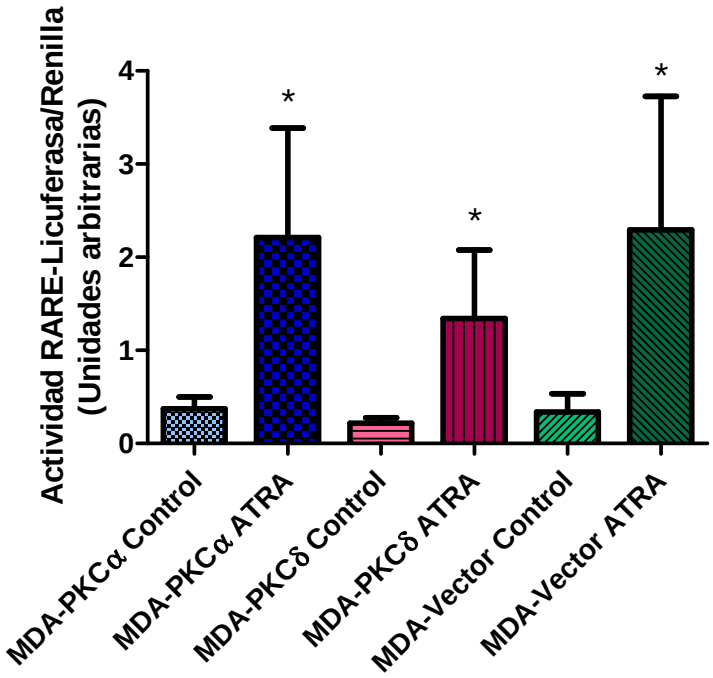


Figura 42: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la actividad de los sitios RARE. La actividad de RARE fue analizada mediante ensayo de actividad luciferasa utilizando una construcción RARE-Luc. La actividad luciferasa es expresada en Unidades Arbitrarias (UA). Se muestra un experimento representativo de tres independientes (n=3). * $p<0,05$ *vs* células de la misma sublínea sin tratamiento (control). ANOVA test de Tukey.

Actividad de los sitios AP-1

El factor de transcripción AP-1 está involucrado en un gran rango de procesos celulares entre los que se encuentran proliferación celular, muerte, sobrevida y diferenciación.

Estudios anteriores [111] han revelado que existe una relación entre la acción de los retinoides y la actividad de los sitios AP-1. En este sentido se ha reportado que el ácido retinoico produce una trans-represión de dichos sitios.

Con la finalidad de analizar si la respuesta al ATRA observada en las sublíneas de T47D se podría explicar en parte por la trans-represión de AP-1, se llevó a cabo un ensayo de genes reporteros utilizando un plásmido conteniendo la secuencia de AP1 asociada al gen de la luciferasa. El resultado obtenido demuestra que el tratamiento retinoide induce una disminución significativa de la actividad de los sitios AP-1 (Fig. 43), sin embargo no se observan diferencias entre las sublíneas.

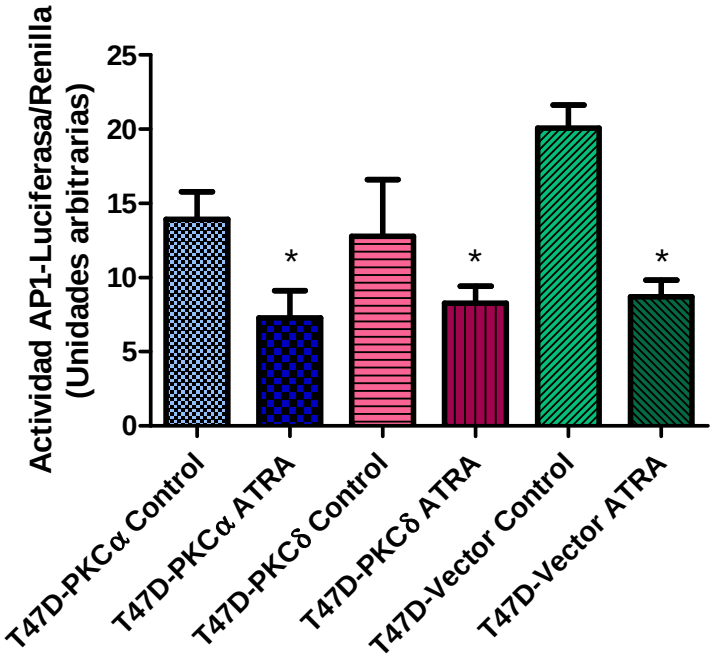


Figura 43: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la actividad de los sitios AP-1. La actividad de AP-1 fue analizada mediante ensayo de actividad luciferasa en las sublíneas de T47D, utilizando una construcción AP1-Luc. La actividad luciferasa es expresada en Unidades Arbitrarias (UA). Se muestra un experimento representativo de tres independientes (n=3). * $p<0,05$ *vs* células de la misma sublínea sin tratamiento (control). ANOVA test de Tukey.

Por otro lado se llevó a cabo el mismo ensayo en las sublíneas derivadas de MDA-MB231. Pudimos observar que ninguna de las sublíneas de MDA-MB231 presenta una disminución en la actividad de los sitios AP-1 cuando son expuestas al retinoide (Fig. 44). Esto sugiere que la falta de respuesta de esta línea celular al tratamiento retinoide podría deberse en parte a la falta de la trans-represión de los sitios AP-1.

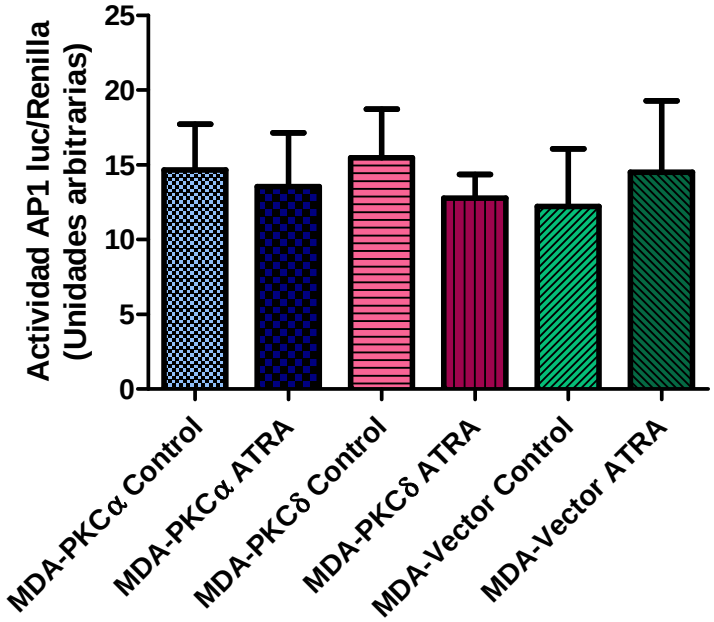


Figura 44: Efecto del tratamiento con ATRA sobre la actividad de los sitios AP-1. La actividad de AP-1 fue analizada mediante ensayo de actividad luciferasa en las sublíneas de MDA-MB231, utilizando una construcción AP1-Luc. La actividad luciferasa es expresada en Unidades Arbitrarias (UA). Se muestra un experimento representativo de tres independientes (n=3).

Regulación de la transcripción de los receptores retinoides

Tanto la activación de sitios RARE como la trans-represión de los sitios AP-1, luego del tratamiento con ATRA, son eventos dependientes de los niveles de expresión de los receptores retinoideos. Por lo tanto el siguiente paso fue analizar la modulación de dichos receptores ante al tratamiento con ATRA, tanto en las líneas celulares que responden al tratamiento como en las que no lo hacen.

