



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Químicas**

**Caracterización de la línea celular LM05,
derivada de un tumor mamario murino estrógeno
dependiente.**

Nº 213

Oswaldo Pontiggia

Tutor: Dra. Silvia González
Directora: Dra. Marina Simian

Departamento de Investigación
Agosto 2008

A Mis Padres

Agradecimientos:

A la Dra. Marina Simian, por haberme guiado durante estos primeros pasos en la investigación pero por sobre todo por su gran cariño y por ser una gran persona a quien respeto y admiro.

Al Instituto Ángel H. Roffo, a la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé y a la Dra. Lidia Puricelli por haberme aceptado en su equipo y brindado las facilidades necesarias para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Instituto por brindarme su compañerismo y haberme ayudado en este trayecto.

A la Dra. Elizabeth Miskievich, por haber confiado en mí y haber abierto las puertas en el Instituto.

A la Dra. Silvia González por haber despertado mi interés en la biología celular.

A la Dra. Cecilia Di Rissio y al Dr. Marcelo Vernengo y a todos mis profesores.

A mi abuela Leonor, que tuvo fe ciega en mí y me acompañó de cerca siempre.

A mis hermanos por estar cuando los necesito y darme confianza en todo momento.

A Guada, Romy y Andre con quienes compartí muy buenos momentos.

A Todos mis amigos entrañables, por estar siempre: Tomy, Ivo, Maxi, Pepo, Moncho, Paglie, Delfi, Mori, Fiore, Emma, Nadia, Cusi, Gabo, Pancho, Alex y Vasco

A las familias Alé y Szeinbaum por haberme brindado su cariño y hospitalidad.

Resumen

El entendimiento de los mecanismos que llevan al desarrollo del cáncer de mama hormono-dependiente y la progresión del mismo a la resistencia hormonal es vital para el impulso de nuevas terapias. En particular, el desarrollo de nuevos modelos experimentales que permitan explorar estos mecanismos es fundamental, ya que en la actualidad se cuenta con pocos sistemas que recapitulen estos aspectos de la enfermedad. En el Bioterio del Área de Investigación del Instituto "Ángel H. Roffo" se mantiene por trasplante subcutáneo singenético un tumor de mama estrógeno dependiente al que se denominó M05, surgido espontáneamente en una hembra virgen de la cepa BALB/c. Del mismo se generó la línea celular continua LM05-MIX, y los clones LM05-E y -F, cuya caracterización fue el objetivo de este trabajo. Se encontró que LM05-MIX está compuesta de dos poblaciones celulares, una epitelial, positiva para citoqueratina 14 y 18, E-cadherina y vimentina. Por otra parte la población fibroblástica fue positiva para actina de músculo liso, vimentina y negativa para citoqueratinas y E-cadherina. Ambas poblaciones expresaron receptores de estrógeno y progesterona. Ensayos de proliferación demostraron que tanto la línea LM05-MIX como la -E fueron estimuladas por estradiol e inhibidas por tamoxifeno. La línea LM05-F no respondió a estos tratamientos. Se observó inducción de apoptosis en la línea -E en presencia de tamoxifeno, lo cual no ocurrió en la LM05-MIX, sugiriendo un papel del estroma en la adquisición de resistencia al tamoxifeno en este modelo experimental. Tratamientos a tiempos cortos demostraron que tanto el estradiol como el progestágeno MPA son capaces de inducir efectos no genómicos en las líneas LM05-E y -F lo cual se evidenció por la fosforilación de ERK. Inoculación de las líneas en ratones hembras y machos de la cepa BALB/c reveló que sólo las líneas MIX y -F son tumorigénicas, manteniendo sólo la MIX su hormono-dependencia. Análisis de la histología de los tumores generados por la MIX demuestra que a pesar de que se mantiene la expresión de receptores hormonales, la representación de los distintos tipos celulares no coincide con el tumor parental M05, ya que hay una pérdida del componente epitelial y aumento del estromal. Nuestros resultados demuestran que el sistema LM05 es de sumo interés para el estudio de los mecanismos involucrados en la respuesta del cáncer de mama estrógeno dependiente tanto al estradiol como al tamoxifeno, y en especial se presenta como una herramienta adecuada para estudiar el papel de las relaciones epitelio-mesenquimáticas en este contexto.

Indice

Agradecimientos:.....	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
¿Qué es el cáncer?	8
La glándula mamaria y el cáncer de mama.....	8
Factores de riesgo.....	8
Clasificación de los tumores de mama.....	9
Tratamientos.....	10
El tamoxifeno.....	10
Receptor de estrógeno y cáncer de mama.....	11
Resistencia al tamoxifeno e interacción entre distintas vías de señalización.....	13
Modelos experimentales y líneas celulares.....	14
Antecedentes:.....	15
Objetivos:.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Hormonas.....	15
Medio de cultivo.....	15
Suero fetal bovino.....	15
Extracción de proteínas.....	16
Western Blot.....	16
Inmuno fluorescencia.....	16
Anticuerpos Primarios.....	16
Anticuerpos Secundarios:.....	17
Ensayo de apoptosis.....	17
Ensayo de proliferación.....	17
Tratamientos con pulsos de estradiol.....	17
Estudios In Vivo.....	17
Tumorigenicidad.....	17
RESULTADOS.....	17
Tumor M05.....	17
Generación de la línea celular LM05, y sus derivados.....	18
Estudio de la presencia de receptores hormonales por Western Blot.....	22
Estudio de la presencia de receptores por inmunofluorescencia.....	22
Efecto de la vía del ER sobre la proliferación celular.....	24
Inducción de apoptosis por tamoxifeno: efecto protector de la población fibroblástica.....	25
Efectos a nivel no genómico del estradiol y el MPA.....	27
Tumorigenicidad de las líneas LM05.....	29
Caracterización del tumor de la línea LM05.....	29
DISCUSIÓN.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	34

Introducción

¿Qué es el cáncer?

El **cáncer** es una enfermedad que se caracteriza por la división y el crecimiento descontrolado de las células. Dichas células poseen la capacidad de invadir el órgano donde se originaron, de viajar por la sangre y el sistema linfático hasta otros órganos más alejados y crecer en ellos, originando metástasis. El proceso de división y muerte celular está regulado por una serie de mecanismos de control; cuando estos se alteran y se desajusta el balance entre división y muerte celular aumenta la probabilidad de que con el tiempo se desarrolle un **tumor** o **nódulo**. Cuando las células que constituyen dicho tumor no poseen la capacidad de invadir y destruir otros órganos, se habla de **tumores benignos**. Pero cuando estas células además de crecer sin control sufren nuevas alteraciones y adquieren la facultad de invadir tejidos y órganos vecinos (infiltración), y de trasladarse y proliferar en otras partes del organismo (metástasis), se denomina **tumor maligno** o **cáncer**. El proceso que lleva a que un paciente sea diagnosticado de cáncer no necesariamente es equivalente al de otro paciente, ya que los síntomas, tratamientos y evolución pueden ser totalmente diferentes.

La glándula mamaria y el cáncer de mama.

La unidad secretora funcional de la glándula mamaria es una estructura altamente organizada que consta de una red de ductos ramificados de células epiteliales rodeadas por tejido mioepitelial y membrana basal embebido en un complejo estroma. En el humano, nacen desde el pezón de 10 a 15 ductos que atraviesan el tejido adiposo de la glándula mamaria y terminan en un conjunto de alvéolos. Cada ducto alimenta a un lóbulo específico. Los lóbulos están separados por tejido conectivo que contiene nervios, vasos linfáticos y sanguíneos.

La glándula mamaria a diferencia de otros órganos, al momento del nacimiento, está compuesta por un sistema rudimentario de túbulos que se ramifican minoritariamente. El desarrollo morfológico y funcional de la glándula es mayormente post-natal llegando a su grado máximo durante el embarazo y la lactancia. Una vez finalizado este período la glándula involuciona, las células epiteliales mamarias mueren y son reemplazadas por tejido adiposo y mesenquimático que son los encargados de brindar soporte a los lóbulos. En mujeres no embarazadas desaparece la mayor parte del epitelio secretor, dejando a los ductos preparados para ciclos repetidos de crecimiento y diferenciación.

El cáncer de mama consiste en un crecimiento anormal y desordenado de las células de este tejido. Es la neoplasia maligna más común en mujeres de occidente, según informes de la Organización Mundial de la Salud. En Estados Unidos constituye la segunda causa de muerte por cáncer, sólo superada por el cáncer de pulmón. En Argentina la incidencia es similar, y muestra un incremento sostenido. La mortalidad reportada para el período 1989-1992 fue de 21.2 cada 100.000 habitantes, mientras que entre 1997-2000 se incrementó a 26.7 (Ministerio de Salud, 2002).

Factores de riesgo

Los factores de riesgo de carcinoma mamario se asocian tanto a la historia familiar como a una estimulación intensa y/o prolongada por hormonas sexuales femeninas, entre otras. La historia familiar de cáncer de mama invasor en un pariente del primer grado (por ejemplo, madre, hermana o hija) representa un riesgo mayor, especialmente si dos o más familiares de primer grado están afectados. Una historia personal de enfermedad benigna de mama (especialmente en un caso en el que se ha realizado biopsia) también aumenta el riesgo de cáncer de mama. Los cambios proliferativos aumentan el riesgo aún más, y la hiperplasia atípica lobulillar o ductal se asocia con el aumento más significativo del riesgo. La obesidad se asocia con un riesgo aumentado, una consideración importante dada la prevalencia en aumento de la obesidad en los Estados Unidos. La ingesta de grasa dietaria, por lo menos durante 10 a 15 años antes del diagnóstico del cáncer de mama, no parece influenciar el riesgo de cáncer de mama invasivo (Hunter et al., 1996). De todos modos, es posible que la grasa u otras sustancias consumidas entre la menarca y la edad al nacimiento del primer hijo vivo puedan influenciar el riesgo de cáncer de mama a lo largo de la vida. Por el momento no hay datos accesibles pertinentes. Estudios recientes han mostrado que el uso moderado a importante de alcohol también puede elevar sustancialmente el riesgo de cáncer de mama a través de un efecto dosis-respuesta (Longnecker et al., 1995). El ejercicio puede disminuir el riesgo de cáncer de mama, especialmente cuando se inicia temprano en la vida, si es vigoroso y realizado 3 a 4 veces por semana.

A pesar de que los mecanismos por los que estos factores aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama no son completamente comprendidos, las alteraciones en los niveles circulantes de estrógenos y progestinas o el metabolismo tisular local de esas hormonas parecen jugar un rol. En particular, la his-

toria menstrual y reproductiva, que incluye menarca temprana y menopausia tardía se asocian con una mayor exposición a niveles circulantes de estrona y estradiol, mientras que la concentración de globulinas fijadoras de hormonas sexuales son inferiores. Esto se puede traducir en un aumento de la incidencia de cáncer de mama a medida que esas mujeres llegan a su edad postmenstrual.

Por otra parte, la paridad y la edad del primer parto también son factores que influyen en el riesgo. Es importante notar que desde la II Guerra Mundial, la proporción de mujeres nulíparas ha aumentando continua y progresivamente (Madigan et al., 1995). Datos epidemiológicos de los últimos 15-20 años señalan que los estrógenos exógenos solos o en combinación con progestágenos, elevan el riesgo de cáncer de mama (Hulka et al., 1994). A pesar de eso, solo la mitad de los cánceres de mama pueden ser actualmente explicados por factores de riesgo conocidos; esto significa, que el riesgo atribuible a la población es sólo de alrededor del 50% (Harris et al., 1992). De hecho, un gran número de mujeres sin factores de riesgo identificables desarrollarán cáncer de mama. Se requiere rápidamente más investigación teniendo en cuenta esos casos.

Clasificación de los tumores de mama.

La mayoría de los tumores que se producen en la mama son benignos, no cancerosos, y son debidos a formaciones fibroquísticas. Dentro de los tumores malignos, existen varios tipos en función del lugar de la mama donde se produzca el crecimiento anormal de las células y según su estadio. Los tumores pueden ser localizados o haberse extendido a través de los vasos sanguíneos o mediante el sistema linfático y haber dado lugar a metástasis, es decir a un cáncer en un órgano distante al originario. De todos los casos de cáncer de mama, sólo el 7-10% de ellos presenta metástasis de inicio. De acuerdo a la organización mundial de la salud, los carcinomas mamarios se clasifican en:

1) No invasor:

- a) Carcinoma intraductal: se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas ni ha producido metástasis. Por este motivo esta enfermedad 'premaligna' puede extirparse fácilmente. La tasa de curación ronda el 100%. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía.
- b) Carcinoma papilar intraductal: estos carcinomas intraductales tienen un patrón predominantemente papilar.
- c) Carcinoma lobular in situ: se origina en las glándulas mamarias (o lóbulos) y, aunque no es un verdadero cáncer, aumenta el riesgo de que una mujer pueda desarrollar un tumor en el futuro. Se suele dar antes de la menopausia. Una vez que es detectado, es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de cáncer.

2) Invasor (infiltrante):

- a) Carcinoma ductal invasor: es el que se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama, y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en el 80% de los casos.
- b) Carcinoma lobular invasor: comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender y destruir otros tejidos del cuerpo. Entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son de este tipo. Este carcinoma es más difícil de detectar a través de una mamografía.
- c) Carcinoma medular: su incidencia es baja y es el tipo histológico de los carcinomas hereditarios por mutación de los genes BRCA1 y 2. Forma masas tumorales grandes y blandas con extensa necrosis y hemorragia constituidas por láminas sólidas de células grandes con estroma linfocitario.
- d) Carcinoma tubular: tiene una morfología muy diferenciada. Es una variante poco frecuente que se caracteriza por tener muy buen pronóstico dada su baja agresividad.

El cáncer tiene un pronóstico y tratamiento distintos en función de la etapa de desarrollo en que se encuentre y de los factores de riesgo que tenga la mujer. Para conocer esto hay que realizar una serie de análisis que facilitan su clasificación en uno u otro estadio.

El Comité Conjunto Americano del Cáncer utiliza el sistema de clasificación TNM:

La letra **T**, seguida por un número que va del 0 al 4, indica el tamaño del tumor y la propagación a la piel o a la pared del tórax debajo de la mama. A un número más alto le corresponde un tumor más grande y/o una mayor propagación a los tejidos cercanos. La letra **N**, seguida por un número que va del 0 al 3, indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos a la mama y, si es así, si estos ganglios están adheridos a otras estructuras. La letra **M**, seguida por un 0 o un 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes.

La clasificación, para los subgrupos, se realiza con números que van del I al IV.

ESTADIO I: indica que el tumor es menor de **2 cm** y no hay metástasis. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 98%.

ESTADIO II: abarca las siguientes situaciones:

1) No mide más de 2 cm pero los ganglios linfáticos de la axila están afectados.

2) Mide entre 2 y 5 cm y puede o no haberse extendido.

3) Mide más de 5 cm pero los ganglios linfáticos axilares no están afectados. El índice de supervivencia a 5 años es del 88-76%.

ESTADIO III: se divide en estadio IIIA y IIIB:

El estadio III A puede integrar a las siguientes formas: El tumor mide menos de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares y éstos están unidos entre sí o a otras estructuras. El tumor mide más de 5 cm y los ganglios linfáticos axilares están afectados. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 56%.

El estadio III B puede darse en los siguientes casos:

a) El cáncer se ha extendido a otros tejidos cerca de la mama (piel, pared torácica, incluyendo costillas y músculos del tórax).

b) El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 46%.