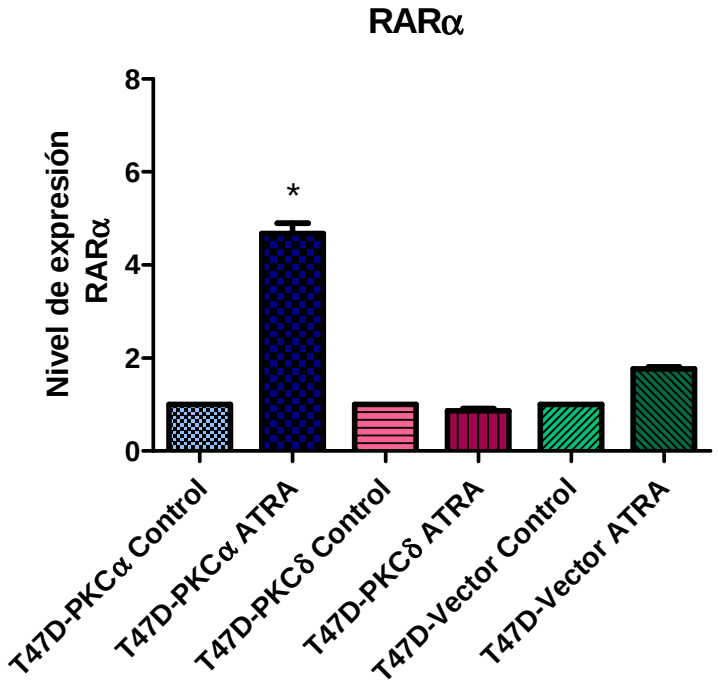
Se llevaron a cabo PCRs en tiempo real de las distintas isoformas de los receptores. En primer lugar se analizó el receptor RARα, propuesto como el principal receptor involucrado en los efectos citostáticos del ATRA. En ambas líneas tumorales mamarias humanas la sobreexpresión de PKCα indujo un aumento significativo del nivel de expresión de RARα frente al tratamiento con ATRA (Fig. 45).

Este resultado es concordante con lo observado previamente en la línea T47D (Fig. 25), en donde el tratamiento retinoideo tiene un mayor efecto citostático en las células que sobreexpresan PKCα. Por otro lado no se corresponde con lo observado en la línea MDA-MB231, presumiblemente por la falta de trans-represion de AP-1.

Al analizar la isoforma β de los receptores retinoicos, pudimos observar que todas las sublíneas de T47D responden al ATRA aumentando la transcripción del mismo. Por el contrario, en las MDA-MB231 observamos que ninguna de las sublíneas sufre un aumento en la transcripción de RARβ (Fig. 46).

Esto resulta muy interesante ya que en bibliografía se reporta que dicha isoforma es la que estaría involucrada en la trans-represión de los sitios AP-1.

Por último estudiamos RARγ en ambas líneas celulares. Pudimos detectar un aumento significativo en la transcripción de esta isoforma ante el tratamiento con ATRA en las T47D, no así en las MDA-MB231 (Fig. 47).



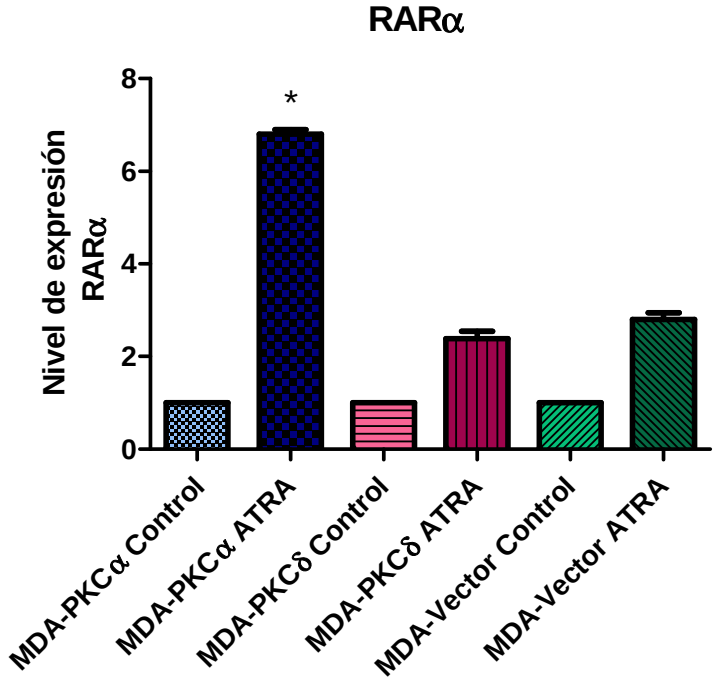


Figura 45: Efecto del tratamiento con ATRA sobre los niveles de RARα. Los niveles del receptor retinoide RARα fueron analizados por PCR en tiempo real en las sublíneas derivadas de T47D y MDA-MB231 con o sin tratamiento con ATRA. Se muestra un experimento representativo de tres independientes (n=3). * $p<0,05$ *vs* células de la misma sublínea sin tratamiento (control). ANOVA test de Tukey.

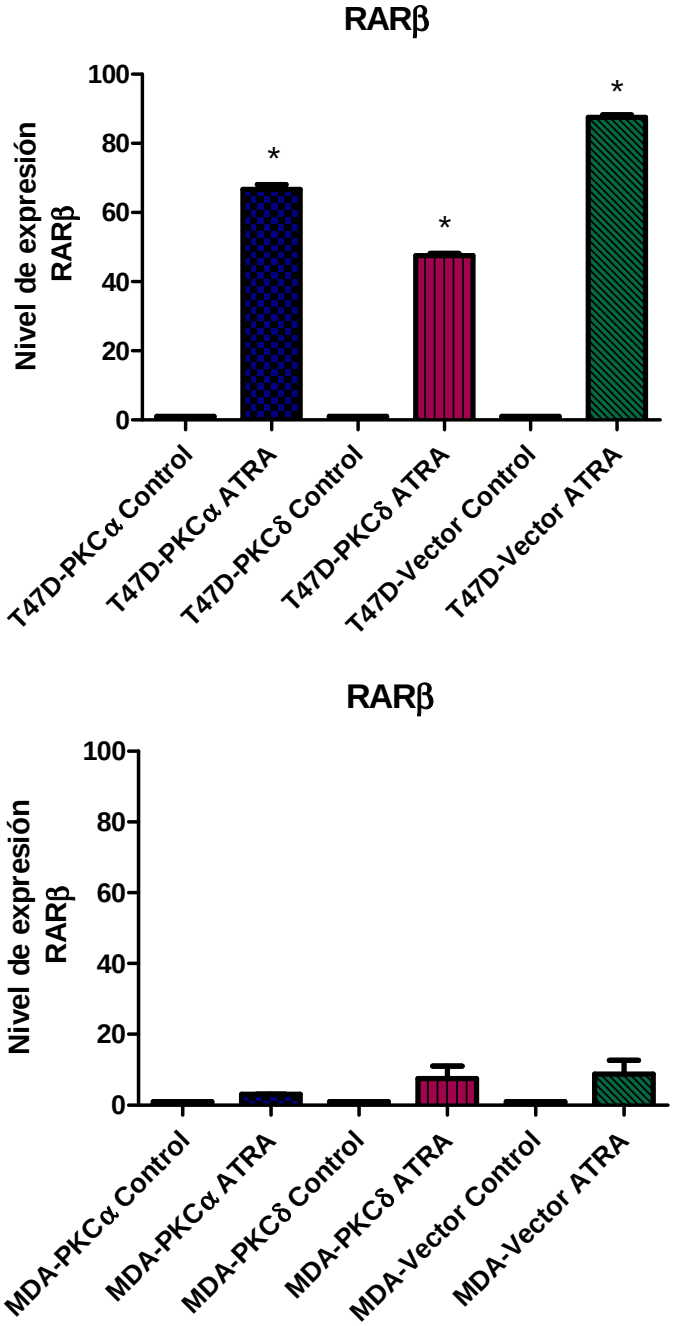
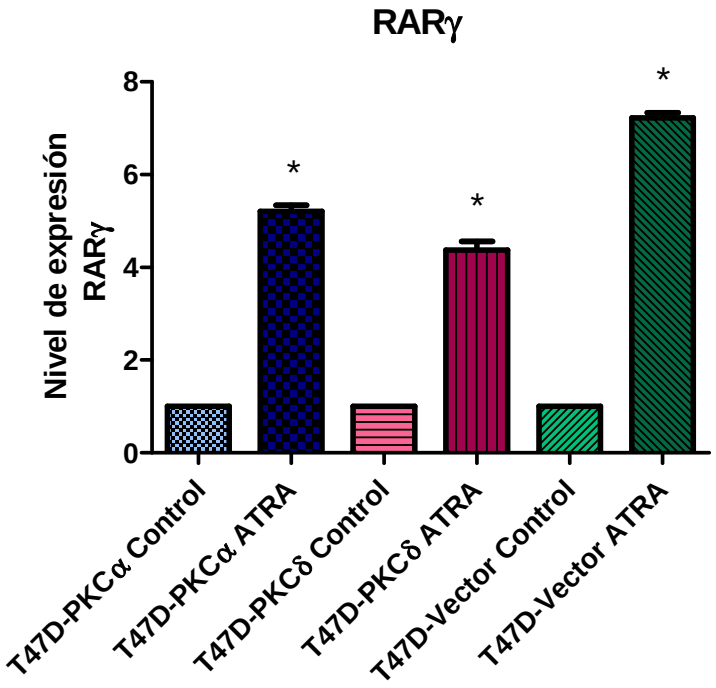


Figura 46: Efecto del tratamiento con ATRA sobre los niveles de RARβ. Los niveles del receptor retinoide RARβ fueron analizados mediante PCR en tiempo real en las sublíneas derivadas de T47D y MDA-MB231 con o sin tratamiento con ATRA. Se muestra un experimento representativo de tres independientes (n=3). * $p<0,05$ *vs* células de la misma sublínea sin tratamiento (control). ANOVA test de Tukey.



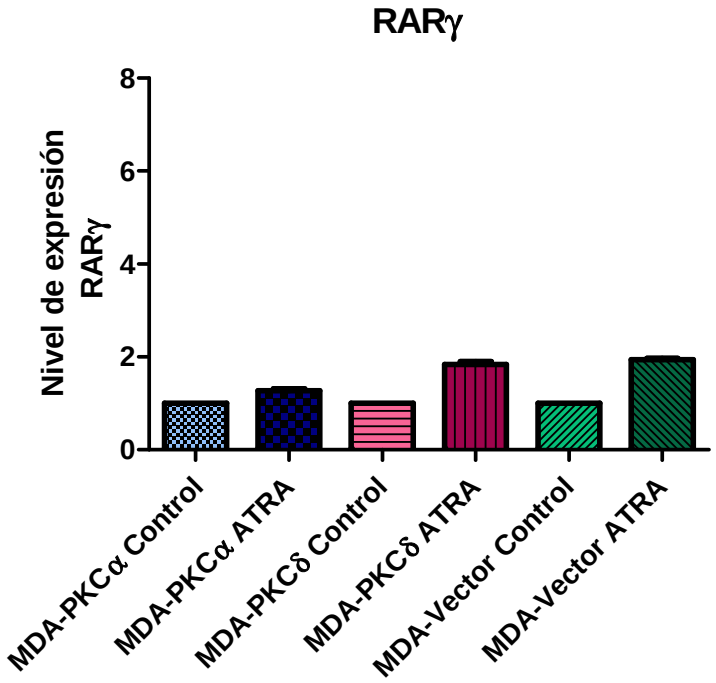


Figura 47: Efecto del tratamiento con ATRA sobre los niveles de RARγ. Los niveles del receptor retinoide RARγ fueron analizados mediante PCR en tiempo real en las sublíneas derivadas de T47D y MDA-MB231 con o sin tratamiento con ATRA. Se muestra un experimento representativo de tres independientes (n=3). * $p<0,05$ *vs* células de la misma sublínea sin tratamiento (control). ANOVA test de Tukey.

DISCUSIÓN

Utilizando las sublíneas de LM3, T47D y MDA-MB231 de cáncer mamario como modelo, estudiamos como afecta el tratamiento con retinoides diferentes parámetros implicados en la progresión tumoral y diseminación metastásica, cuando existe alteración en los niveles de las isoformas alfa o delta de PKC en un contexto murino o humano.

En primer lugar evaluamos la capacidad proliferativa del nuevo modelo murino generado (líneas: LM3-PKCα, LM3-PKCδ y LM3-Vector). Pudimos determinar que las células LM3-PKCα presentan un potencial proliferativo mayor que las demás sublíneas. Pero, la sobreexpresión de PKCα fue la única capaz de sensibilizar a las células LM3 al tratamiento retinoide, observándose una marcada inhibición del crecimiento celular.

Teniendo en cuenta que numerosos trabajos señalan la existencia de una fuerte correlación entre la sobreexpresión de PKCα y la agresividad del cáncer mamario [75], nuestros resultados sobre la inhibición del crecimiento mediado por retinoides, resultan de suma importancia. Esto sumado a resultados previos publicados por nuestro grupo de trabajo [112, 113], sugieren que los niveles de expresión de PKCα en tumores mamarios podrían entonces no sólo ser un factor de diagnóstico, sino también ser considerado en el futuro como un posible objetivo para el tratamiento del cáncer de mama.

Cabe destacar que la respuesta al ATRA observada en las células LM3-PKCα no sólo se restringió al potencial proliferativo, sino que además este fenómeno se reiteró al analizar la capacidad migratoria. Así, las células LM3-PKCα presentaron el mayor potencial migratorio entre las sublíneas analizadas pero al mismo tiempo, el tratamiento con ATRA reestableció la capacidad migratoria a niveles similares a los presentados por las células control.

El proceso de migración requiere la activación y el reclutamiento de componentes estructurales y de señalización para la formación de nuevos anclajes a la matriz extracelular. Entre las moléculas involucradas en este proceso encontramos a las integrinas, de las que se ha descrito que son activadas entre otras vías por la PKC [114].

Por otro lado, Ando y col, han demostrado que la activación de PKC inhibe la migración de queratinocitos [115]. Por lo tanto, al igual que en el caso de proliferación celular, la forma

en que las PKC modulan el proceso migratorio depende tanto de la isoforma de PKC involucrada como del origen del tejido que la sobreexpresa.