ESTADIO IV: se produce cuando el cáncer se ha diseminado a otras estructuras del cuerpo. Los órganos en los que suele aparecer metástasis con mayor frecuencia son los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro. También puede ser que el tumor haya afectado localmente a la piel. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 16%.

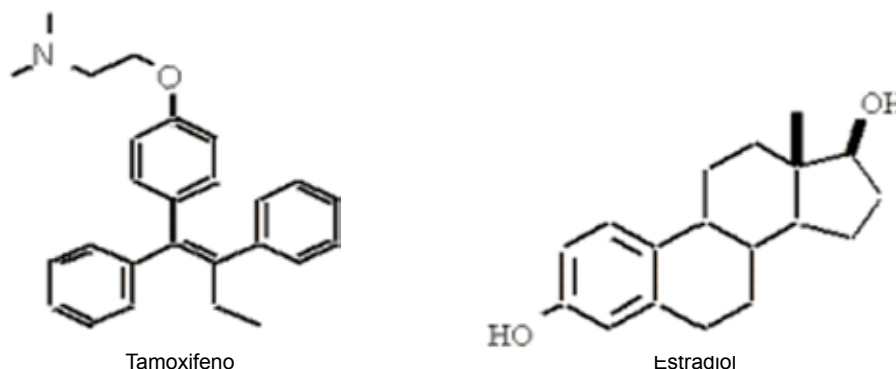
Tratamientos.

El tratamiento de esta enfermedad incluye cirugía, tratamiento hormonal y quimioterapia de acuerdo al tipo y extensión del tumor. La hormono-terapia tradicionalmente incluyó la castración, adrenalectomía e hipofisectomía. Actualmente se disponen de tratamientos farmacológicos con antiestrógenos como el tamoxifeno, inhibidores de aromatasas y agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH). En particular, el tamoxifeno es el tratamiento a elección en el cáncer de mama que es positivo para receptores hormonales.

El tamoxifeno.

El tamoxifeno es un derivado no esteroideo del trifeniletileno que se une al receptor de estrógeno, posee una acción dual, como estrogénico y como no estrogénico dependiendo del tejido en donde actúe. En el epitelio mamario actúa como agente antiestrogénico; es por eso, que se utiliza tanto en la prevención como en el tratamiento del cáncer de mama. En cambio, en el epitelio uterino el tamoxifeno actúa como proestrogénico. En la actualidad esto genera una controversia en lo que respecta a la seguridad en la prevención del cáncer, especialmente desde que se ha detectado un aumento en la incidencia del carcinoma endometrial en las mujeres tratadas crónicamente con tamoxifeno. Es por esta razón que es inapropiado referirse al tamoxifeno simplemente como un antiestrogénico. El término que se le ha otorgado fue el de modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM).

El tamoxifeno fue originalmente evaluado en un programa para el desarrollo de píldoras anticonceptivas. Aunque la droga había sido efectiva en ratones, no fue una droga que funcionara en el control de la fertilidad en las mujeres, y no fue hasta principios de los años setentas que fue demostrado su utilidad para el uso como tratamiento contra el cáncer de mama avanzado. Estudios subsecuentes en ratones utilizando dimetilbenzotraceno (DMBA) y nitrosometilurea como carcinógenos, demostraron que el tamoxifeno era altamente efectivo en la prevención del desarrollo del cáncer de mama experimental.



Receptor de estrógeno y cáncer de mama.

Los receptores de estrógeno (RE) tienen un rol muy importante en el metabolismo celular, especialmente en la glándula mamaria. El efecto primario de los RE en el tejido mamario es mediar el efecto mitogénico de E_2 (estradiol). En etapas tempranas del cáncer de mama, entre el 46 y el 77% de los carcinomas son positivos para receptores de estrógeno y más del 70% de ellos responden a la manipulación hormonal.

El RE es una proteína perteneciente a la "súper familia de receptores nucleares", la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroideas, el receptor de la vitamina D, retinoides, hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos (Kuiper et al., 1996; Tsai and O'Malley, 1994). Hasta hace pocos años se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos eran mediados por un solo RE. Sin embargo, en 1995 fue descubierto un nuevo receptor de estrógeno al que se lo denominó RE- β , que tiene un peso molecular de 57 KDa (Nilsson et al., 2001; Saunders, 1998). En consecuencia, este descubrimiento aumentó el nivel de complejidad de la fisiología de los estrógenos, sin mencionar que existen también receptores localizados en la membrana que median igualmente funciones de estas hormonas. Ambos receptores poseen funciones diferentes de acuerdo al tejido donde ejercen su acción. Funcionalmente, el RE- α , al igual que el resto de los receptores esteroideos, está organizado en 6 dominios denominados por letras de la "A" a la "F" (Figura 1). La región A/B está localizada en el lado amino terminal de la proteína y es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares. Este dominio contiene una función de activación de la transcripción genética (Activation Function 1 o AF-1) y varios sitios de fosforilación que son importantes en el proceso de activación de la proteína, especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona (Tora et al., 1989). La región de unión al ADN, denominado dominio C, es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares, y está compuesta por nueve residuos de cisteína, de los cuales ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar dos "dedos de zinc" que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos "dedos de zinc", conocida como la caja P (P-box). Entre la región de unión al ADN y el dominio E/F, se encuentra la región D o región bisagra, la cual facilita los cambios conformacionales y plegamiento de la molécula. Al igual que todas las proteínas que se localizan en el núcleo, el RE contiene una señal de localización nuclear (NLS) formada por residuos básicos. Finalmente, en el extremo carboxilo se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando, donde se une el estradiol (E_2). Esta región, a pesar de estar conservada entre los diferentes receptores esteroideos, es altamente específica para la hormona, es decir que el receptor de estrógeno une estrógeno con alta afinidad, pero no otras hormonas esteroideas. El dominio E/F está también involucrado en otros procesos tales como activación de la transcripción en AF-2 (Activation Function 2), dimerización del receptor e interaccionar con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción y fosforilación.

La unión de estrógeno al receptor induce la fosforilación del mismo, alterando así su conformación, desencadenando la dimerización del receptor y facilitando la unión del receptor a la región promotora de los genes blancos. El reclutamiento de coactivadores como por ejemplo AIB1 (SRC3) y otras proteínas con actividad de acetiltransferasa ayudan a desenrollar la cromatina para que la transcripción pueda ser llevada a cabo (McKenna et al., 1999). En cambio la conformación de RE inducida por moduladores selectivos del receptor de estrógeno, como el tamoxifeno, ayuda al reclutamiento de correpresores y deacetilasas que inhiben la actividad transcripcional (Shou et al., 2004; Smith et al., 1997) (Figura 2 y 3).

El receptor de estrógeno en el núcleo puede modificar la transcripción de genes de otras maneras. A través de interacciones proteína-proteína, el RE puede funcionar como un coactivador, uniéndose a otros factores de transcripción y reclutando acetiltransferasas formando de esta manera complejos unidos a proteínas activadoras o a los sitios AP-1 del DNA (Kushner et al., 2000). De esta manera, el estrógeno

ayuda a regular la expresión de muchos genes que cumplen un rol fundamental en la fisiología normal de la célula. El RE no sólo tiene la capacidad de aumentar la expresión de ciertos genes, sino que también posee la capacidad de disminuirla (Frasor et al., 2003).

Estudios en células endoteliales y de cáncer mamario sugieren que existe una pequeña cantidad de RE que se localiza en citoplasma o unido a la membrana plasmática (Levin, 2005). Estos receptores de estrógeno unidos a la membrana pueden explicar los efectos tempranos o no genómicos del estrógeno, que se pudieron observar hace ya más de 10 años en cultivos celulares.

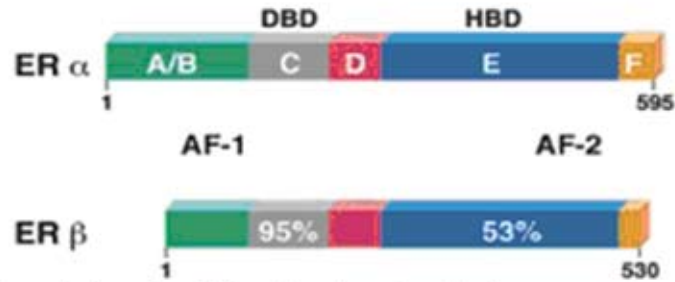


Figura 1. Estructura de los dominios funcionales de los receptores de estrógeno α y β

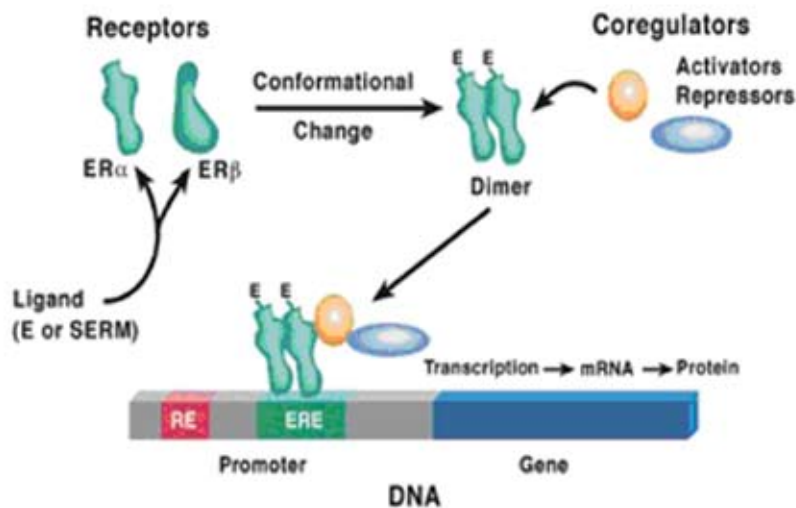


Figura 2. Efectos de la activación de receptores estrogénicos en la transcripción génica



Resistencia al tamoxifeno e interacción “cross talk” entre distintas vías de señalización.

El surgimiento del fenotipo hormono-resistente plantea uno de los problemas más serios del cáncer de mama, ya que en presencia del antiestrógeno, el tumor es capaz nuevamente de crecer. Los mecanismos postulados hasta el momento como responsables de este fenómeno están centrados en la interacción que tiene la vía del receptor de estrógeno con otras quinasas. Varias quinasas intracelulares pueden estar involucradas en la fosforilación y activación de los ER en tumores resistentes a tratamientos hormonales (Figura 4). En particular, y probablemente la más estudiada, es a la vía MAPK/ERK, que puede ser activada río arriba por la familia de receptores de EGFR (epidermal growth factor receptor) que incluye al oncogen HER2/Neu. Otra vía es la del fosfatidilinositol 3-kinasa/AKT que puede ser activada por IGF (Insulin growth factor) además de EGFR/HER2 y la vía de señalización p38 MAPK que puede ser activada por stress o varias citoquinas. Todas estas quinasas pueden fosforilar el receptor de estrógeno en posiciones claves como por ejemplo las Ser118, Ser167 y Thr311 en la región AF-1 u otros dominios de receptor. (Campbell et al., 2001; Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995; Joel et al., 1998). Es sabido que el tamoxifeno puede unirse al RE y activarlo parcialmente en células que coexpresen RE y HER2/EGFR y desencadenar una respuesta agonista debido al “cross-talk” existente entre RE y EGFR (Gutierrez et al., 2005).

Nuevos trabajos han descubierto que el HER2 puede estar involucrado en la activación de uno de los mayores coactivadores de la transcripción génica generada por RE. Los factores de crecimiento podrían activar RE por medio de fosforilaciones y activación de coactivadores como el caso de AIB 1 (o SRC-3). Se han presentado evidencia que indican que altos niveles de AIB-3 reducen el efecto antagonístico del tamoxifeno (Masamura et al., 1995; Jeng et al., 2000)

Trabajos previos han demostrado que células tumorales mamarias que coexpresan RE y HER2 responden en menor medida al tratamiento con tamoxifeno (Stephen et al., 2001), y que altos niveles de AIB1 con HER2 pueden predecir un mal diagnóstico en pacientes tratados con tamoxifeno luego de una cirugía (Jeng et al., 2000).

Se realizaron ensayos *in vitro* que demostraron que en células MCF-7 HER2 positivas y resistentes a tratamientos hormonales, el tratamiento con tamoxifeno es capaz de inducir el reclutamiento de complejos coactivadores (RE, AIB1, CBP y p300), mientras que, en células MCF-7 sensibles a tamoxifeno, el tratamiento resulta en el secuestro de complejos correpresores (NcoR e histona deacetilasa 3) (Gutierrez et al., 2005). En relación a los resultados obtenidos *in vitro* se observaron cambios similares en la señalización intracelular en muestras de pacientes tomadas previamente al tratamiento con tamoxifeno, durante los primeros meses del tratamiento, y luego de varios años de tratamiento (Nicholson et al., 2004). Se encontró que en tumores con alta expresión de RE, HER2 y de p38 MAPK, el nivel de coactivadores estaba incrementado. Estos datos sugieren que la resistencia al tamoxifeno podría estar asociada con un aumento en la actividad de varias vías de señalización, que estarían causando la activación de RE, y de esta forma escapando a la presencia del tamoxifeno. Estudios similares están siendo desarrollados para el estudio de la resistencia a los tratamientos de privación de estradiol por períodos prolongados (LTED), que en lo que respecta a la parte clínica son tratamientos prolongados con inhibidores de aromatasa. En la actualidad se cree que esta resistencia al tratamiento se debe a una hipersensibilidad de los receptores. Esto se debe a un aumento de la expresión y de la funcionalidad de RE, además de un aumento en el “cross-talk” entre varias vías de señalización de factores de crecimiento. Esto sugiere que el RE se vuelve susceptible a la activación por un gran número de quinasas intracelulares, incluyendo a las MAPK's y IGF1/AKT (Martin et al., 2003; Masamura et al., 1995; Jeng et al., 2000). Un aumento en HER2/HER3, MAPK e IGF en células resistentes a LTED podrían estar activando al RE, de manera similar a lo que sucede en células resistentes al tamoxifeno. Hay evidencias que respaldan esta hipótesis ya que se ve un aumento en los niveles de RE fosforilado en Ser118, al igual que de pp90RSK, que es una de las quinasas involucradas en la activación de RE por fosforilación del residuo Ser 167 (Joel et al., 1998).

A partir de estos descubrimientos, se están desarrollando nuevas terapias dirigidas a contrarrestar la resistencia al tamoxifeno y a la privación de estrógeno, intentando bloquear las vías de señalización que están aumentadas, con inhibidores de traducción de señales (STI) (Nicholson et al., 2004). En particular, estudios realizados con células MCF-7 resistentes a tamoxifeno demostraron que gefitinib, que bloquea el dominio tirosina quinasa del EGFR, o el trastuzumab, que bloquea el dominio externo de HER2, son capaces de reducir la señalización por ERK 1/2 MAPK e inhibieron la proliferación celular (Knowlden et al., 2003). Datos similares han sido obtenidos en células MCF-7 transfectadas con HER2, resistentes a tamoxifeno (Kurokawa et al., 2000; Witters et al., 2003). De la misma manera, células resistentes a LTED han sido sometidas a varios tratamientos para interrumpir la señalización río arriba con gefitinib, UO126 (inhibidor de MAPK) y fulvestrant (degrada receptores de estrógeno residuales) y se logró disminuir el crecimiento y la transcripción génica mediada por el RE (Martin et al., 2003).