En la siguiente etapa analizamos la actividad proteolítica secretada de las MMP2 y MMP9 ya que, como mencionamos antes, su modulación puede afectar el potencial invasivo y metastásico de las células tumorales. Pudimos ver que la sobreexpresión de PKCδ incrementó la actividad de MMP-9 secretada al medio condicionado respecto de las demás sublíneas celulares. Por otro lado hemos observado que el tratamiento con ATRA aumenta la actividad de estas proteasas solubles sobre todo en LM3-PKCα y LM3-vector. Cabe resaltar que los niveles de dichas proteasas secretados por las células LM3-PKCα y LM3-vector luego del tratamiento retinoide son compatibles con los producidos constitutivamente por las células LM3-PKCδ. Por lo tanto, aunque se observa una tendencia al incremento en los valores de MMP-9 en las células que sobreexpresan PKCδ bajo el tratamiento retinoide, éstos no son significativos probablemente debido a la alta actividad que ya basalmente esta sublínea expresa. Estudios anteriores son contradictorios acerca de cómo se ve afectada la actividad proteolítica por el tratamiento retinoide. Así, Adachi y col [116] han demostrado que el RA inhibe la secreción de enzimas proteolíticas, mientras que el grupo de Mira-y-Lopez y col [117] describen un efecto inverso cuando el estímulo retinoide es acompañado con prolactina, en un modelo de mama murino.

Si bien el hecho de que, tanto la sobreexpresión de PKCδ como el tratamiento con ATRA, resulte en un incremento en los niveles de actividad de MMP9, debe tenerse en cuenta que particularmente en el tejido mamario los aumentos en la actividad de proteasas ocurre fisiológicamente durante la involución mamaria post-lactancia [118, 119], aunque podría ser desventajoso en un contexto transformado.

Con el fin de explorar el efecto del tratamiento retinoideo sobre tumores que sobreexpresan las isoformas de PKC analizadas en este trabajo, llevamos a cabo ensayos *in vivo*, utilizando ratones BALB/c, a los que se los trató con ATRA desde el momento en que los tumores fueron palpables. Estos ensayos nos permitieron demostrar que las células

LM3-PKCα presentan un fenotipo más agresivo, con un mayor crecimiento local y potencial metastásico pulmonar. Este resultado se correlaciona con estudios de otros autores que demuestran que la sobreexpresión de esta isoforma es un marcador de agresividad tumoral [75]. Similar a lo observado *in vitro*, LM3-PKCα fue la única línea que respondió en forma positiva al tratamiento con ATRA, mostrando una disminución del crecimiento tumoral y un menor número de metástasis en pulmón.

El tratamiento retinoide no fue exitoso para los tumores LM3-PKCδ ni LM3-Vector, que mostraron un grado de malignidad similar al alcanzado por tumores LM3-PKCα tratados con ATRA.

Al analizar la histopatología de los tumores obtenidos a partir de la inoculación de las diferentes sublíneas de LM3, pudimos observar que los generados a partir de la inoculación ortotópica de LM3-PKCα presentaban centros necróticos de mayor tamaño y una invasión local más avanzada comparados con los tumores de LM3-PKCδ y LM3-Vector. Pero al mismo tiempo eran los únicos que respondían al tratamiento con ATRA, mostrando una diferencia considerable respecto a los de ratones sin tratar, en donde podemos observar que los tumores pasan de tener un centro necrótico de gran tamaño y un alto grado de invasión que alcanza la epidermis, a tumores más pequeños con un centro necrótico de menor tamaño y con la dermis y epidermis intactas.

Podemos concluir que en el modelo murino la sobreexpresión de PKCα produce un fenotipo más agresivo, con mayor tasa de proliferación y mayor potencial metastásico. Al mismo tiempo dicha sobreexpresión le confiere la capacidad de responder al tratamiento con ATRA, disminuyendo estos parámetros de malignidad.

El siguiente paso fue establecer cómo afecta la sobreexpresión de las diferentes isoformas de PKC y su modulación por ATRA, parámetros relacionados con el crecimiento tumoral y diseminación metastásica en modelos celulares humanos. A tal fin se utilizaron dos líneas celulares tumorales mamarias humanas, que difieren en su capacidad de respuesta al ATRA.

En primer lugar se analizó la línea celular T47D, reportada en bibliografía como respondedora al ácido retinoico. Al comparar la tasa de proliferación de las tres sublíneas derivadas de T47D, podemos pudimos concluir que la sobreexpresión de ninguna de las isoformas de PKC altera el crecimiento celular. Esto es una clara diferencia a lo observado en la línea celular murina LM3, donde la sobreexpresión de PKCα llevó a un fenotipo más agresivo.

Al estudiar el efecto del ATRA en este modelo, observamos una clara respuesta de las tres sublíneas luego de 96 hs de tratamiento. Sin embargo, las células T47D-PKCα responden de manera más temprana, observándose una diferencia significativa ya a las 72 hs de tratamiento retinoide. Además, la respuesta es más contundente dado que a las 96 hs la diferencia observada entre las células tratadas con ATRA y las control es mucho mayor que en las demás sublíneas. Este resultado está en clara concordancia con lo observado en la línea LM3, ya que en ambas líneas celulares la sobreexpresión lleva a una sensibilización al tratamiento con ATRA.

Existen múltiples trabajos que demuestran que el ATRA puede ejercer sus efectos mediante la inducción de apoptosis o arresto del ciclo celular. Dado que no se observaron signos de muerte celular en los cultivos analizados optamos por analizar en primer lugar, si el ciclo celular se encontraba afectado.

Para analizar algunos de los mecanismos involucrados en el arresto de ciclo celular inducido por ATRA, evaluamos diferentes moléculas involucradas en proliferación, sobrevida y regulación del ciclo celular, como ERK un componente fundamental de la vía de señalización mitogénica y la vía PI3K/AKT, involucrada en la regulación de la sobrevida.

Si bien no se observó la modulación de la vía de ERK/MAPK, pudimos detectar un claro aumento en los niveles de AKT activo cuando las células son sometidas al tratamiento retinoide. Estudios recientes demuestran que la activación de la vía PI3K/AKT por ATRA es esencial para la diferenciación en células de leucemia [107]. Además resultados previos de nuestro grupo de trabajo en células LM3 y LM38 sometidas al mismo tratamiento, indican que el aumento de los niveles de AKT fosforilado, luego del tratamiento con ATRA,

estarían relacionados con un cambio a un fenotipo menos maligno y con un arresto en el ciclo celular.

Sin embargo no fue posible detectar una diferencia apreciable en los niveles de fosforilación de AKT entre las sublíneas, que expliquen el mayor arresto de las células T47D-PKCα. El análisis mediante citometría de flujo con ioduro de propidio, permitió detectar diferencias entre las tres sublíneas que explican los resultados obtenidos mediante el ensayo de proliferación, observando un arresto del ciclo celular previo en las células que sobreexpresan PKCα, indicando probablemente la existencia de otras vías de señalización implicadas en este fenómeno.

Dado que muchos de los efectos producidos por PKC dependen en gran parte de su ubicación subcelular, quisimos estudiar si el mayor efecto del ATRA en las T47D-PKCα estaba dado por la localización particular de esta isoforma de PKC. Para ello aprovechamos el hecho de que el plásmido utilizado da lugar a una proteína de fusión PKCα-GFP. Si bien no notamos cambios en la distribución de PKCα, este tipo de observación más minuciosa nos permitió detectar cambios a nivel morfológico. Notamos observamos que las células se volvieron más aplanadas y con prolongaciones del tipo de lamelipodios al ser sometidas al tratamiento retinoide.

Estudios anteriores han revelado la relación entre PKC e integrinas en los cuales por ejemplo PKCα regula el tráfico de β integrinas [120] y las PKC clásicas activadas interactúan indirectamente con la β1 integrina [121]. Dados estos antecedentes y los cambios morfológicos observados en las células que sobreexpresan PKCα tratadas con ATRA, llevamos a cabo el análisis de los puntos de adhesión focal, mediante inmunofluorescencia para β1 integrina. Luego del tratamiento con ATRA observamos un aumento de dicha integrina así como de puntos de adhesión focal en las células T47D-PKCα. También pudimos detectar que tanto en las células control como en las transfectadas con PKCα, el tratamiento con ATRA cambia la distribución de la β1 integrina, acumulándose en la cara basal de la célula.

Trabajos previos demostraron que el tratamiento retinoide en células de cáncer de colon y de ovario, produce un aumento de integrinas, lo cual está relacionado con un aumento en la sobrevida y arresto en el ciclo celular, además del caracterizado efecto en la migración celular [122, 123]. Teniendo en cuenta esto, podemos hipotetizar que el arresto del ciclo producto del tratamiento retinoide en las T47D-PKCα sería vía integrinas.

Observamos entonces, que en el modelo tumoral mamario humano respondedor al tratamiento retinoide, el efecto inhibitorio de la proliferación celular mediado por ATRA fue más pronunciado en las células que sobreexpresan PKCα. Asociándose además a un incremento en los puntos de adhesión focal, que junto con otros factores podría llevar a un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1.

Dado que se observó un cambio en la cantidad y distribución de los puntos de adhesión focal, quisimos estudiar si este resultado se relaciona además con un cambio en la capacidad invasiva y migratoria. Si bien se trataron de analizar parámetros asociados a la diseminación metastásica, la línea T47D se caracteriza por no ser invasiva, por lo tanto el único parámetro que pudo ser analizado fue el potencial migratorio. Pudimos observar que la sobreexpresión de las distintas isoformas de PKC no produce un cambio significativo en la velocidad de migración de las T47D. En cambio vemos diferencias en la respuesta al ATRA entre las sublíneas, dado que tanto en las T47D-Vector como en las T47D-PKCα hay una disminución de la migración celular en presencia del tratamiento pero no se aprecian diferencias significativas en la sublínea T47D-PKCδ. Esto por un lado nos indicaría que las diferencias en cuanto a los focos de adhesión no estaría alterando la capacidad migratoria, y por otro lado que cuando se sobreexpresa PKCδ, al igual que en modelo murino, no hay respuesta al ATRA en cuanto a la velocidad de migración celular.

Una de las conclusiones más relevantes hasta este punto es que tanto en las LM3 como en las T47D la sobreexpresión de PKCα produce un aumento en la sensibilidad al efecto inhibitorio del ATRA. Se ha reportado la existencia de una estrecha relación entre el ATRA y la isoforma α de PKC. Sabemos que esta PKC tiene un sitio RARE en su región promotora.

Por otro lado, PKCα puede alterar la respuesta retinoide regulando la estabilidad del receptor RARα. Asimismo el ATRA puede interactuar directamente con PKCα posiblemente activándola [124].

Estas evidencias junto con nuestros resultados nos llevaron a estudiar cual era el efecto de las isoformas α y δ de PKC en la sensibilidad al ATRA en un modelo celular humano no respondedor al tratamiento retinoide. Con este objetivo se desarrolló el modelo de sobreexpresión de las isoformas de PKC antes mencionadas en células MDA-MB231.

Al analizar la tasa de proliferación de estas sublíneas, esperábamos por lo antes dicho que la sobreexpresión de PKCα tornara a las células respondedoras al tratamiento con ATRA y de esta manera poder plantear la modulación de esta isoforma de PKC junto con el tratamiento retinoide como alternativa terapéutica. Sin embargo pudimos determinar por un lado que ninguna de las isoformas de PKC produce una alteración en el crecimiento celular y que no hay un efecto de las PKC en la capacidad de responder al tratamiento retinoide, ya que ninguna de las tres sublíneas presenta una diferencia significativa respecto a su control sin tratar. Al no tener respuesta al tratamiento decidimos ahondar a qué se debe la falta de la misma, lo que se analizará más adelante.

Respecto a los parámetros asociados a la promoción metastásica, analizamos en primer lugar la capacidad migratoria. De manera similar a lo señalado en el ensayo de proliferación, no hubo efecto ni de la isoforma de PKC sobreexpresada ni del tratamiento retinoide.

Sin embargo cuando estudiamos la actividad proteolítica secretada se observa una clara disminución de la actividad de MMP-9 cuando se sobreexpresa PKCδ, aunque consistentemente con lo visto anteriormente ninguna de las sublíneas responde al tratamiento con ATRA. Si bien en el modelo murino la sobreexpresión de PKCδ aumenta la actividad de MMPs, como se mencionó anteriormente, PKCδ tienen un rol dual en cuanto a este parámetro, y el contexto celular podría influir en el resultado.

El siguiente parámetro a analizar fue la capacidad invasiva de estas sublíneas, pero en este punto decidimos no estudiar el efecto del ATRA, ya que no modificó ninguna de las

variables que pueden alterar la capacidad de invadir la matriz, como migración celular y actividad de metaloproteasas. En concordancia a lo obtenido por el ensayo de actividad proteolítica secretada, la capacidad invasiva fue significativamente menor en las MDA-PKCδ respecto a las células control.

Por otro lado se analizó el crecimiento de estas sublíneas en cultivo 3D en Matrigel, obteniendo colonias de núcleos desorganizados y con prolongaciones celulares que invaden la matriz adyacente en las células control y las que sobreexpresan PKCα, parámetros asociados a un fenotipo maligno. En cambio el crecimiento de las MDA-PKCδ en este tipo de cultivo dio por resultado la formación de colonias redondeadas, más organizadas y sin invasión de la matriz.

Podemos concluir que la sobreexpresión de PKCδ le confiere un fenotipo menos agresivo a las células MDA-MB231, disminuyendo la capacidad invasiva respecto a la línea control. Por otro lado, en esta línea celular la sobreexpresión de PKCα no induce un aumento en la respuesta al ATRA, como se observó en las otras líneas celulares. Hipotetizamos que esto podría deberse a que esta línea posee ciertas características que la hacen insensible al tratamiento retinoide, y que la sobreexpresión de PKCα no sea suficiente para rescatar este fenotipo.

A fin de dilucidar el mecanismo por el cual se mantiene dicha resistencia en las células MDA-MB231, llevamos a cabo un ensayo de genes reporteros para el sitio RARE, para verificar la funcionalidad de los receptores que, ante el estímulo con ácido retinoico, se heterodimerizan y se unen a los sitios RARE favoreciendo la transcripción.

En primer lugar observamos que las células T47D, respondedoras al ATRA, presentaban un aumento significativo de actividad luciferasa en las tres sublíneas. Cabe destacar que no se detectaron diferencias en el nivel de actividad de los sitios RARE entre las sublíneas de T47D, por lo cual las diferencias observadas previamente en la sublínea que sobreexpresa PKCα estarían dadas por el aumento en la expresión de RARα cuando son tratadas con ATRA. En este sentido Cohn y col [125] destacan que el receptor RARα está asociado a efectos antiproliferativos siendo clave la relación RARα/RARγ.

Por otro lado, cuando llevamos a cabo el mismo ensayo de genes reporteros en las sublíneas derivadas de MDA-MB231, sorprendentemente ante el tratamiento retinoideo se activaron los sitios RARE, por lo tanto la incapacidad de responder al ATRA podría encontrarse en algún paso rio abajo.