Otra vía de señalización que se encuentra activada en el cáncer mamario resistente al tratamiento hormonal es la vía PI3K/Akt. Akt es una serina/treonina quinasa que promueve la supervivencia celular y es activada en respuesta a muchos factores de crecimiento diferentes, tales como: insulina, insulin-like growth factor-1, fibroblast growth factor, EGF, Heregulin y VEGF. Una vez activa, Akt ejerce efectos antiapoptóticos por medio de fosforilación de sustratos que regulan directamente la maquinaria apoptótica como es el caso de Bad y caspasa 9 (Clark et al., 2002). Muchas líneas celulares derivadas de tumores mamarios poseen constitutivamente activa la vía de PI3K/Akt debido a la sobreexpresión del HER2, a la pérdida del supresor PTEN o por la sobreexpresión del mismo Akt. Estos factores pueden estar asociados a la resistencia a terapias hormonales en tumores HER2 (-) o EGFR (-) o en resistencia al tratamiento con tamoxifeno.

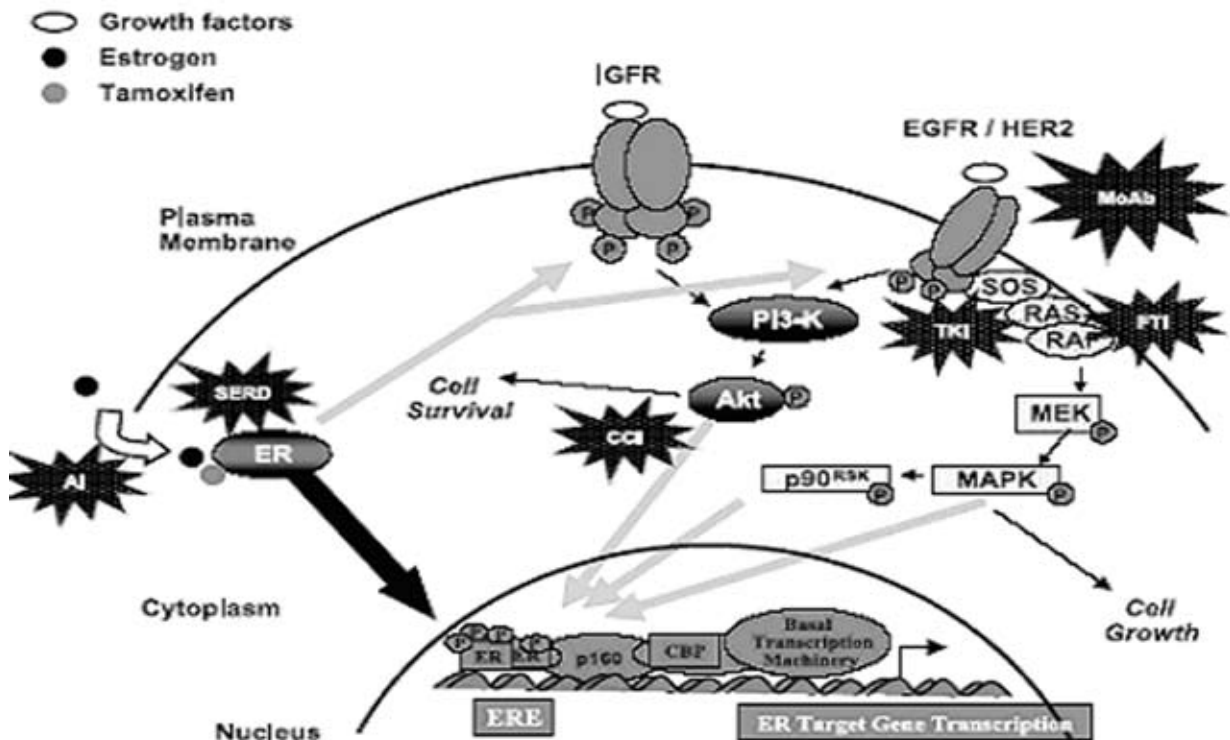


Figura 4. Vías de señalización cruzadas que llevan a la resistencia a tratamientos con tamoxifeno.

Modelos experimentales y líneas celulares.

Gran parte de lo que hoy se sabe acerca de los carcinomas mamarios está basado en estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando líneas celulares de cáncer de mama. Estas proveen una fuente ilimitada de material autoreplicante homogéneo libre de contaminación y son fácilmente cultivadas en medios definidos. La primera línea descrita fue la BT-20 la cual se estableció en 1958. A pesar del trabajo intensivo para aislar más líneas celulares el número fue extremadamente bajo. Esta baja eficacia por lo general se debe a las dificultades técnicas que se presentan al momento de extraer células tumorales viables del estroma que las rodea.

Las líneas celulares de cáncer de mama fueron aisladas con el propósito de comprender los mecanismos relacionados con la iniciación y evolución de los tumores mamarios. Sin embargo, a pesar del importante rol que siguen teniendo en la mayoría de los aspectos de la biología del cáncer, son vistas generalmente como modelos poco representativos de los tumores de los que han sido derivados. Esto se debe a varios factores, como por ejemplo, el origen metastático de la mayoría de las líneas celulares de cáncer mamario lo que ha generado preguntas acerca de su relación con los tumores primarios, seguido a esto el hecho de que la mayoría de las líneas celulares son clones y están formadas por poblaciones puras sin importar su origen, tanto metastático como de tumor primario, cuestionando su representatividad de la heterogeneidad que existe en un tumor mamario. Esta heterogeneidad se correlaciona con la progresión de secuencias de diferentes estudios tanto clínicos como patológicos; empezando por una hiperproliferación, una progresión *in situ*, transformándose luego en un carcinoma invasivo y culminando con una enfermedad metastásica. Se cree que estos estadios están asociados con una adquisición secuencial de cambios genéticos y fenotípicos en una sola célula que, debido a sus características, es

el clon celular que se selecciona. Otra falencia ha sido argumentada por el hecho de que la mayoría de las condiciones de cultivo podrían estar eliminando determinados tipos celulares, que inicialmente se encontraban en la muestra tumoral. Por ejemplo, el simple hecho de crecer las células en un medio que no contenga todos los factores necesarios para la proliferación de un determinado grupo celular o el no poder crecer sobre una superficie de plástico, son factores excluyentes por los cuales al final del proceso solamente las células con mayor capacidad proliferativa *in vitro* son elegidas.

Aunque en la actualidad se cuenta con más de 100 líneas celulares de cáncer de mama humano, dos tercios de los trabajos científicos publicados utilizan las líneas celulares MCF-7, T-47D y MDA-MB-231. Por otra parte, sólo un bajo porcentaje expresan receptores de estrógeno y progesterona, y en el caso de ser RE (+) no siempre son positivos para ambas isoformas. Otra característica importante a tener en cuenta es que de las 100 líneas cerca del 50 % son derivadas de tejido metastásico lo que significa que las células aisladas se encuentran en un estadio avanzado de la enfermedad siendo de esta forma un sistema poco representativo para el estudio de procesos desencadenantes de la enfermedad o del comportamiento de sus respectivos tumores primarios. En la actualidad se encuentran descriptas dos líneas murinas que expresan receptores hormonales: MXT, C4-HD y C7-HI. Son los únicos modelos representativos para el estudio de la resistencia a tratamientos hormonales (Lanari et al., 2001; Bernhardt et al., 2002). Actualmente se sigue en busca de nuevas líneas que representen un escenario donde se reproduzca *in vitro* el comportamiento del tumor hormono respondedor.

Antecedentes:

En relación a lo anteriormente explicado, en el instituto de Oncología "Angel H. Roffo" se aisló un tumor de mama al que se denominó M05, surgido espontáneamente en una hembra virgen de la cepa BALB/c. El mismo resultó ser hormono dependiente y sensible a tamoxifeno. El Dr. Fiszman pudo generar una línea celular continua a la cual denominó LM05-MIX y posteriormente clonar de ella dos poblaciones a las que denominó LM05-F y LM05-E. Estas líneas no han sido caracterizadas. A partir de la búsqueda de nuevos modelos, resultó de gran interés poder determinar si las mismas poseen características distintivas para su posterior uso en investigación.

Objetivos:

- 1) Caracterizar las poblaciones celulares, de las líneas LM05 MIX, E y F.
- 2) Caracterizar la expresión de componentes de membrana basal.
- 3) Determinar la presencia de receptores hormonales.
- 4) Estudiar los efectos del estradiol y el tamoxifeno sobre la proliferación celular.
- 5) Determinar si hay evidencia de receptores hormonales de membrana evaluando efectos del estradiol y el MPA a tiempos cortos.
- 6) Evaluar la tumorigenicidad de las diferentes líneas celulares.
- 7) Caracterizar los tumores generados por la línea LM05-MIX.

Materiales y métodos

Hormonas

El 17- β -estradiol (Sigma), el acetato de 6 α -methyl-17 α -hydroxy-progesterona (MPA, Sigma) y el tamoxifeno (citrate de tamoxifeno, Laboratorios Gador) fueron preparados en soluciones stock de 10⁻² M, 10⁻² M y 10⁻³ M respectivamente en etanol absoluto, para su posterior dilución en medio de cultivo. El vehículo utilizado no causó ningún efecto en las líneas.

Medio de cultivo

Para el cultivo de las células LM05 E, F y MIX se utilizó DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's médium: Ham's F12 1:1, Sigma) sin rojo fenol, con el agregado de sulfato de gentamicina en concentración 80 mg/l y bicarbonato de Sodio: (2,4 g/l). Se preparó con agua MilliQ y se llevó a pH: 7,2. Se esterilizó por presión negativa utilizando filtros de acetato de celulosa de 0.22 μ m de poro (Milipore).

Suero fetal bovino

El suero fetal bovino (SFB) (Bioser S.A-PAA Laboratorios GMBH, Pasching, Austria) se de complementó calentándolo a 56°C durante 30 minutos. Para obtener el SFB absorbido de hormonas esteroideas o "charcolizado" (SFBch) se incubó el SFB ya de complementado con 5% (p/v) carbón activado durante 24 horas a 4°C en permanente agitación. Luego de la absorción el suero se centrifugó seis veces a 20.000 g durante 20 minutos. Al sobrenadante se le adicionó 5 % (p/v) carbón activado, se lo incubó durante 1

hr a 4°C con agitación y se realizaron centrifugaciones sucesivas hasta eliminar completamente el carbón. El SFB de complementado y "charcolizado" se esterilizó por filtración negativa, utilizando filtros de 0.22µm (millipore).

Extracción de proteínas

Una vez finalizados los tratamientos las células se lavaron dos veces con buffer salino de fosfato (PBS) y se recolectaron utilizando un *scraper*. Luego se sedimentaron por centrifugación y se eliminó el sobrenadante. Se agregó buffer RIPA (50mM Tris-HCL (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% de oxicolato de sodio y 1% Nonidet P-40) con un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). Se lisaron durante una hora en agitación en hielo. Luego se centrifugó a 12.000 RPM durante 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante obtenido fue utilizado en estudios de Western blot.

Western Blot

Los extractos proteicos obtenidos de las células en cultivo se diluyeron en buffer de siembra 4X (0.25mM Tris; 10 % SDS; 4% sacarosa; 1mg/ml azul de bromofenol) con el agregado de 5% β-mercaptoetanol y se hirvieron durante 2 minutos. Se midió la concentración de proteínas de los extractos por el método de Bradford. Las muestras se sembraron (50 µg de proteína por calle) y se corrieron en geles de entre 6-12 % de SDS-poliacrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE) según el peso molecular de la proteína que se estaba estudiando. Se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad) previamente activadas (10 segundos en metanol), se bloquearon toda la noche a 4°C con una solución 5% leche descremada en PBS-Tween 0,1%, y se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-Tween 0.1% durante toda la noche a 4°C en agitación. Luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0,1% v/v y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente en agitación.

La reacción antígeno-anticuerpo se detectó por reacción de quimioluminiscencia (ECL Advanced Western Blotting Detecting Kit, GE Healthcare Life Sciences) y placas fotosensibles (Kodak Biomax Light film). Luego de ser reveladas, las membranas fueron tratadas con "stripping buffer" (62.5mM TRIS, 2% SDS, 100mM β-mercaptoetanol, pH: 6,7) para ser reutilizadas. Se utilizó un densitómetro (BioRad) para medir las bandas obtenidas utilizando el programa Molecular Analyst.

Inmuno fluorescencia

Se crecieron células de las líneas E, F y MIX sobre cubre objetos con medio DMEM/F12 + 10% suero fetal bovino durante 48 hs, se cambió a medio químicamente definido por 48 hs, y luego las células fueron fijaron con 4 % formaldehído en PBS durante 20 minutos. Se lavaron con PBS y luego fueron permeabilizadas con Triton X-100 0.1% en PBS durante 20 minutos. Se bloquearon con SFB 2% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente con PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a FITC (Zymed). Las células se analizaron en un microscopio confocal Nikon o microscopio de fluorescencia de la misma marca.

Anticuerpos Primarios.

Para los estudios por Western Blot y las inmunofluorescencias se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- Anti actina de músculo liso (Sigma)
- Anti E-cadherina (Santa Cruz)
- Anti pancitoqueratina (DAKO)
- Anti citoqueratina 18 (Ab-Cam)
- Anti citoqueratina 14 (Sigma C-212)
- Anti vimentina (Ab-Cam)
- Anti laminina (E.Y Lab)
- Anti fibronectina (GIBCO -1211-019)
- Anti colágeno I (Pierce Lab)
- Anti colágeno IV (Mina Bissell)
- Anti ER α-ab 15-(Neo Markers)
- Anti ER α H-184 (Santa Cruz)
- Anti PR (Novocastra)
- Anti ERK (Cell signaling)
- Anti p-ERK (Cell signaling)

Anticuerpos Secundarios:

Anti-ratón (Sigma) 1/10.000

Anti-conejo (Sigma) 1/10.000

Anti-cabra (Zymed) 1/5.000

Para el estudio por Western Blot, se utilizaron diluciones 1:500 de los anticuerpos en PBS 0.1% Tween con el agregado de 2% buffer de bloqueo comercial de ECL PLUS. En las inmunofluorescencia se utilizó una dilución 1:100 en PBS 5% SFB

Ensayo de apoptosis

Para corroborar el efecto inhibitorio del tamoxifeno se crecieron células de las líneas celulares E, F y Mix en medio DMEM/F12 + SFBch sobre vidriecitos. Pasadas las 48 hs se aplicaron 3 tratamientos, insulina-transferrina-selenito (ITS); ITS + E₂ (10⁻⁸ M) e ITS + E₂ (10⁻⁸ M) + TAM (10⁻⁶ M) en medio DMEM/F12 sin rojo fenol. Para la detección de células apoptóticas se siguió el protocolo del ensayo de Tunel (Roche). El resultado se corroboró con la marcación con Anexina V (Sigma).

Ensayo de proliferación

Se sembraron 250.000 células por pocillo (en multiwell de 6, 35 mm de diámetro) en medio DMEM/F12 + 10% SFB. Al día siguiente, se lavó dos veces con PBS y se agregó DMEM/F12 sin rojo fenol + 1% SFBch con el agregado de diferentes tratamientos: 1% SFBch, 1% SFBch + E₂ (10⁻⁸ M) y 1% SFBch + E₂ (10⁻⁸ M) + Tam (10⁻⁶ M). A distintos tiempos se lavaron los pocillos con PBS y luego se procedió a tripsinizar y contar las células adheridas con cámara de Neubauer. Los experimentos se realizaron por triplicado, y en cada caso se muestra un experimento representativo de 3.