Está reportado que muchos de los efectos del ATRA no ocurren directamente por la activación directa de sus genes target con sitios RARE en sus regiones promotoras, sino por la trans-represión de los sitios AP-1 [96], y dado que genes relacionados con la proliferación celular y la sobrevida tienen en sus promotores sitios AP-1, resulta interesante estudiar la dinámica de estos sitios.

Por lo tanto el siguiente paso fue analizar la actividad de los sitios AP-1 en las sublíneas T47D bajo el tratamiento con ATRA, donde pudimos observar una disminución en la actividad, evidencia de la trans-represión antes mencionada. En cambio cuando analizamos esto en las sublíneas de MDA-MB231, ninguna de ellas presenta una disminución en la actividad luciferasa.

Estos resultados sugieren que la falta de respuesta de las células MDA-MB231 podría deberse a su incapacidad para establecer la trans-represión de los sitios AP-1.

Existen evidencias que indican que la trans-represión antes mencionada sería mediada por el receptor RARβ [126]. Por esta razón decidimos estudiar los niveles de expresión de los receptores retinoicos mediante PCR en tiempo real. De este análisis podemos concluir por un lado que la sobreexpresión de PKCα conduce a una mayor respuesta al tratamiento con ATRA, lo que conlleva a un aumento significativo de la expresión de RARα, tanto en la línea T47D como MDA-MB231. Como se mencionó anteriormente el receptor RARα está relacionado con una inhibición en la proliferación mediada por ATRA. Por otro lado, tanto RARβ como RARγ se ven aumentados luego del tratamiento con ATRA en la línea T47D pero no así en la MDA-MB231.

Por lo tanto podemos concluir que la falta de respuesta de la línea MDA-MB231 estaría explicada por la falta de trans-represión de AP-1 y no por la falta de activación de los sitios RARE. La carencia de trans-represión estaría mediada por RARβ o RARγ, que son los

receptores que en este modelo no son inducidos ante el estímulo del ATRA. Las evidencias previas indican que probablemente el receptor involucrado en la trans-represión sea RARβ, pero es un tema que debe ser profundizado en nuestro modelo celular. En este aspecto, en el futuro nos proponemos sobreexpresar RARβ en células MDA-MB231 a fin de reestablecer tanto la trans-represión de AP-1 como la sensibilización al tratamiento retinoide.

Los resultados de esta tesis nos permiten concluir:

- **En el modelo celular murino LM3, la sobreexpresión de PKCα le confiere un fenotipo más agresivo, sin embargo mejora la respuesta frente al tratamiento retinoide.**

- **En cuanto a las células T47D, observamos que al igual que en el modelo murino, el efecto inhibitorio de la proliferación celular mediado por ATRA fue más pronunciado en las células que sobreexpresan PKCα. Esta mejora en la respuesta está asociada a un incremento en los puntos de adhesión focal, que junto con otros factores, llevaría a un arresto del ciclo celular.**

- **Ninguna de las sublíneas de MDA-MB231 respondieron al tratamiento con ATRA, esto podría deberse a la incapacidad de inducción de la expresión tanto de RARβ como de RARγ, lo que estaría asociado a la imposibilidad de trans-reprimir los sitios AP-1.**

- **La sobreexpresión de PKCδ en las células MDA-MB231 le confiere un fenotipo menos agresivo, disminuyendo su capacidad invasiva. Aunque ejerce un efecto dual dependiendo el origen y/o estirpe celular.**

Perspectivas a futuro:

- Debido a los altos niveles endógenos de PKCα en la línea T47D, sería de gran utilidad para valorar la participación de esta isoforma en los efectos mediados por ATRA, llevar a cabo un ensayo de siRNA.

- A fin de confirmar los resultados obtenidos in vitro en las líneas celulares humanas, planeamos llevar a cabo ensayos in vivo en ratones nude. Para ello vamos a inocular las células ortotópicamente y trataremos a los ratones con ATRA, tal como se describió en la sección de materiales y métodos para la línea LM3.

- Por último, basados en nuestros resultados y en bibliografía, nos proponemos evaluar el rol de RARβ en primer lugar, mediante la sobreexpresión de esta isorfoma en células MDA-MB231, a fin de evaluar la trans-represión de AP1 ante el tratamiento con ATRA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lodish H, B.A., Zipursky SL, et al, *Molecular Cell Biology*. 4th ed2000, New York.
2. Alberts B, J.A., Lewis J, et al, *Molecular Biology of the Cell*. 4 th ed2002, New York.
3. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 24-37.
4. Egeblad, M., E.S. Nakasone, and Z. Werb, *Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism.* Dev Cell, 2010. **18**(6): p. 884-901.
5. Krause, S., et al., *The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 263.
6. Hofmeister, V., D. Schrama, and J.C. Becker, *Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma.* Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(1): p. 1-17.
7. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 239-52.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
9. Bellahcene, A., et al., *Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer.* Nat Rev Cancer, 2008. **8**(3): p. 212-26.
10. Bal de Kier Joffé E., M.E., Aguirre Ghiso J, *Vías de señalización que regulan la expresión de proteasas durante la progresión tumoral.* Medicina, 2000. **60 (Supl. II)**.
11. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.* Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
12. Van Damme, J., S. Struyf, and G. Opdenakker, *Chemokine-protease interactions in cancer.* Semin Cancer Biol, 2004. **14**(3): p. 201-8.
13. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
14. Al-Rawi, M.A. and W.G. Jiang, *Lymphangiogenesis and cancer metastasis.* Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 723-39.
15. Nishida, N., et al., *Angiogenesis in cancer.* Vasc Health Risk Manag, 2006. **2**(3): p. 213-9.
16. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
17. Allgayer H., R.H., Fulda S. , *Hereditary tumors, from genes to clinical consequences*2009.
18. NIH. http://www.cancer.gov/. 2015.
19. Russo, J. and I.H. Russo, *Development of the human breast.* Maturitas, 2004. **49**(1): p. 2-15.
20. Russo, J. and I.H. Russo, *Breast development, hormones and cancer.* Adv Exp Med Biol, 2008. **630**: p. 52-6.
21. Howard, B.A. and B.A. Gusterson, *Human breast development.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(2): p. 119-37.
22. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics.* CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.

23. Vargo-Gogola, T. and J.M. Rosen, *Modelling breast cancer: one size does not fit all.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 659-72.
24. Cichon, M.A., et al., *Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(4): p. 389-97.
25. Feig, B.W., *M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook*. 4th Edition ed2006.
26. Campbell, L.L. and K. Polyak, *Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?* Cell Cycle, 2007. **6**(19): p. 2332-8.
27. Charafe-Jauffret, E., et al., *Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges.* Pathobiology, 2008. **75**(2): p. 75-84.
28. Petersen, O.W. and K. Polyak, *Stem cells in the human breast.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a003160.
29. Polyak, K. and W.C. Hahn, *Roots and stems: stem cells in cancer.* Nat Med, 2006. **12**(3): p. 296-300.
30. Zepeda-Castilla, E.J., et al., *[Molecular classification of breast cancer].* Cir Cir, 2008. **76**(1): p. 87-93.
31. Kurian, A.W., et al., *Second primary breast cancer occurrence according to hormone receptor status.* J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(15): p. 1058-65.
32. Knauer, M., et al., *Identification of a low-risk subgroup of HER-2-positive breast cancer by the 70-gene prognosis signature.* Br J Cancer, 2010. **103**(12): p. 1788-93.
33. Prat, A., M.J. Ellis, and C.M. Perou, *Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists.* Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(1): p. 48-57.
34. Prat, A. and C.M. Perou, *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer.* Mol Oncol, 2011. **5**(1): p. 5-23.
35. Dekker, L.V. and P.J. Parker, *Protein kinase C--a question of specificity.* Trends Biochem Sci, 1994. **19**(2): p. 73-7.
36. Kiley, S.C. and S. Jaken, *Protein kinase C: interactions and consequences.* Trends Cell Biol, 1994. **4**(6): p. 223-7.
37. Nishizuka, Y., *Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses.* FASEB J, 1995. **9**(7): p. 484-96.
38. Ohno, S. and Y. Nishizuka, *Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue.* J Biochem, 2002. **132**(4): p. 509-11.
39. Newton, A.C. and J.E. Johnson, *Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1376**(2): p. 155-72.
40. Tan, S.L. and P.J. Parker, *Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling.* Biochem J, 2003. **376**(Pt 3): p. 545-52.
41. Newton, A.C., *Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1993. **22**: p. 1-25.
42. Mellor, H. and P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily.* Biochem J, 1998. **332 (Pt 2)**: p. 281-92.
43. Gschwendt, M., et al., *Regulation of protein kinase Cmu by basic peptides and heparin. Putative role of an acidic domain in the activation of the kinase.* J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20742-6.