Tratamientos con pulsos de estradiol

Las células se crecieron en placas de 35mm de diámetro utilizando DMEM/F12 + 10% SFB hasta lograr una confluencia del 80%. Una vez lograda se lavaron dos veces con PBS y se privaron de suero "starving" durante 48 hs en medio sin rojo fenol. Luego se las trató con estradiol (10⁻⁸ M) por 5, 10, 15, 1h, 2hs y 6hs. Se desprendieron las células de la superficie, se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos y el sedimento correspondiente a las células fue incubado en buffer de lisis RIPA para preparar los lisados celulares como se explicó anteriormente

Estudios *In Vivo*

Todos los experimentos fueron realizados utilizando hembras vírgenes BALB/c de dos meses de edad, obtenidas del bioterio del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo". Los animales se guardaron en cajas (máximo 10 ratones por caja), siguieron un esquema de 12 horas luz/12 horas oscuridad y tuvieron a su disposición alimento en *pellets* y agua. Todos los estudios con animales se realizaron de acuerdo con las normas de los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU (NIH) para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Tumorigenicidad

Las células LM05 MIX, E y F fueron cultivadas hasta alcanzar subconfluencia. Se cosecharon utilizando Tripsina/EDTA, se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS. Se inocularon 400.000 células por ratón y se utilizaron 5 ratones en cada grupo experimental.

Se evaluó la Tumorigenicidad (porcentaje de toma tumoral) y la tasa de crecimiento (mm/día, obtenida por la medición de los diámetros mayor y menor del tumor, al menos dos veces por semana).

Resultados

Tumor M05

En el Bioterio del Área de Investigación del Instituto "Ángel H. Roffo" se mantiene por trasplante subcutáneo singenético un tumor de mama al que se denominó M05, surgido espontáneamente en una hembra virgen de la cepa BALB/c. El mismo es un adenocarcinoma semidiferenciado con áreas papilíferas en el que se reconocen por lo menos dos poblaciones celulares: una de aspecto epitelial y otra fibroblastoide. La Figura 5 muestra un corte histológico teñido con hematoxilina-eosina donde se evidencian las características del tumor. Estudios *in vivo* permitieron establecer que el tumor, en los primeros ocho pasajes, tiene un comportamiento hormono-dependiente ya que crece sólo en ratones hembra intactas, o ovariectomizadas y tratadas con estradiol. Por otra parte, el tratamiento de ratones por ovariectomía o

con pellets de tamoxifeno lleva al estancamiento del crecimiento tumoral (Piudo et al., 1998) (Figura 6). Ensayos de unión receptor-ligando permitieron corroborar la presencia de receptores de estrógeno y progesterona funcionales (Piudo et al., 1998).

Para caracterizar los tipos celulares que conforman el tumor, junto con la composición de la matriz extracelular se realizaron estudios de inmunofluorescencia y microscopia confocal en cortes por congelación de tumores M05. Los mismos revelaron la presencia de células agrupadas en islotes con diferenciación pseudo-glandular rodeadas de células más alargadas y pequeñas. Los islotes resultaron positivos para marcadores de células epiteliales luminales como la citoqueratina 18 (Figura 7a) y la E.cadherina (Figura 7d). Por otra parte, se detectó una subpoblación basal de tipo mioepitelial positiva para citoqueratina 14 (Figura 7b). La marcación contra vimentina fue positiva en una subpoblación de disposición mayoritariamente basal (Figura 7c). Al analizar también los componentes de matriz extracelular, se observó una disposición organizada alrededor de los islotes con presencia de laminina (Figura 7e), fibronectina (dato no mostrado) y colágeno IV (Figura 7f) y negativa para los colágenos estromales I y III.

Una vez caracterizadas las poblaciones celulares, se determinó la presencia de receptores hormonales. Se observó a nivel nuclear y citoplasmático la presencia de receptores de estrógeno- α (Figura. 8a) y en menor cantidad de progesterona, con la presencia de un puntillado bien definido (Figura. 8c). Los receptores de estrógeno β se encontraron tanto a nivel nuclear como citoplasmático (Figura. 8b).

Generación de la línea celular LM05, y sus derivados.

A partir de un pasaje seis del tumor M05 por medio de disgregación mecánica y digestión enzimática con pronasa, se generó una línea celular estable a la cual se denominó LM05-MIX (Fizman, G., resultados no publicados). En la misma se identificaron dos poblaciones celulares, una de fenotipo epitelial, organizada en islotes, que a su vez estaba rodeada de una segunda población de aspecto fibroblastoide.

Para lograr separar y clonar las dos poblaciones, se realizó una tripsinización diferencial y luego una dilución límite (0.5 células/well) a partir del repique 35 de la línea celular mixta. Se obtuvieron dos líneas, a las cuales se denominó LM05-F y -E, respectivamente (Fizman, G., resultados no publicados). La primera se caracterizó por poseer una morfología triangular/ ahusada y por desprenderse rápidamente del sustrato, a diferencia la línea LM05-E que se caracterizó por poseer células de menor tamaño con una morfología cuboide e interacciones definidas, además de adherirse con mayor afinidad al sustrato.

Para la caracterización de la línea mixta se estudió por inmunofluorescencia la presencia de diferentes marcadores celulares. Como se muestra en la figura 9 las células de aspecto epitelial fueron positivas para los siguientes marcadores: pancitoqueratinas, citoqueratina 14 y E-cadherina. Un grupo minoritario fue citoqueratina 18 positivo. Las células que no estaban agrupadas en islotes y que poseían una morfología fibroblastoide resultaron positivas contra actina de músculo liso. Ambas poblaciones resultaron positivas para vimentina.

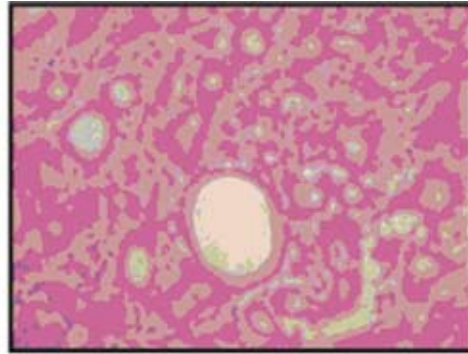


Figura 5: Histología del tumor M05.

Un pasaje temprano del tumor M05 fue fijado en formalina y embebido en parafina. Se muestra un corte del mismo tejido con hematoxilina-eosina. El mismo es un adenocarcinoma papilífero con áreas de diferenciación pseudo-glandular. Se observan dos tipos celulares, uno de aspecto epitelial y otro fibroblástico. Aumento: 400X.

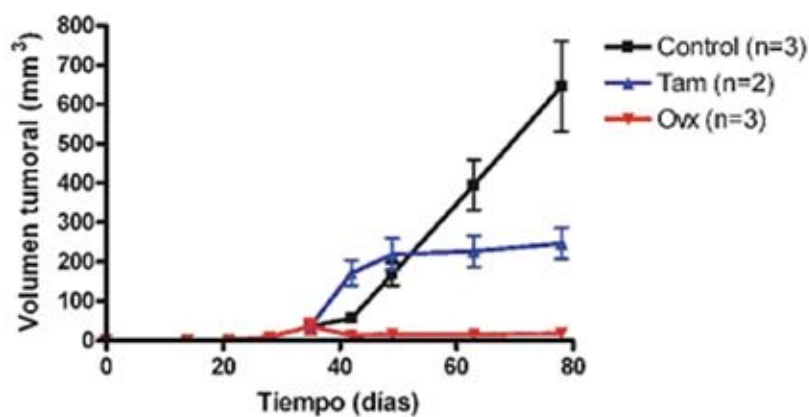


Figura 6: Curva de crecimiento del tumor M05: respuesta a tratamientos hormonales.

Hembras vírgenes de la cepa BALB/c fueron inoculadas con un pasaje 7 del tumor M05. Tras alcanzar un volumen de 35 mm³, las mismas fueron tratadas por ovariectomía o se les implantó un pellet de tamoxifeno de 5 mg. Los controles sufrieron operaciones simulacro, o fueron tratadas con pellets vacíos. Se observó un estancamiento del crecimiento tumoral en las hembras tratadas, evidenciando su estrógeno-dependencia.

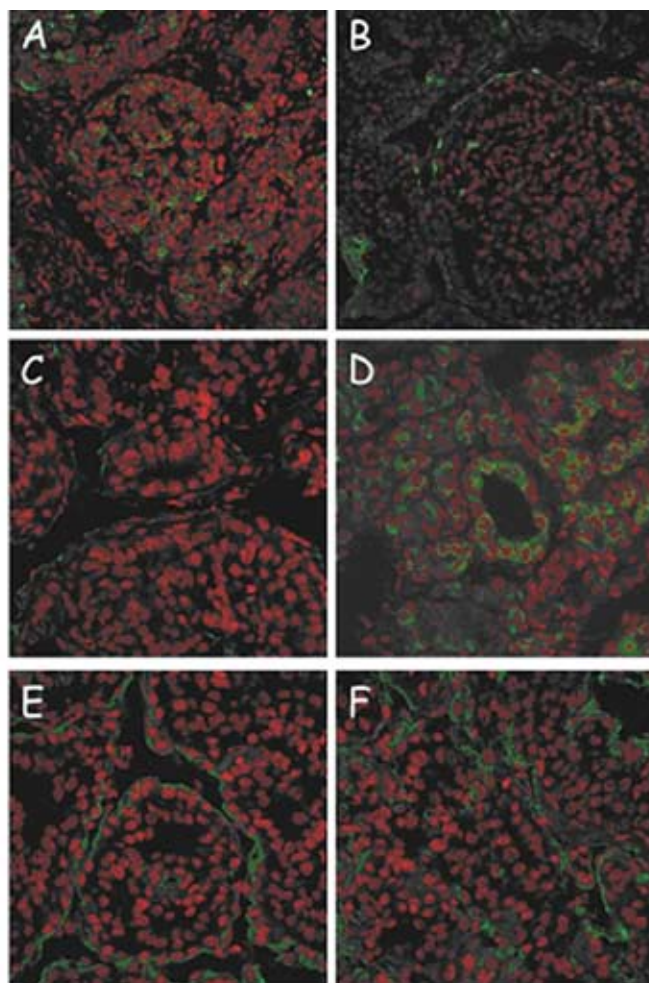


Figura 7. Caracterización del tumor M05.

Cortes de muestras congeladas del tumor M05 fueron analizados por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se utilizaron anticuerpos primarios contra: a) citoqueratina 18; b) citoqueratina 14; c) vimentina; d) E-Cadherina; e) laminina; f) colágeno IV. Tras la incubación con el anticuerpo primario se incubó con anticuerpos secundarios conjugados con FITC (verde). Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). Aumento original: 600X.

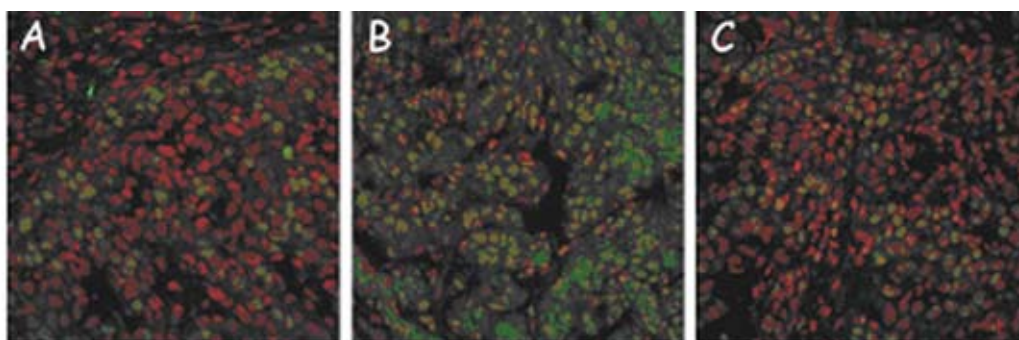


Figura 8. Estudio de la presencia de receptores hormonales en M05.

Cortes de muestras congeladas fueron analizadas por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se utilizaron anticuerpos primarios contra: a) ER- α ; b) ER- β y c) PR seguidos de anticuerpos secundarios conjugados con FITC (verde). Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). Aumento original: 600X.

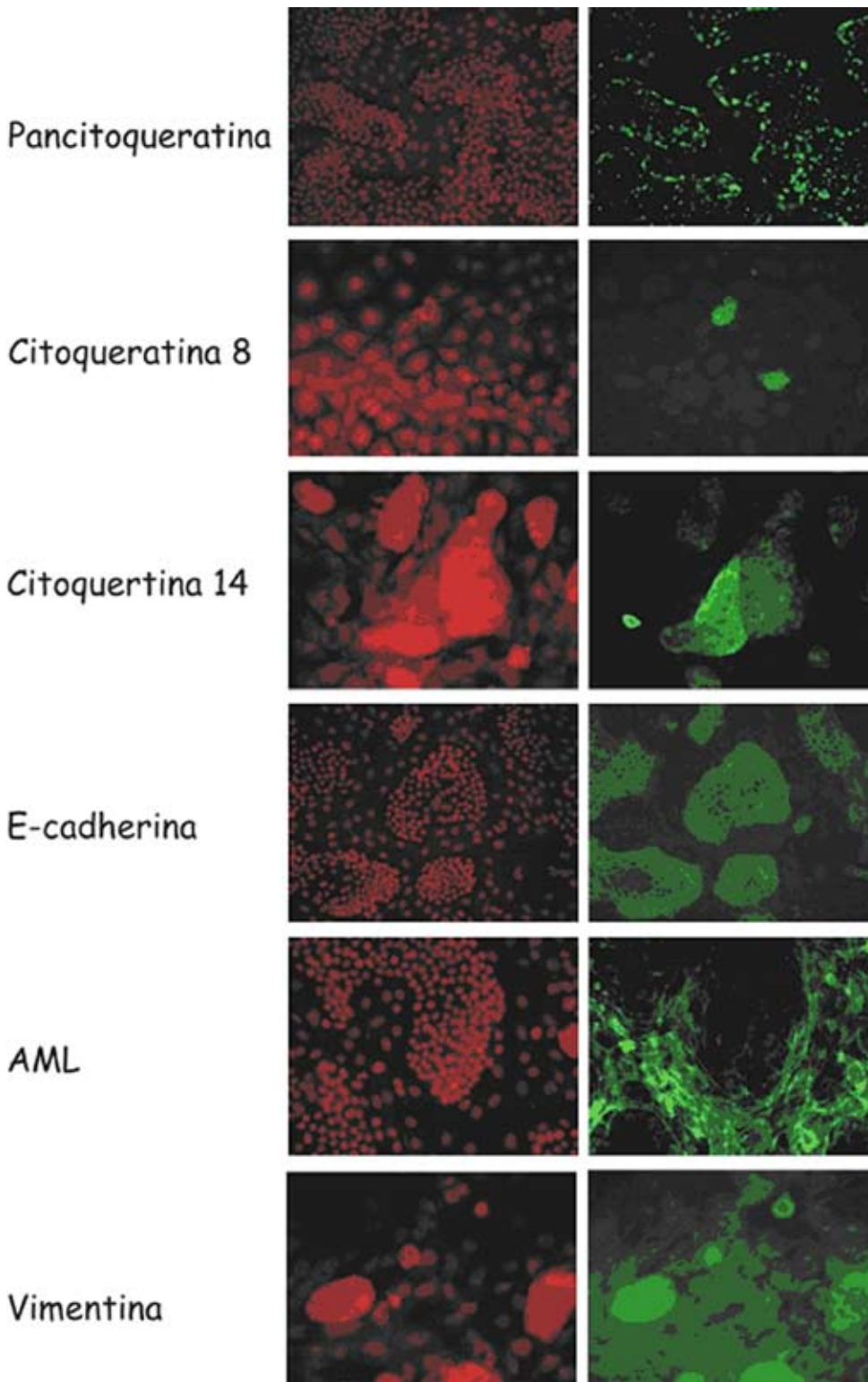


Figura 9. Localización de marcadores celulares en la línea LM05-MIX.