44. House, C. and B.E. Kemp, *Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain.* Science, 1987. **238**(4834): p. 1726-8.
45. Siegel G., A.B., Albers R. et al, *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition ed1999, Philadelphia.
46. al, M.G.e., *Protein kinase C delta.* FEBS Journal, 1999. **Volume 259**(3): p. 555–564.
47. Mackay, H.J. and C.J. Twelves, *Targeting the protein kinase C family: are we there yet?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(7): p. 554-62.
48. Griner, E.M. and M.G. Kazanietz, *Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 281-94.
49. Koivunen, J., V. Aaltonen, and J. Peltonen, *Protein kinase C (PKC) family in cancer progression.* Cancer Lett, 2006. **235**(1): p. 1-10.
50. Urtreger, A.J., et al., *Atypical protein kinase C-zeta modulates clonogenicity, motility, and secretion of proteolytic enzymes in murine mammary cells.* Mol Carcinog, 2005. **42**(1): p. 29-39.
51. Oliva, J.L., E.M. Griner, and M.G. Kazanietz, *PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors.* Growth Factors, 2005. **23**(4): p. 245-52.
52. Brodie, C., et al., *Differential role of specific PKC isoforms in the proliferation of glial cells and the expression of the astrocytic markers GFAP and glutamine synthetase.* Brain Res Mol Brain Res, 1998. **56**(1-2): p. 108-17.
53. Harrington, E.O., et al., *Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells.* J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7390-7.
54. Vucenik, I., et al., *Inositol hexaphosphate (IP6) blocks proliferation of human breast cancer cells through a PKCdelta-dependent increase in p27Kip1 and decrease in retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation.* Breast Cancer Res Treat, 2005. **91**(1): p. 35-45.
55. Cerda, S.R., et al., *PKC-delta inhibits anchorage-dependent and -independent growth, enhances differentiation, and increases apoptosis in CaCo-2 cells.* Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1700-12.
56. Tanaka, Y., et al., *Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway.* J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33753-62.
57. Grossoni, V.C., et al., *Protein kinase C delta enhances proliferation and survival of murine mammary cells.* Mol Carcinog, 2007. **46**(5): p. 381-90.
58. Clark, A.S., et al., *Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance.* Cancer Res, 2003. **63**(4): p. 780-6.
59. Kiley, S.C., et al., *Increased protein kinase C delta in mammary tumor cells: relationship to transformtion and metastatic progression.* Oncogene, 1999. **18**(48): p. 6748-57.
60. Steinberg, S.F., *Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta.* Biochem J, 2004. **384**(Pt 3): p. 449-59.

61. Yin, S., S. Sethi, and K.B. Reddy, *Protein kinase Cdelta and caspase-3 modulate TRAIL-induced apoptosis in breast tumor cells.* J Cell Biochem, 2010. **111**(4): p. 979-87.
62. Zhang, J., et al., *PKCdelta protects human breast tumor MCF-7 cells against tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis.* J Cell Biochem, 2005. **96**(3): p. 522-32.
63. Kim, M., et al., *Protein kinase Cdelta negatively regulates Notch1-dependent transcription via a kinase-independent mechanism in vitro.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(2): p. 387-97.
64. Diaz Bessone, M.I., et al., *Involvement of PKC delta (PKCdelta) in the resistance against different doxorubicin analogs.* Breast Cancer Res Treat, 2011. **126**(3): p. 577-87.
65. McKiernan, E., et al., *Protein kinase Cdelta expression in breast cancer as measured by real-time PCR, western blotting and ELISA.* Br J Cancer, 2008. **99**(10): p. 1644-50.
66. Yokoyama, G., et al., *PKCdelta and MAPK mediate G(1) arrest induced by PMA in SKBR-3 breast cancer cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327**(3): p. 720-6.
67. Zuo, Y., Y. Wu, and C. Chakraborty, *Cdc42 negatively regulates intrinsic migration of highly aggressive breast cancer cells.* J Cell Physiol, 2012. **227**(4): p. 1399-407.
68. Jackson, D., et al., *Suppression of cell migration by protein kinase Cdelta.* Oncogene, 2005. **24**(18): p. 3067-72.
69. Ways, D.K., et al., *MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C-alpha exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype.* J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1906-15.
70. Sun, X.G. and S.A. Rotenberg, *Overexpression of protein kinase Calpha in MCF-10A human breast cells engenders dramatic alterations in morphology, proliferation, and motility.* Cell Growth Differ, 1999. **10**(5): p. 343-52.
71. Gill, P.K., A. Gescher, and T.W. Gant, *Regulation of MDR1 promoter activity in human breast carcinoma cells by protein kinase C isozymes alpha and theta.* Eur J Biochem, 2001. **268**(15): p. 4151-7.
72. Blobe, G.C., et al., *Selective regulation of expression of protein kinase C (PKC) isoenzymes in multidrug-resistant MCF-7 cells. Functional significance of enhanced expression of PKC alpha.* J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 658-64.
73. Tonetti, D.A., et al., *Elevated protein kinase C alpha expression may be predictive of tamoxifen treatment failure.* Br J Cancer, 2003. **88**(9): p. 1400-2.
74. Assender, J.W., et al., *Protein kinase C isoform expression as a predictor of disease outcome on endocrine therapy in breast cancer.* J Clin Pathol, 2007. **60**(11): p. 1216-21.
75. Lonne, G.K., et al., *PKCalpha expression is a marker for breast cancer aggressiveness.* Mol Cancer, 2010. **9**: p. 76.
76. Gudas L., S.M., Roberts A, *Cellular biology and biochemistry of the retinoids*, in *The retinoids*, R. Press, Editor 1994. p. 443–520.
77. Mark, M., N.B. Ghyselinck, and P. Chambon, *Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling*