Se crecieron células de la línea LM05-MIX en vidrios hasta llegar a un 80 % de confluencia. Se fijaron y se estudiaron por inmunofluorescencia la presencia de diferentes marcadores celulares. Se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a FITC (verde) y los núcleos se tiñieron con ioduro de propidio (rojo). La población celular de aspecto epitelial de la línea LM05-Mix expresó citoqueratinas, vimentina, citoqueratina 14 (K14) y E-cadherina; un bajo porcentaje de células expresó citoqueratina 8 (K8). Por otra parte en la población de aspecto fibroblástico se detectó expresión de actina de músculo liso (AML) y vimentina. Aumento original 400X.

Expresión de componentes de matriz extracelular.

Se determinó la expresión de laminina y colágeno IV por inmunofluorescencia en la línea celular LM05-MIX (Figura 10). Los componentes de membrana basal se detectaron asociados tanto a la población de aspecto epitelial como a la fibroblástica, con una mayor expresión de los mismos en la zona de interacción entre ambas poblaciones celulares.

Estudio de la presencia de receptores hormonales por *Western Blot*.

Con el objetivo de determinar la presencia de los receptores hormonales, se realizaron estudios de Western Blot de extractos de las líneas celulares LM05-E, F y MIX crecidas en medio DMEM/F12 + 10% SFB (Figura 11 A). En los 3 casos se detectó la presencia de receptor de estrógeno- α . Se determinó la presencia de las isoformas A y B del receptor de progesterona en las tres líneas; sin embargo los niveles de RP-A fueron muy bajos en las líneas LM05-F y MIX en comparación con la LM05-E. Como control positivo para receptor de progesterona se utilizó un extracto de útero de ratón.

Estudio de la presencia de receptores por inmunofluorescencia.

Se estudió la presencia de receptores hormonales en las diferentes líneas por inmunofluorescencia (Figura 11 B). Se observó la presencia de ER- α y PR en las tres líneas celulares tanto a nivel nuclear como a nivel citoplasmático.

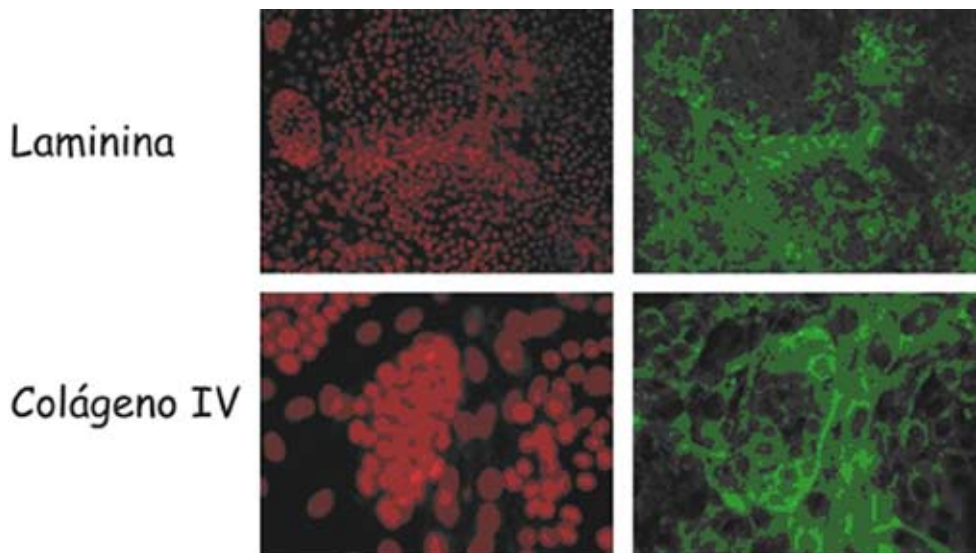
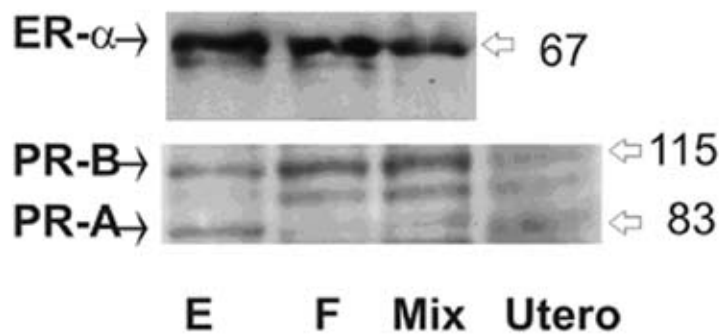


Figura 10. Caracterización de componentes de membrana basal.

Se determinó la expresión de laminina y colágeno IV por inmunofluorescencia en la línea celular LM05-Mix. Los componentes de membrana basal se detectaron asociados tanto a la población de aspecto epitelial como a la fibroblástica, con una mayor expresión de los mismos en la zona de interacción entre ambas poblaciones celulares. En ambos casos las marcaciones de membrana basal se ven en verde (FITC) y los núcleos en rojo. Aumentos: laminina 1000X y colágeno IV 400X.

A**Figura 11 A. Expresión de receptores hormonales en las líneas LM05-MIX, E y F.**

Se analizaron por Western blot extractos proteicos de las líneas LM05-Mix, E y F. Setenta microgramos de proteínas se sembraron por calle y tras ser corridas y transferidas a membranas de PVDF se incubaron con anticuerpos contra ER- α (Neomarkers y Santa Cruz) y PR (Novocastra). Las tres líneas resultaron positivas para ER- α y PR. Tanto la isoforma A como la B de PR se detectaron en las tres líneas, sin embargo los niveles de PR-A fueron muy bajos en las líneas MIX y F respecto de la E. Como control positivo para PR se utilizó extracto de útero.

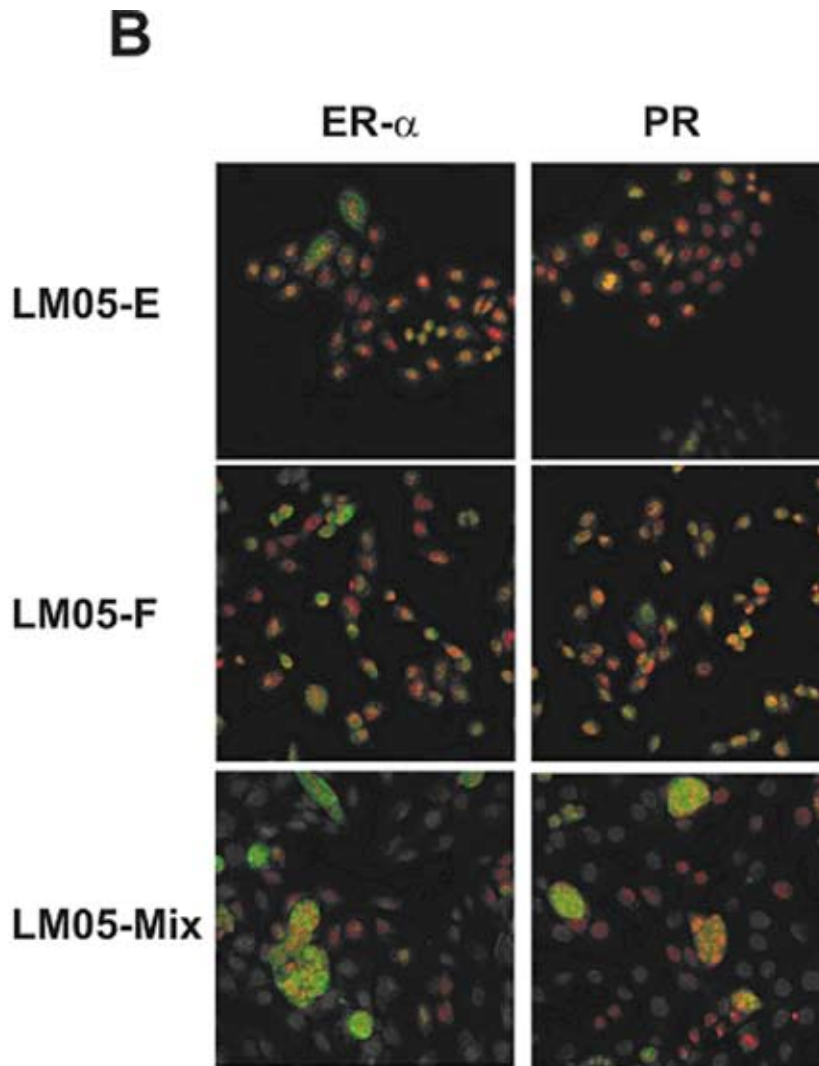


Figura10 B. Localización de receptores hormonales por inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Cultivos de células LM05-E, F y MIX se crecieron en medio DMEM/F12 + 10% SFB sobre vidrios. Se fijaron y marcaron con anticuerpos primarios contra ER- α (Santa Cruz), PR (Santa Cruz), seguidos de anticuerpos secundarios conjugados a FITC (verde). Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (rojo). Se pudo observar en las tres líneas la presencia de ER- α , y PR, tanto en localización citoplasmática como nuclear. Aumento original 400X.

Efecto de la vía del ER sobre la proliferación celular.

Una vez determinada la presencia de receptores hormonales, y dado que se trata de una línea derivada de un tumor hormono dependiente, se realizaron ensayos de proliferación para corroborar la funcionalidad de los mismos. La primera serie de experimentos fueron realizados con medio DMEM/F12 sin rojo fenol suplementado con ITS (insulina, transferrina selenito). A pesar de notar un efecto estimulador del estradiol, la significancia estadística de estos experimentos no resultó siempre reproducible. Por lo tanto se realizaron nuevos experimentos donde el ITS fue reemplazado por 1% SFBch. Las líneas LM05-MIX y LM05-E fueron respondedoras al estradiol (10^{-8} M) ya que se observó una estimulación respecto del control tratado solamente con 1% SFB. Con respecto al tratamiento con tamoxifeno, las líneas se comportaron de forma desigual: en la línea LM05-Mix el tamoxifeno (10^{-6} M) inhibió la proliferación celular pero no se observaron cambios ni deterioros en el cultivo. La línea LM05-E, por el contrario, presentó una importante inhibición de la proliferación con fenómenos de deterioro visibles en el cultivo. Finalmente, la línea LM05-F no fue tan respondedora como las otras dos, ya que los cambios observados con los diferentes tratamientos fueron muy leves. Desde el punto de vista estructural, la línea LM05-F no presentó ninguna clase de cambio ni deterioro frente al tratamiento con tamoxifeno (Figura 12).

Inducción de apoptosis por tamoxifeno: efecto protector de la población fibroblástica

A partir de los datos obtenidos de los ensayos de proliferación se quiso determinar si el tamoxifeno inducía apoptosis en las líneas LM05-MIX y LM05-E. Por medio de la técnica de TUNEL se analizó la presencia de células apoptóticas bajo diferentes condiciones (Figura 13). El agregado de tamoxifeno no sólo inhibió los efectos del estradiol sino que indujo apoptosis en la línea LM05-E, hecho que no ocurrió en

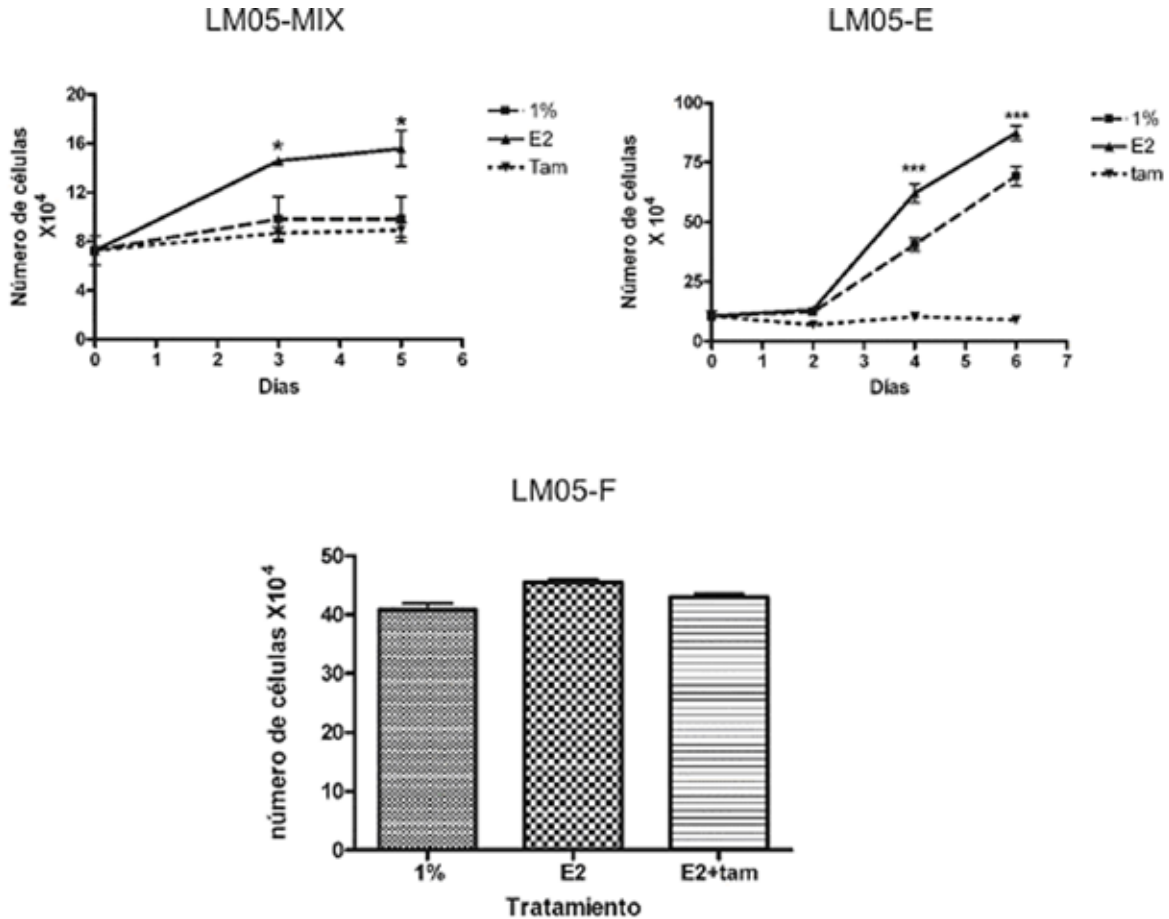


Figura 12. Efectos del estradiol y el tamoxifeno sobre la proliferación celular.