pathway during mouse embryogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 451-80.
78. D'Ambrosio, D.N., R.D. Clugston, and W.S. Blaner, *Vitamin A metabolism: an update.* Nutrients, 2011. **3**(1): p. 63-103.
79. Goodman D., B.W., *Biosynthesis, absorption, and hepatic metabolism of retinol*, in *The Retinoids*, A. Press, Editor 1984: New York. p. 1-39s.
80. Bushue, N. and Y.J. Wan, *Retinoid pathway and cancer therapeutics.* Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(13): p. 1285-98.
81. Chambon, P., *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.* FASEB J, 1996. **10**(9): p. 940-54.
82. Mangelsdorf D., U.K., Evans R, *The retinoid receptors*, in *The retinoids*, R. Press, Editor 1994: New York. p. 319–350.
83. Sun, S.Y. and R. Lotan, *Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention.* Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **41**(1): p. 41-55.
84. Niederreither, K. and P. Dolle, *Retinoic acid in development: towards an integrated view.* Nat Rev Genet, 2008. **9**(7): p. 541-53.
85. Moon, R.C., R.G. Mehta, and C.J. Detrisac, *Retinoids as chemopreventive agents for breast cancer.* Cancer Detect Prev, 1992. **16**(1): p. 73-9.
86. Duong, V. and C. Rochette-Egly, *The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(8): p. 1023-31.
87. Fenaux, P., C. Chomienne, and L. Degos, *Acute promyelocytic leukemia: biology and treatment.* Semin Oncol, 1997. **24**(1): p. 92-102.
88. Balmer, J.E. and R. Blomhoff, *Gene expression regulation by retinoic acid.* J Lipid Res, 2002. **43**(11): p. 1773-808.
89. Farias, E.F., et al., *Retinoic acid receptor alpha2 is a growth suppressor epigenetically silenced in MCF-7 human breast cancer cells.* Cell Growth Differ, 2002. **13**(8): p. 335-41.
90. Chen, C.F., P. Goyette, and D. Lohnes, *RARgamma acts as a tumor suppressor in mouse keratinocytes.* Oncogene, 2004. **23**(31): p. 5350-9.
91. Klaassen, I., et al., *Expression of retinoic acid receptor gamma correlates with retinoic acid sensitivity and metabolism in head and neck squamous cell carcinoma cell lines.* Int J Cancer, 2001. **92**(5): p. 661-5.
92. Altucci, L. and H. Gronemeyer, *The promise of retinoids to fight against cancer.* Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 181-93.
93. Esteller, M., et al., *Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer.* Cancer Res, 2002. **62**(20): p. 5902-5.
94. van der Burg, B., et al., *Differential regulation of AP1 activity by retinoic acid in hormone-dependent and -independent breast cancer cells.* Mol Cell Endocrinol, 1995. **112**(2): p. 143-52.
95. Young, M.R., et al., *Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9827-32.

96. Benkoussa, M., et al., *Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4522-34.
97. Chen, N. and J.L. Napoli, *All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha.* FASEB J, 2008. **22**(1): p. 236-45.
98. Austenaa, L.M., et al., *Vitamin A status significantly alters nuclear factor-kappaB activity assessed by in vivo imaging.* FASEB J, 2004. **18**(11): p. 1255-7.
99. Liao, Y.P., S.Y. Ho, and J.C. Liou, *Non-genomic regulation of transmitter release by retinoic acid at developing motoneurons in Xenopus cell culture.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 14): p. 2917-24.
100. Srivastava, R.K., et al., *Synergistic effects of retinoic acid and 8-Cl-cAMP on apoptosis require caspase-3 activation in human ovarian cancer cells.* Oncogene, 1999. **18**(9): p. 1755-63.
101. Hsu, S.L., et al., *Induction of p21(CIP1/Waf1) and activation of p34(cdc2) involved in retinoic acid-induced apoptosis in human hepatoma Hep3B cells.* Exp Cell Res, 1999. **248**(1): p. 87-96.
102. Radominska-Pandya, A., et al., *Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy.* J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22324-30.
103. Garattini, E., M. Gianni, and M. Terao, *Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations.* Curr Pharm Des, 2007. **13**(13): p. 1375-400.
104. Urtreger, A., et al., *Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines.* Int J Oncol, 1997. **11**(3): p. 489-96.
105. Perel, P., et al., *Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review.* BMJ, 2007. **334**(7586): p. 197.
106. Mak, I.W., N. Evaniew, and M. Ghert, *Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment.* Am J Transl Res, 2014. **6**(2): p. 114-8.
107. Matkovic, K., et al., *The role of the nuclear Akt activation and Akt inhibitors in all-trans-retinoic acid-differentiated HL-60 cells.* Leukemia, 2006. **20**(6): p. 941-51.
108. Walsh, L.A., M.A. Cepeda, and S. Damjanovski, *Analysis of the MMP-dependent and independent functions of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on the invasiveness of breast cancer cells.* J Cell Commun Signal, 2012. **6**(2): p. 87-95.
109. van der Burg, B., et al., *Retinoic acid resistance of estradiol-independent breast cancer cells coincides with diminished retinoic acid receptor function.* Mol Cell Endocrinol, 1993. **91**(1-2): p. 149-57.
110. Lee, G.Y., et al., *Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells.* Nat Methods, 2007. **4**(4): p. 359-65.
111. Suzukawa, K. and N.H. Colburn, *AP-1 transrepressing retinoic acid does not deplete coactivators or AP-1 monomers but may target specific Jun or Fos containing dimers.* Oncogene, 2002. **21**(14): p. 2181-90.

112. Berardi, D.E., et al., *Involvement of protein kinase C alpha and delta activities on the induction of the retinoic acid system in mammary cancer cells.* Mol Carcinog, 2015. **54**(10): p. 1110-21.
113. Berardi DE, D.B.M., Flumian C, Cirigliano S, Bal de Kier Joffe ED, Urtreger AJ, Todaro LB, *Pharmacological inhibition of Protein Kinase C Alpha (PKCα) and All Trans Retinoic Acid (ATRA)synergizeto inhibit the proliferation, migration and cancer stem-like properties of a triple negative mammary cancer model.* 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2014.
114. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back.* Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
115. Yoshihiro Ando, G.S.L., Pamela J. Jensen, *Journal of Cellular Physiology* Vol. Volume 156. 1993.
116. Adachi, Y., et al., *Retinoic acids reduce matrilysin (matrix metalloproteinase 7) and inhibit tumor cell invasion in human colon cancer.* Tumour Biol, 2001. **22**(4): p. 247-53.
117. Mira-y-Lopez, R., E. Reich, and L. Ossowski, *Modulation of plasminogen activator in rodent mammary tumors by hormones and other effectors.* Cancer Res, 1983. **43**(11): p. 5467-77.
118. Simian, M., A. Molinolo, and C. Lanari, *Involvement of matrix metalloproteinase activity in hormone-induced mammary tumor regression.* Am J Pathol, 2006. **168**(1): p. 270-9.
119. Hettiaratchi, A., et al., *The collagenase-1 (MMP-1) gene promoter polymorphism -1607/2G is associated with favourable prognosis in patients with colorectal cancer.* Br J Cancer, 2007. **96**(5): p. 783-92.
120. Ng, T., et al., *PKCalpha regulates beta1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic.* EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3909-23.
121. Zhang, X.A., A.L. Bontrager, and M.E. Hemler, *Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins.* J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25005-13.
122. Roela, R.A., et al., *Simultaneous changes in the function and expression of beta 1 integrins during the growth arrest of poorly differentiated colorectal cells (LISP-1).* Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(8): p. 1091-9.
123. Carduner, L., et al., *Cell cycle arrest or survival signaling through alphav integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids.* Exp Cell Res, 2014. **320**(2): p. 329-42.
124. Ochoa, W.F., et al., *Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C(alpha).* Biochemistry, 2003. **42**(29): p. 8774-9.
125. Cohn, E., et al., *RARalpha1 control of mammary gland ductal morphogenesis and wnt1-tumorigenesis.* Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R79.
126. Chen, J.Y., et al., *RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation.* EMBO J, 1995. **14**(6): p. 1187-97.