Se sembraron 250.000 células en placas de 35 mm en medio DMEM/F12 + 10% SFB. A las 24 hs se lavó dos veces con PBS y se reemplazó por DMEM/F12 sin rojo fenol. Se agregó al medio 1% SFBch (1%), 1% SFBch+ E2 (10^{-6} M) (E2), 1% SFBch+estradiol + Tamoxifeno (10^{-6} M) (Tam). Las células se lavaron dos veces con PBS, se tripsinizaron y se contaron con cámara de Neubauer cada 48 hs. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado. Se observó en la LM05-E una fuerte inhibición de la proliferación con el tratamiento con tamoxifeno y una estimulación con el agregado de estradiol. En la LM05-MIX se observó una estimulación con el estradiol y una inhibición de menor intensidad con el tamoxifeno. La línea LM05-F fue levemente afectada por los tratamientos; en este caso se muestra el recuento al día 6. Los resultados fueron analizados por ANOVA; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$ y ***: $p \leq 0.001$.

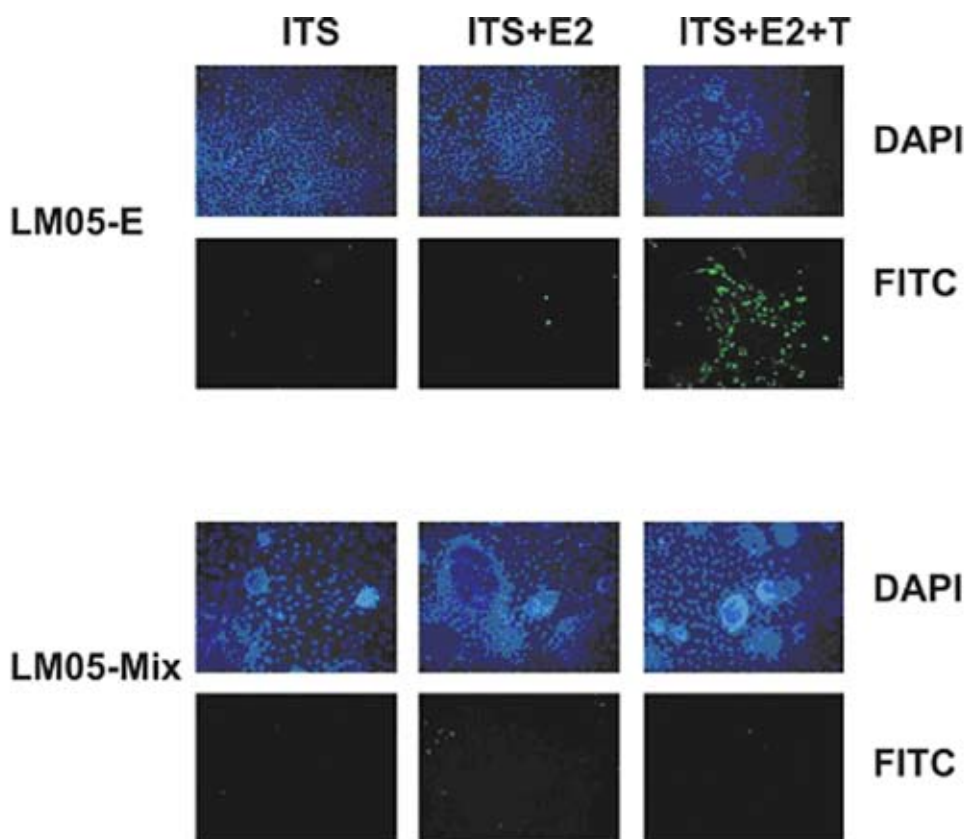


Figura 13. Detección de apoptosis por medio de la técnica de TUNEL.

Mediante la técnica de TUNEL se determinó la sensibilidad al tamoxifeno de la línea celular LM05-MIX y del clon LM05-E. Las células fueron cultivadas durante 48 horas en medio con ITS, ITS+ estradiol 10^{-8} M (ITS+E) e ITS+estradiol 10^{-8} M+ tamoxifeno 10^{-6} M (ITS+ E+ T). En el clon LM05-E se detectó un fuerte aumento en el número de células apoptóticas (marcadas en verde, FITC) en el grupo tratado con tamoxifeno. Sin embargo en la línea mixta LM05-MIX no se detectó un aumento de apoptosis, sugiriendo que las células fibroblásticas jugarían un rol en la resistencia de la población epitelial a la apoptosis. Los núcleos de todas las células fueron marcados con DAPI (azul). Aumento 400X.

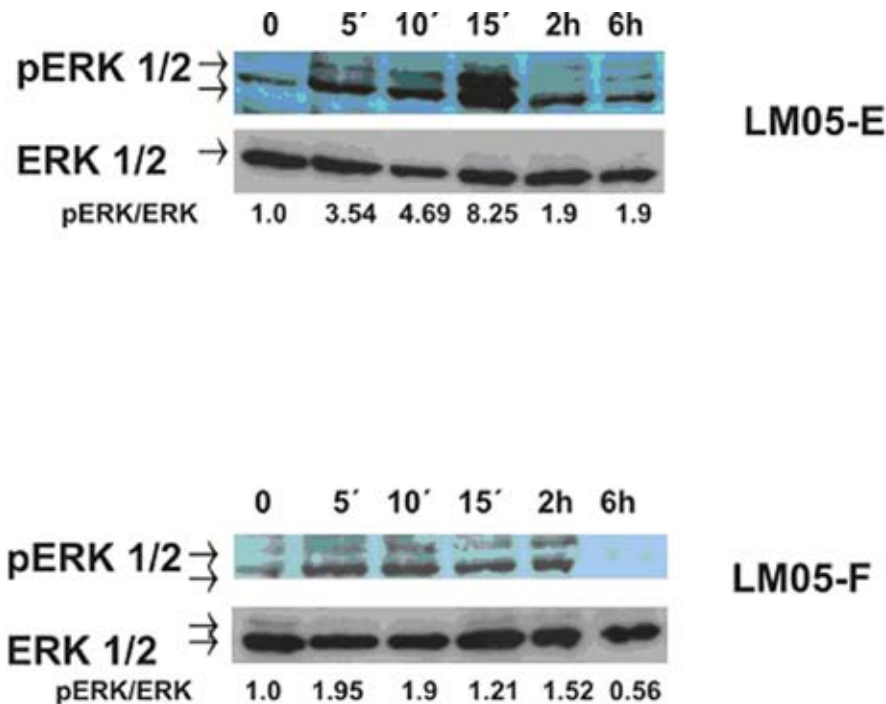


Figura 15. Estudio por Western blot de la respuesta no genómica al MPA.

Se crecieron células de las tres líneas en placas de 35 mm hasta lograr 80 % de confluencia. Después de 48 hrs de privación de suero se aplicaron pulsos de MPA (10^{-8} M). Se tomaron muestra a los 5', 10', 15', 2 h y 6 horas. Se extrajeron proteínas y se realizaron Western blots para determinar los niveles de p-ERK (Cell Signaling) y ERK (Cell Signaling). En los dos casos mostrados se observó un aumento de la fosforilación de ERK a partir de los 5 minutos, la cual decayó a las dos horas. No se observaron cambios en la línea LM05-MIX. Debajo de cada western blot se muestra el cociente del valor obtenido al densitometrar la banda correspondiente a pERK y ERK. Los valores fueron normalizados considerando como 1 al tiempo cero. En este caso solo se ha realizado un solo experimento por línea celular.

la línea LM05-MIX. Este resultado sugeriría que la población fibroblástica podría estar protegiendo a la epitelial del efecto apoptótico del tamoxifeno. Este estudio se llevó a cabo una vez lograda la confluencia ya que de no estar en contacto las diferentes poblaciones, no se observó la resistencia al tratamiento con tamoxifeno en la línea mixta. La línea LM05-E fue sensible tanto en confluencia como en ausencia de la misma.

Efectos a nivel no genómico del estradiol y el MPA.

Varios trabajos han demostrado que los receptores de estrógeno y de progesterona de membrana pueden ejercer efectos a nivel no genómico dentro de la célula (Levin, 2005; Faivre et al., 2005). Por lo general, estos efectos se evidencian a tiempos cortos, una vez que la hormona entra en contacto con el receptor de membrana. Basándonos en los resultados obtenidos, nos interesó investigar si algunos de los efectos no genómicos del estradiol y/o MPA se estaban llevando a cabo en el sistema LM05. Para ello se realizaron pulsos de estradiol y se analizó por *Western blot* los niveles de ERK 1/2 de las tres líneas celulares utilizando anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína fosforilada y la no fosforilada (Figura 14). Se observó en todos los casos un aumento en el nivel de fosforilación de ERK 1/2 a partir de los 5 minutos de tratamiento con una marcada disminución pasados los 15 minutos. Como control de siembra se utilizó la marcación contra ERK total para normalizar los valores obtenidos. Se estudió también el efecto de la activación de ERK por medio de la activación del receptor de progesterona. Se realizaron pulsos de MPA y se procedió de la forma ya descrita para la medición de ERK por método de Western blot. Se observó que los niveles de ERK fosforilados aumentaron a tiempos cortos y a las dos horas descendieron. Este efecto se observó en las líneas LM05-E y F, pero no hasta el momento en la MIX. No se ha estudiado aún el efecto del MPA sobre la proliferación celular de las líneas (Figura 15).

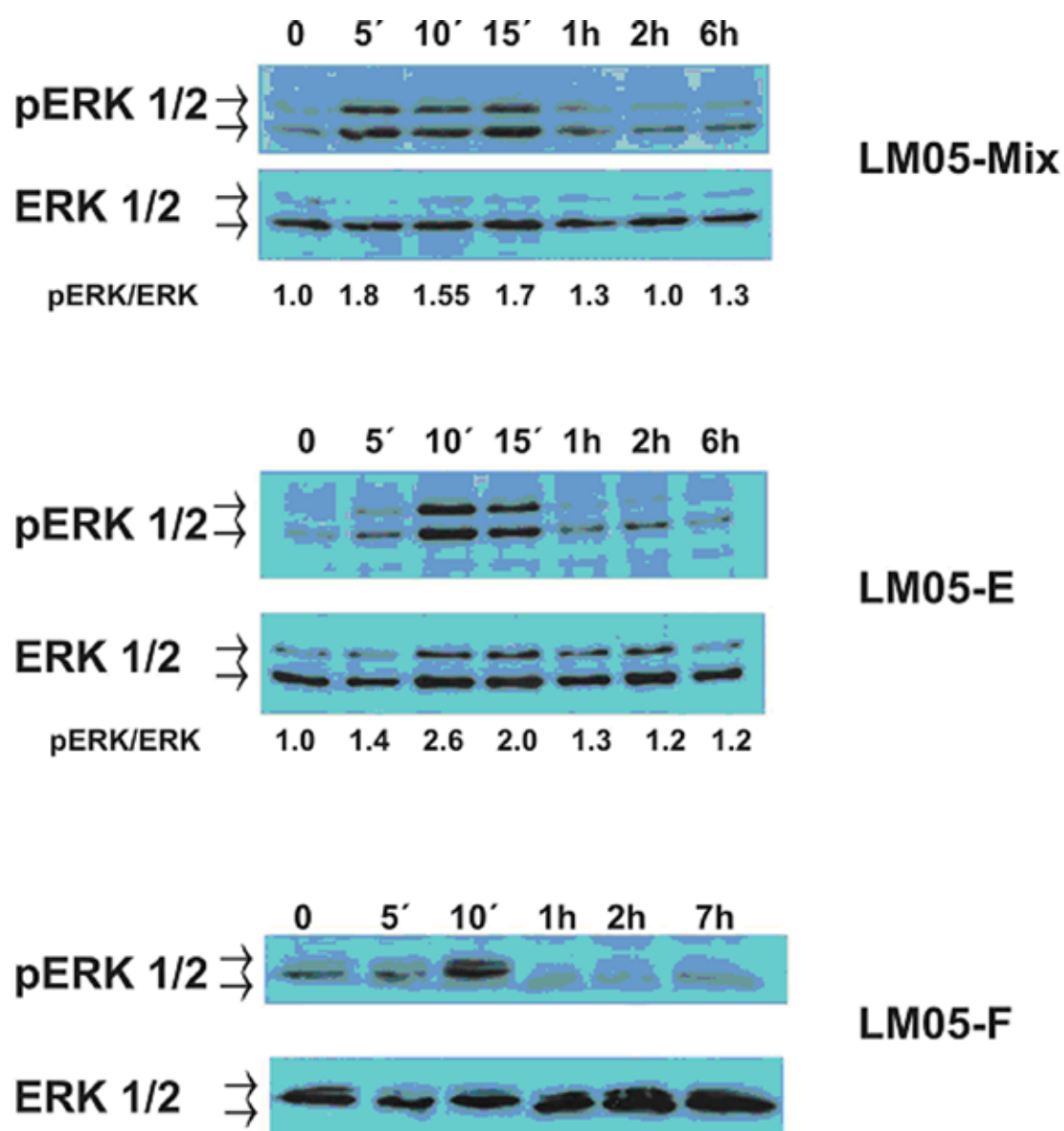


Figura 14. Estudio por Western blot de la respuesta no genómica al estradiol.

Se crecieron células de las tres líneas en placas de 35 mm hasta lograr 80 % de confluencia. Después de 48 hrs de privación de suero se aplicaron pulsos de estradiol (10^{-6} M). Se tomaron muestra a los 5', 10', 15', 1h, 2 h y 6 horas. Se extrajeron proteínas y se realizaron Western blots para determinar los niveles de p-ERK (Cell Signaling) y ERK (Cell Signaling). En los tres casos se observó un aumento de la fosforilación de ERK a partir de los 5 minutos, la cual decayó a la hora. Debajo de cada western blot se muestra el cociente del valor obtenido al densitometrar la banda correspondiente a pERK y ERK. Los valores fueron normalizados considerando como 1 al tiempo cero. En cada caso se muestra un experimento representativo de dos.

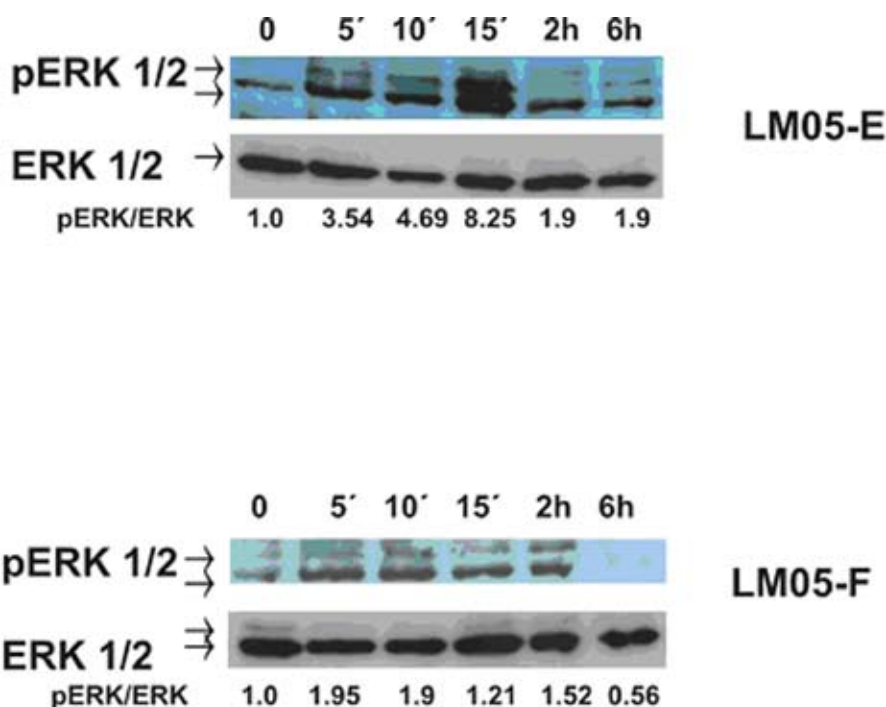


Figura 15. Estudio por Western blot de la respuesta no genómica al MPA.

Se crecieron células de las tres líneas en placas de 35 mm hasta lograr 80 % de confluencia. Después de 48 hrs de privación de suero se aplicaron pulsos de MPA (10^{-8} M). Se tomaron muestra a los 5', 10', 15', 2 h y 6 horas. Se extrajeron proteínas y se realizaron Western blots para determinar los niveles de p-ERK (Cell Signaling) y ERK (Cell Signaling). En los dos casos mostrados se observó un aumento de la fosforilación de ERK a partir de los 5 minutos, la cual decayó a las dos horas. No se observaron cambios en la línea LM05-MIX. Debajo de cada western blot se muestra el cociente del valor obtenido al densitometrar la banda correspondiente a pERK y ERK. Los valores fueron normalizados considerando como 1 al tiempo cero. En este caso solo se ha realizado un solo experimento por línea celular.

Tumorigenicidad de las líneas LM05

Para corroborar que la línea celular generada a partir del tumor M05 no hubiera perdido la tumorigenicidad, se realizaron ensayos *in vivo*, inoculando 400.000 células por ratón, de las diferentes líneas celulares, según se describe en materiales y métodos. Se observó que LM05-E no prendió ni en hembras ni en machos a diferencia de la línea LM05-MIX que solo prendió en hembras. LM05-F prendió tanto en hembras como en machos (Figura 16 A). Para averiguar si los tumores generados continuaban presentando un fenotipo hormono-dependiente, los mismos fueron transplantaron a ratones machos, hembras y hembras ovariectomizadas (Figura 16 B). Se observó que todos los tumores perdieron su dependencia hormonal ya que los trasplantes crecieron en todos los ratones.

Caracterización del tumor de la línea LM05

A partir de los tumores generados por la inoculación de las células LM05-MIX se realizaron inmunofluorescencias en cortes por congelación para estudiar si su morfología y los tipos celulares que los conformaban eran comparables al tumor parental M05 (Figura 17). Se observó que en los tumores generados por la línea LM05-MIX hubo una marcada disminución en la proporción de células epiteliales, lo cual se reflejó en la marcación contra citoqueratina 18 que se restringió sólo a un pequeño grupo células luminales. De la misma manera, la marcación contra citoqueratina 14 fue positiva en un pequeño grupo de células que mantuvieron una ubicación mayoritariamente basal. Se observó que en el tumor generado hubo un aumento marcado de la expresión de vimentina. Se realizaron análisis de los componentes de matriz extracelular y se observó, como en el tumor parental, un determinado grado de organización que fue mayor en el caso de la laminina. El estudio de receptores fue positivo para receptores de estrógeno α , β y RP.

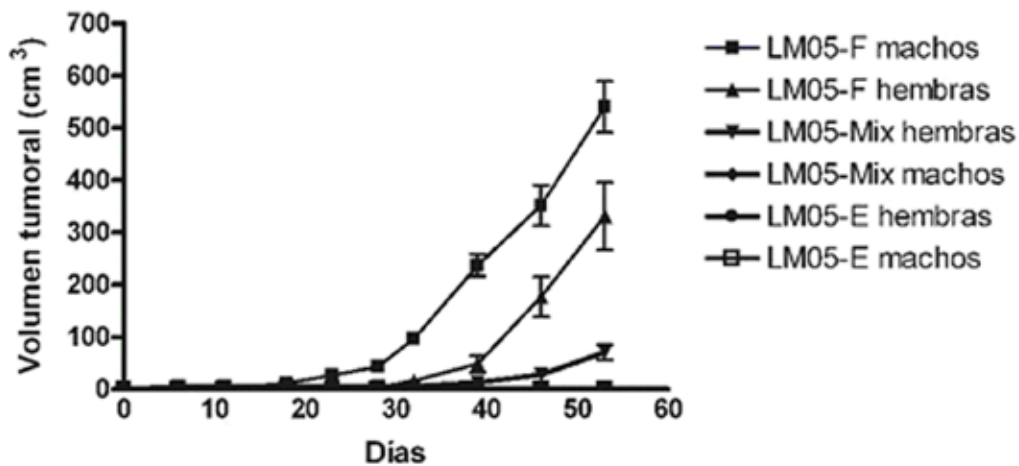


Figura 16a. Curva de crecimiento tumoral a partir de las líneas LM05.

Se evaluó la tumorigenicidad de las líneas LM05-MIX, -F y -E inoculando 400.000 células en ratones hembras y machos BALB/c (n=5 por grupo). Se observó que la línea LM05-MIX sólo creció en ratones hembras, la línea LM05-F creció tanto en hembras como en machos y la línea LM05-E no creció en ninguno de los dos casos. Se muestra un experimento representativo de dos.

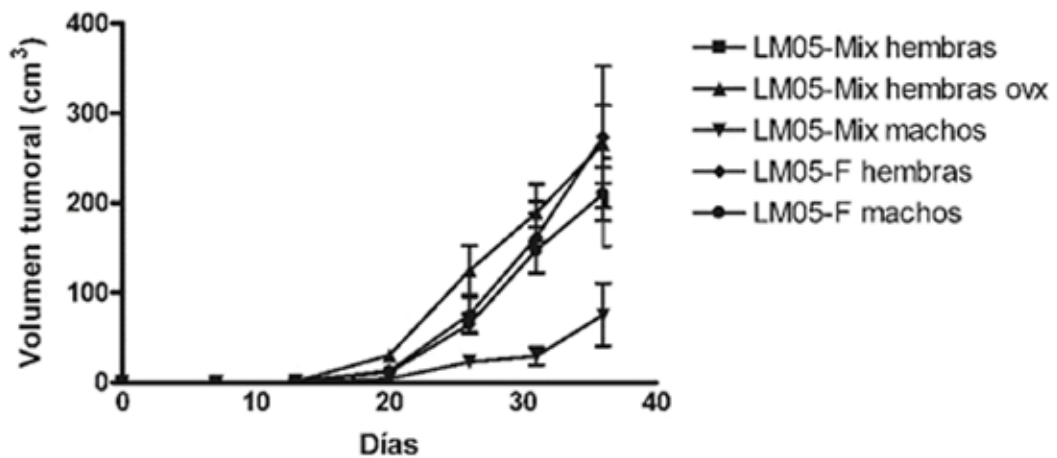


Figura 16b. Determinación de hormono-dependencia de tumores de la línea LM05 transplantados.

Los tumores generados por las líneas LM05-MIX y LM05-F (en hembras) se transplantaron a ratones hembras, hembras ovariectomizadas y machos. Se observó que en todos los casos, a diferencia del tumor parental, hubo crecimiento de los tumores, reflejando una pérdida de la hormono-dependencia. En cada grupo se inocularon 5 animales.

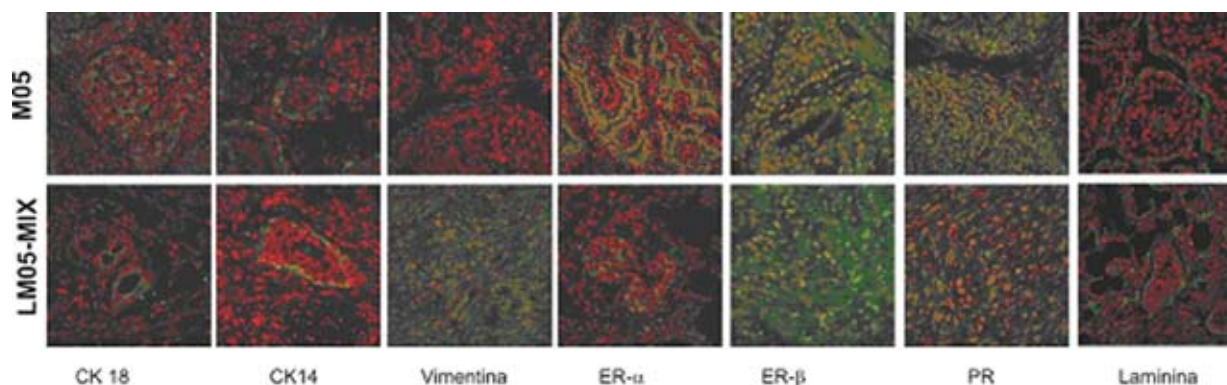


Figura 17. Comparación entre el tumor M05 y el tumor generado por la línea LM05-MIX.

Cortes por congelación del tumor parental M05 y del generado por la línea LM05-MIX fueron analizados por inmunofluorescencia y microscopía confocal. En todos los casos se muestra la marca en verde (FITC) y los núcleos en rojo (ioduro de propidio). Se marcó contra: citoqueratina 18 (CK18), citoqueratina 14 (CK14), vimentina, receptor de estrógeno- α y - β , receptor de progesterona y laminina. Aumento 400 y 600X.

Discusión

El objetivo de este trabajo fue caracterizar a la línea celular LM05-MIX y los clones derivados de ella, LM05-E y F. LM05-MIX deriva del tumor de mama murino M05. En trabajos previos se había caracterizado su comportamiento estrógeno dependiente (Piudo et al., 1998), sin embargo no se habían analizado los marcadores de estirpe celular para entender el fenotipo de las poblaciones celulares que componen el tumor. Este trabajo, en conjunto con la caracterización de las líneas, nos permitió establecer hasta que punto las líneas representan al tumor parental. Nuestro trabajo demuestra que las líneas celulares derivadas de M05 mantienen la expresión de receptores hormonales y la respuesta tanto al estradiol como al tamoxifeno. De sumo interés resultó el hecho de que LM05 se haya generado como una línea mixta, donde junto con la población epitelial se identificó otra positiva para marcadores fibroblásticos. El hecho de haber clonado ambas poblaciones para generar las líneas LM05-E y F brinda una herramienta de trabajo para el estudio de las interacciones epitelio-mesenquimáticas en el contexto de la hormona-dependencia y resistencia. Dada la falta de modelos de cáncer de mama hormono-respondedores, la caracterización de este sistema es interesante ya que aporta una nueva herramienta para el estudio de los mecanismos involucrados.

El tumor mamario murino M05 se generó espontáneamente en una hembra virgen de la cepa BALB/c en el bioterio del Instituto "Angel H. Roffo". El mismo presentó un comportamiento estrógeno dependiente hasta el pasaje 8 (Piudo et al., 1998). El estudio de los marcadores de estirpe celular en pasajes inferiores al 8 permitió establecer que el componente epitelial fue positivo para citoqueratina 18, marcador de células luminales en la glándula mamaria del ratón. Por otra parte se encontró una población de distribución mayormente basal, positiva para citoqueratina 14, y también en esta posición se detectaron células vimentina positivas. No hemos realizado la doble marcación para establecer si la misma población celular expresa los dos marcadores, aunque se ha determinado por otros autores que células mioepiteliales tanto de glándula mamaria normal como tumoral expresan vimentina (Petersen et al., 2003). A partir del tumor se generó la línea celular que presentó dos poblaciones celulares: una de aspecto epitelial y la otra fibroblástica. Se observó que mientras que en el tumor parental la marcación con citoqueratina 18 fue positiva en la mayoría de las células de tipo epitelial, no ocurrió lo mismo con la marcación en la línea celular aislada, ya que sólo un pequeño grupo de células resultaron positivas. Por otra parte se observó un enriquecimiento de la población que expresa citoqueratina 14 en la línea. Esto puede indicar un enriquecimiento en la población mioepitelial basal existente en el tumor en el proceso de establecimiento de la línea celular continua. Aún no se ha determinado, por doble marcación, la presencia de receptores de estrógeno- α y de progesterona en la población positiva para citoqueratina 14 en el tumor parental, pero se ha determinado la presencia de los mismos en la línea celular. En la glándula mamaria del ratón las células mioepiteliales son negativas para receptor de estrógeno- α y para receptor de progesterona (Shyamala et al., 2002). Esto sugeriría que en el tumor hay células que presentan características de ambas estirpes celulares, luminal

y mioepitelial. Esto resulta interesante en el contexto de que en muestras tumores de mama humanos se ha encontrado una asociación entre la expresión de marcadores basales como la citoqueratina 14, expresión de receptor de estrógeno- α y mutación en el gen BRCA1 (Lakhani et al., 2005). La población de aspecto fibroblástica de la línea mixta, y la línea LM05-F, resultaron positivas para vimentina y actina de músculo liso, y negativas para citoqueratinas. Sin embargo se detectó la presencia de receptores de estrógeno- α y de progesterona. En la glándula mamaria del ratón el estroma es positivo para receptores de estrógeno, pero negativo para receptor de progesterona (Shyamala et al., 2002). Esta discrepancia podría sugerir que la población F se originó de una célula epitelial que se transdiferenció. Estudios citogenéticos permitirán establecer si ambas poblaciones están emparentadas, y por otra parte análisis por microscopía electrónica determinarán si la población F es realmente fibroblástica o no. Por último se encontró expresión de componentes de membrana basal como la laminina y el colágeno IV tanto en el tumor M05, como en la línea LM05-MIX. En particular, en ambos casos se evidenció mayor marcación de estos componentes en las zonas de interacción epitelio-estroma.

Los ensayos de inmunofluorescencia así como los estudios de Western Blot nos permitieron concluir que las líneas celulares LM05 expresan receptores de estrógeno- α y receptores de progesterona. Estos resultados son de suma importancia ya que actualmente no se cuenta con un gran número de modelos murinos que presenten ambos receptores. Información acumulada de un gran número de investigaciones revelaron que la presencia de receptores en tumores de mama humanos están distribuidos en: 50-60% son ER+/PR+; 13-20% son ER+/PR-; 5-15% son ER-/PR+ y 15-25% son ER-/PR-, mientras que la presencia de los mismos en las líneas celulares utilizadas no mantiene esta relación. Sólo un 20% de las líneas son ER+/PR+; 7% son ER+/PR-, 5% son ER-/PR+ y el 68% son ER-/PR- (Lacroix and Leclercq, 2004).

Otra particularidad de la línea celular caracterizada en nuestro laboratorio es que presenta dos poblaciones de fenotipo diferente. Son pocas las líneas que presentan esta característica y que son utilizadas para investigación. Este hecho en particular hace que la LM05 sea una muy buena herramienta para estudiar interacciones celulares dentro de un tumor. Es sabido que el microambiente y las interacciones epitelio-estroma tienen una gran importancia en el desarrollo y progresión tumoral. Estos procesos son altamente dependientes de interacciones entre las células malignas y otras células vecinas, mediados tanto por contacto directo como por señalización paracrina. En varios modelos experimentales se observó que el microambiente afectó la formación tumoral, la tasa de crecimiento tumoral, el alcance de invasividad y la habilidad para metastatizar (Maffini et al, 2004; Shekhar et al., 2003). Estos estudios demuestran la importancia de desarrollar nuevos modelos en los que se puedan estudiar estas interacciones que por el momento son poco conocidas. Actualmente se encuentran descritos dos sistemas murinos donde se cuenta con líneas celulares continuas que expresan receptores hormonales: MC4, MC7 y un segundo sistema MXT. Ambos sistemas poseen receptores hormonales, tanto de estrógeno como de progesterona. En el caso del primero las líneas se originaron de tumores inducidos y dependiente de progestágenos (Lanari et al., 2001). Por otro lado, el sistema MXT, que es derivado de un carcinoma de mama murino inducido por uretano (Watson et al., 1979), presenta una morfología fibroblastoidea y es sensible al tamoxifeno (Bernhardt et al., 2002). Sin embargo, la mayoría de las publicaciones relacionadas con el cáncer de mama hormono-responder utilizan las líneas MCF-7, T-47-D, que son derivadas de tejido metastático de carcinoma invasivo ductal y presentan receptores hormonales.

Con respecto a la respuesta hormonal, los tratamientos con estradiol estimularon la proliferación celular de las líneas LM05-MIX y E, mientras que el tamoxifeno tuvo un efecto inhibitorio. Esto no ocurrió en la línea F en la que sólo se observaron efectos muy leves con ambos compuestos. El tamoxifeno indujo apoptosis en la línea E, fenómeno que no se observó en la línea mixta, resultado que sugeriría un rol protector por parte de la población F sobre la E. Se ha descrito que los fibroblastos aislados de carcinoma podrían promover carcinogénesis mamaria y la progresión tumoral (Kuperwasser et al., 2004). Sin embargo hasta el momento no hay estudios que analicen el papel del estroma en la adquisición de resistencia a tratamientos hormonales. Estudios por Western Blot sugieren que esta resistencia por parte de la línea mixta podría estar mediada por una fosforilación constitutiva del receptor de estrógeno, ya que observamos un mayor grado de fosforilación en la línea mixta respecto de las otras dos líneas. Se ha demostrado por otros autores, que existe un cross-talk entre el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el ER que lleva a la activación del receptor estrogénico por fosforilación en la serina 118 sin que éste este unido a su ligando (Gee et al., 2005; Arteaga, 2003). No hemos determinado todavía con anticuerpos específicos si lo que observamos se trata de fosforilación en esta serina específica en nuestro modelo. Trabajos publicados también relacionan esta resistencia con otras vías, como por ejemplo la del factor de crecimiento de hepatocitos, en la que Akt estaría involucrada (Frogne et al., 2005). Para poder identificar cuáles son las vías responsables de la resistencia al tratamiento con tamoxifeno en la línea LM05-MIX se realizarán ensayos con inhibidores específicos de cada una de las vías de señalización, y

por otra parte determinaremos utilizando los clones LM05-E y F si la resistencia está mediada por factores solubles o si es necesaria la interacción física entre ambos tipos celulares.

La fosforilación de ERK1/2 tras tratamientos cortos con estradiol o progesterona sugieren la presencia de receptores hormonales de membrana en nuestro sistema celular. Se observó que tratamientos con estradiol durante 5 a 15 minutos inducen la fosforilación de ERK. El efecto fue observado en las tres líneas celulares. Con respecto a la progesterona, sólo se observó en experimentos preliminares activación de ERK en las líneas E y F, pero no en la mixta. Se deberán repetir estos experimentos para corroborar el resultado. Otros autores han demostrado que en células MCF-7 la activación rápida de ERK por estradiol es mediada por la activación del receptor de EGF (Levin, 2005). Dada la interacción que existe entre EGFR e integrina como la beta 1 (Wang et al., 1998) y la resistencia a la apoptosis (Weaver et al., 2002), este modelo resulta interesante para encarar en el futuro el estudio de un posible rol de los receptores de membrana en la resistencia al tamoxifeno con eventual interacción con EGFR e integrinas.

Para determinar si las líneas celulares generaban tumores similares al parental, se inocularon ratones con 400.000 células de cada línea. La línea LM05-MIX sólo generó tumores en hembras, mientras que la F generó tumores tanto en hembras como en machos. No se observaron tumores en ratones inoculados con la línea E. Análisis de los tumores generados por la línea LM05-MIX revelaron que los mismos presentaban un bajo porcentaje de células epiteliales con presencia de algunos grupos apoptóticos (dato no mostrado) y alta proporción de células ahusadas, vimentina positivas. A pesar de estar en bajo número, las células epiteliales se organizaron como en el tumor parental, estando las citoqueratina 18 en posición luminal y las 14 positivas en posición basal. Se detectó presencia de receptores hormonales tanto en la población epitelial como en la estromal. Los tumores generados por la F fueron poco diferenciados, citoqueratina negativos y vimentina positivos como era de esperar. Se observó la presencia de receptores de estrógeno α , β y de progesterona. No hemos inoculado la línea E en ratones tratados con estradiol. Creemos que en este contexto tal vez se obtengan tumores. Dada la alta sensibilidad de la línea E al tamoxifeno, es probable que sea muy dependiente de la vía del receptor de estrógeno para sobrevivir. Si esto es así, esperaríamos encontrar desarrollo de tumores en ratones hembra tratados con estradiol. Otro factor a tener en cuenta es la alta proporción de células citoqueratina 14 positivas en la línea celular, lo cual no se traslada al tumor parental. Esto podría tener un impacto en su capacidad tumorigénica. Finalmente, la hormono-dependencia de la línea LM05-MIX que sólo generó tumores en hembras no se mantuvo al pasar estos tumores a ratones macho o hembras ovariectomizadas. En estos dos grupos, como en las hembras intactas, se generaron tumores. No hemos analizado la composición celular de estos tumores, pero es probable que allí encontremos una explicación a este fenotipo.

Conclusión

En este trabajo se caracterizó a la línea celular LM05-MIX, y los clones LM05-E y LM05-F, derivados del tumor mamario murino M05. Nuestros resultados presentan una nueva herramienta para el estudio de los mecanismos involucrados en la respuesta del cáncer de mama hormono-dependiente tanto al estradiol como al tamoxifeno, y sugieren un papel de la interacción epitelio-estroma en la adquisición de la resistencia al tratamiento hormonal.

Bibliografía

Referencias

1. Programa Nacional de Estadística de Salud. Dirección de Estadística en informaciones de salud, MINISTERIO DE SALUD. Mortalidad por tumores malignos, 1993-1996 y 1997-2000. *Boletín Nro 96. 2002.*
2. Arteaga, C. 2003. Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin. Oncol.* 30:3-14.
3. Bernhardt, G., K.Beckenlehner, T.Spruss, R.Schlemmer, H.Reile, and H.Schonenberger. 2002. Establishment and characterization of new murine breast cancer cell lines. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 335:55-68.
4. Bunone, G., P.A.Briand, R.J.Miksicek, and D.Picard. 1996. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 15:2174-2183.
5. Campbell, R.A., P.Bhat-Nakshatri, N.M.Patel, D.Constantinidou, S.Ali, and H.Nakshatri. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J. Biol. Chem.* 276:9817-9824.
6. Clark, A.S., K.West, S.Streicher, and P.A.Dennis. 2002. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 1:707-717.
7. Faivre, E., A.Skildum, L.Pierson-Mullany, and C.A.Lange. 2005. Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids* 70:418-426.
8. Frasor, J., J.M.Danes, B.Komm, K.C.Chang, C.R.Lytle, and B.S.Katzenellenbogen. 2003. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 144:4562-4574.
9. Frogne, T., J.S.Jepsen, S.S.Larsen, C.K.Fog, B.L.Brockdorff, and A.E.Lykkesfeldt. 2005. Antiestrogen-resistant human breast cancer cells require activated protein kinase B/Akt for growth. *Endocr. Relat Cancer* 12:599-614.
10. Gee, J.M., J.F.Robertson, E.Gutteridge, I.O.Ellis, S.E.Pinder, M.Rubini, and R.I.Nicholson. 2005. Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocr. Relat Cancer* 12 Suppl 1:S99-S111.
11. Gutierrez, M.C., S.Detre, S.Johnston, S.K.Mohsin, J.Shou, D.C.Allred, R.Schiff, C.K.Osborne, and M.Dowsett. 2005. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Clin. Oncol.* 23:2469-2476.
12. Harris, J.R., M.E.Lippman, U.Veronesi, and W.Willett. 1992. Breast cancer (3). *N. Engl. J. Med.* 327:473-480.
13. Hulka, B.S., E.T.Liu, and R.A.Lininger. 1994. Steroid hormones and risk of breast cancer. *Cancer* 74:1111-1124.
14. Hunter, D.J., D.Spiegelman, H.O.Adami, L.Beeson, P.A.van den Brandt, A.R.Folsom, G.E.Fraser, R.A.Goldbohm, S.Graham, G.R.Howe, and . 1996. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *N. Engl. J. Med.* 334:356-361.
15. Jeng, M.H., W.Yue, A.Eischeid, J.P.Wang, and R.J.Santen. 2000. Role of MAP kinase in the enhanced cell proliferation of long term estrogen deprived human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 62:167-175.
16. Joel, P.B., J.Smith, T.W.Sturgill, T.L.Fisher, J.Blenis, and D.A.Lannigan. 1998. pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol. Cell Biol.* 18:1978-1984.
17. Kato, S., H.Endoh, Y.Masuhiro, T.Kitamoto, S.Uchiyama, H.Sasaki, S.Masushige, Y.Gotoh, E.Nishida, H.Kawashima, D.Metzger, and P.Chambon. 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270:1491-1494.
18. Knowlden, J.M., I.R.Hutcheson, H.E.Jones, T.Madden, J.M.Gee, M.E.Harper, D.Barrow, A.E.Wakeling, and R.I.Nicholson. 2003. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 144:1032-1044.
19. Kuiper, G.G., E.Enmark, M.Pelto-Huikko, S.Nilsson, and J.A.Gustafsson. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:5925-5930.

20. Kuperwasser, C., T.Chavarria, M.Wu, G.Magrane, J.W.Gray, L.Carey, A.Richardson, and R.A.Weinberg. 2004. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:4966-4971.
21. Kurokawa, H., A.E.Lenferink, J.F.Simpson, P.I.Pisacane, M.X.Sliwkowski, J.T.Forbes, and C.L.Arteaga. 2000. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* 60:5887-5894.
22. Kushner, P.J., D.A.Agard, G.L.Greene, T.S.Scanlan, A.K.Shiau, R.M.Uht, and P.Webb. 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74:311-317.
23. Lacroix, M. and G.Leclercq. 2004. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res. Treat.* 83:249-289.
24. Lakhani, S.R., J.S.Reis-Filho, L.Fulford, F.Penault-Llorca, d.van, V, S.Parry, T.Bishop, J.Benitez, C.Rivas, Y.J.Bignon, J.Chang-Claude, U.Hamann, C.J.Cornelisse, P.Devilee, M.W.Beckmann, C.Nestle-Kramling, P.A.Daly, N.Haites, J.Varley, F.Laloo, G.Evans, C.Maugard, H.Meijers-Heijboer, J.G.Klijn, E.Olah, B.A.Gusterson, S.Pilotti, P.Radice, S.Scherneck, H.Sobol, J.Jacquemier, T.Wagner, J.Peto, M.R.Stratton, L.McGuffog, and D.F.Easton. 2005. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin. Cancer Res.* 11:5175-5180.
25. Lanari, C., I.Luthy, C.A.Lamb, V.Fabris, E.Pagano, L.A.Helguero, N.Sanjuan, S.Merani, and A.A.Molinolo. 2001. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Res.* 61:293-302.
26. Levin, E.R. 2005. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol. Endocrinol.* 19:1951-1959.
27. Longnecker, M.P., P.A.Newcomb, R.Mittendorf, E.R.Greenberg, R.W.Clapp, G.F.Bogdan, J.Baron, B.MacMahon, and W.C.Willett. 1995. Risk of breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:923-929.
28. Madigan, M.P., R.G.Ziegler, J.Benichou, C.Byrne, and R.N.Hoover. 1995. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:1681-1685.
29. Maffini, M.V., A.M.Soto, J.M.Calabro, A.A.Ucci, and C.Sonnenschein. 2004. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J. Cell Sci.* 117:1495-1502.
30. Martin, L.A., I.Farmer, S.R.Johnston, S.Ali, C.Marshall, and M.Dowsett. 2003. Enhanced estrogen receptor (ER) alpha, ERBB2, and MAPK signal transduction pathways operate during the adaptation of MCF-7 cells to long term estrogen deprivation. *J. Biol. Chem.* 278:30458-30468.
31. Masamura, S., S.J.Santner, D.F.Heitjan, and R.J.Santen. 1995. Estrogen deprivation causes estradiol hypersensitivity in human breast cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 80:2918-2925.
32. McKenna, N.J., R.B.Lanz, and B.W.O'Malley. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20:321-344.
33. Nicholson, R.I., I.R.Hutcheson, J.M.Knowlden, H.E.Jones, M.E.Harper, N.Jordan, S.E.Hiscox, D.Barrow, and J.M.Gee. 2004. Nonendocrine pathways and endocrine resistance: observations with antiestrogens and signal transduction inhibitors in combination. *Clin. Cancer Res.* 10:346S-354S.
34. Nilsson, S., S.Makela, E.Treuter, M.Tujague, J.Thomsen, G.Andersson, E.Enmark, K.Pettersson, M.Warner, and J.A.Gustafsson. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81:1535-1565.
35. Petersen, O.W., H.L.Nielsen, T.Gudjonsson, R.Villadsen, F.Rank, E.Niebuhr, M.J.Bissell, and L.Ronnov-Jessen. 2003. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am. J. Pathol.* 162:391-402.
36. Piudo, L., T.Manzur, C.Rey Moreno, C.Garcia, and S.Klein. Caracterización de un nuevo tumor de mama murino espontáneo hormonodependiente (M05). *Medicina* 58[5/2]. 1998.
Ref Type: Abstract
37. Saunders, P.T. 1998. Oestrogen receptor beta (ER beta). *Rev. Reprod.* 3:164-171.
38. Shekhar, M.P., R.Pauley, and G.Heppner. 2003. Host microenvironment in breast cancer development: extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast Cancer Res* 5:130-135.
39. Shou, J., S.Massarweh, C.K.Osborne, A.E.Wakeling, S.Ali, H.Weiss, and R.Schiff. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 96:926-935.
40. Shyamala, G., Y.C.Chou, S.G.Louie, R.C.Guzman, G.H.Smith, and S.Nandi. 2002. Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: regulation by hormones, development and aging. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80:137-148.

41. Smith, C.L., Z.Nawaz, and B.W.O'Malley. 1997. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* 11:657-666.
42. Stephen, R.L., L.E.Shaw, C.Larsen, D.Corcoran, and P.D.Darbre. 2001. Insulin-like growth factor receptor levels are regulated by cell density and by long term estrogen deprivation in MCF7 human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 276:40080-40086.
43. Tora, L., J.White, C.Brou, D.Tasset, N.Webster, E.Scheer, and P.Chambon. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477-487.
44. Tsai, M.J. and B.W.O'Malley. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63:451-486.
45. Wang, F., V.M.Weaver, O.W.Petersen, C.A.Larabell, S.Dedhar, P.Briand, R.Lupu, and M.J.Bissell. 1998. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:14821-14826.
46. Watson, C.S., D.Medina, and J.H.Clark. 1979. Characterization and estrogen stimulation of cytoplasmic progesterone receptor in the ovarian-dependent MXT-3590 mammary tumor line. *Cancer Res* 39:4098-4104.
47. Weaver, V.M., S.Lelievre, J.N.Lakins, M.A.Chrenek, J.C.Jones, F.Giancotti, Z.Werb, and M.J.Bissell. 2002. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2:205-216.
48. Witters, L.M., S.M.Santala, L.Engle, V.Chinchilli, and A.Lipton. 2003. Decreased response to paclitaxel versus docetaxel in HER-2/neu transfected human breast cancer cells. *Am. J. Clin. Oncol.* 26:50-54.