

# BECAS DE FORMACIÓN INICIAL EN INVESTIGACIÓN EN CÁNCER

(2014-2015)

*Informes Finales*  
*Cuarta Cohorte de becarios*

---

Coordinación de Investigación



INC  
Instituto  
Nacional  
del Cáncer



Ministerio de Salud  
Presidencia de la Nación





## **AUTORIDADES**

### **Presidente de la Nación**

Ing. Mauricio Macri

### **Ministro de Salud de la Nación**

Dr. Jorge Daniel Lemus

### **Director**

Dr. Roberto N. Pradier

### **Coordinadora Técnica**

Dra. Julia Ismael

### **Coordinadora Administrativa**

Lic. Nahir Elyeche

### **Coordinadora del Área de Investigación**

Dra. Andrea Llera

Lic. Luciana Sánchez | Rocío Alonso | Laura Mariño

## PRÓLOGO

Constituye una de las funciones esenciales del INC, a través de la meritoria labor de la Coordinación de Investigación apoyar las investigaciones en ciencias biomédicas y sociales relacionadas con el cáncer.

El estímulo a investigadores, particularmente a los más jóvenes, trabajando en instituciones dotados de los medios necesarios para llevar a cabo el propósito de sus becas o subsidios es un medio idóneo para contribuir a formar la masa crítica necesaria para la adquisición del conocimiento original en nuestro medio.

Es necesario manifestar nuestro reconocimiento a las instituciones que han dado su consenso y colaboración para llevar a cabo los estudios particularmente los básicos, de los beneficiarios de nuestro estímulo.

Cabe observar un franco predominio de las investigaciones básicas y es esperable que un número apreciable de sus resultados pueda trasladarse a aplicaciones clínicas.

Solo cuatro estudios se ocuparon de investigación clínica en tres tipos de tumores de importancia numérica dispar y menos de la cuarta parte se orientaron hacia la epidemiología o temas de importancia social.

Sería deseable que en lo sucesivo se pueda disponer de más fondos para estimular estos proyectos y asimismo que desde el INC se formulen propuestas tendientes a orientar las investigaciones a temas en consonancia con la labor del Instituto y el propósito de prevenir, diagnosticar a tiempo y hacer más llevadera la vida de los pacientes con cáncer.



Dr. Roberto N. Pradier  
Director INC (2016)

## ÍNDICE

### BÁSICA

GENERACIÓN DE MODELOS EXPERIMENTALES DE CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS SOBREENPRESANDO LAS ISOFORMAS DE RECEPTOR DE PROGESTERONA A O B PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE PROGESTÁGENOS/ANTIPROGESTÁGENOS SOBRE EL PROCESO METASTÁSICO. <b>Michelle Marilyn ALVAREZ</b>	8
MODULACIÓN EJERCIDA POR HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LAS CÉLULAS ESTROMALES/MADRE MESENQUIMALES DENTRO DEL ENTORNO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL. <b>Mariana Andrea AMORÓS</b>	21
RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA S100A9 Y DE SU REGULACIÓN POR ÓXIDO NÍTRICO (NO) <b>Natalia P. Balarino</b>	29
ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN LA ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A LA TERAPIA ENDOCRINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE MAMA. <b>Melina Elena Bilinski</b>	38
ESTUDIO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN FORKHEAD BOX (FOX) EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA. <b>Javier Nahuel Brandani</b>	51
GENOMA MITOCONDRIAL Y METILACIÓN GÉNICA NUCLEAR EN TUMORES MAMARIOS HUMANOS. <b>Lucía Cané</b>	63
LOS EFECTOS PROLIFERATIVOS DE LOS PROGESTÁGENOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA REQUIEREN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE LA METIL-TRANSFERASA DE HISTONAS EZH2. <b>Mauro Ezequiel Cenciarini</b>	74
EFFECTO MODULADOR DEL CONSUMO DE YERBA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS) SOBRE EL COMPROMISO NEUROLÓGICO PRODUCIDO POR CÁNCER DE PULMÓN EN RATONES. <b>María Cecilia Cittadini</b>	84
VALIDACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE UN ANTICUERPO BIOSIMILAR A RITUXIMAB. <b>Héctor Adrián Cuello</b>	93
PARTICIPACIÓN DE RSPO3 EN EL DESARROLLO DE TUMORES MAMARIOS DE FENOTIPO BASAL. <b>Carla M. Felcher</b>	104
REGULACIÓN DE HSP27 MEDIANTE MIRNAS EN CÁNCER DE MAMA. <b>Martín Eduardo Guerrero Giménez</b>	114
ESTUDIO DE LA RADIOQUIMIRESISTENCIA EN EL CÁNCER COLORRECTAL: DISEÑO Y DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE SENSIBILIZACIÓN A LOS TRATAMIENTOS. <b>Rodrigo Lloyd</b>	127
CÉLULAS MADRE CON PLURIPOTENCIALIDAD INDUCIDA PARA EL MODELADO DE LA INICIACIÓN Y PROGRESIÓN TUMORAL EN MAMA. <b>María Paula Marks</b>	139
IMPORTANCIA DEL MICROAMBIENTE ESTROMAL, EN PARTICULAR DE LA CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y DE LA CÉLULA TUMORAL EN LA EVOLUCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA. PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES Y DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN LA EVOLUCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA. <b>Ayelén Matas</b>	148
EFFECTOS DE NUTRIENTES LIPOSOLUBLES SOBRE CÉLULAS CANCEROSAS DE MAMA HUMANAS. <b>Florencia Natalí Moreno Pascal</b>	164
CONTROL DE LH SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA VÍA SRC/FAK/PAXILLIN Y CORTACTIN/CDC-42/N-WASP. <b>Flavia Judith Neira</b>	175
ESTUDIO DEL POTENCIAL EFECTO RADIOSENSIBILIZADOR DE LIGANDOS DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA HUMANO. <b>Melisa Beatriz Nicoud</b>	186
ABORDAJE PROTEÓMICO Y BIOINFORMÁTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. ABORDAJE BIOINFORMÁTICO DEL INTERACTOMA DE HEMOXIGENASA-1 (HO-1). <b>Emiliano Germán Ortíz</b>	198
INESTABILIDAD CROMOSÓMICA INDUCIDA POR ETOPÓSIDO EN CÉLULAS HUMANAS DEFICIENTES EN ATM: IMPLICANCIA DE LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN EN LA INICIACIÓN DE UN PROCESO TUMORIGÉNICO. <b>Micaela Palmitelli</b>	215
EFFECTOS NO GENÓMICOS DE 17B-ESTRADIOL EN LA MOTILIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA VIA C-SRC/FAK/PAXILLINA. <b>Jorge Eduardo Shortrede</b>	228

ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD Y TOXICIDAD IN VIVO DE NUEVAS DROGAS O SUS ASOCIACIONES CON POTENCIAL APLICACIÓN AL TRATAMIENTO DE PACIENTES RECAÍDOS/REFRACTARIOS CON RETINOBLASTOMA. <b>Úrsula Andrea Winter</b>	237
EL TEJIDO ADIPOSO COMO INTERMEDIARIO ENTRE LOS ESTADOS TIROIDEOS Y EL CÁNCER DE MAMA. <b>Leila Ester Zyla</b>	250

### **CLÍNICA**

RELACIÓN CÉLULA TUMORAL-MICROAMBIENTE EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE BCL-2 Y BECLIN-1 EN LA MUERTE CELULAR O SOBREVIDA INDUCIDA POR AUTOFAGIA. <b>Melina Del Valle Cloquell</b>	263
EXPERIENCIA EN DIAGNÓSTICO Y ASESORAMIENTO GENÉTICO EN CÁNCER HEREDITARIO PEDIÁTRICO EN UN HOSPITAL PÚBLICO EN ARGENTINA. <b>Marina Laura García de Rosa</b>	273
BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA POSITIVO PARA RECEPTORES HORMONALES. <b>Cecilia Perrone</b>	283
CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE BIOPSIAS DE CÁNCER DE MAMA DE PACIENTES ARGENTINAS: CORRELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS Y DE RESPUESTA A LA TERAPIA NEOADYUVANTE. <b>Juan Martín Sendoya.</b>	294

### **EPIDEMIOLOGÍA**

ESTUDIO PROSPECTIVO, OBSERVACIONAL, DE CORTE TRANSVERSAL Y MULTICÉNTRICO DE PACIENTES CON TUMORES HEPATO-BILIO-PANCREÁTICOS (HBP) MEDIANTE EL REGISTRO INSTITUCIONAL DE TUMORES DE LA ARGENTINA (RITA) Y BASE HBP. <b>Pin Ying Chen</b>	295
PARÁMETROS CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICOS Y LACTOQUÍMICOS DE MADRES QUE AMAMANTAN DE CÓRDOBA, ARGENTINA: IMPLICANCIAS ONCOLÓGICAS. <b>Mariela Valentina Cortez</b>	307
CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDES: AUTOINMUNIDAD Y FACTORES DE RIESGO EN PACIENTES Y FAMILIARES. <b>Valeria Soledad García Roel</b>	317
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLOGICA CLÍNICA Y MOLECULAR DE INDIVIDUOS CON CÁNCER COLORRECTAL Y SOSPECHA DE SÍNDROME DE LYNCH. PRIMERA EXPERIENCIA EN EL PAÍS EN UNA INSTITUCIÓN PÚBLICA. <b>Mariano Golubicki</b>	325
PROGRAMA NECPAL: IDENTIFICACIÓN PRECOZ, ATENCIÓN CONTINUA E INTEGRAL DE PACIENTES CON ENFERMEDAD ONCOLÓGICA AVANZADA Y NECESIDADES DE ATENCIÓN PALIATIVA. <b>Victoria Llanos</b>	335
ATENCIÓN EN SERVICIOS DE SALUD PÚBLICOS Y PRIVADOS DEL CÁNCER DE MAMA, IMPLICANCIAS SOBRE EL DIAGNÓSTICO PRECOZ. <b>Andrea Palazzo</b>	344

### **SOCIAL**

LA DEPENDENCIA FUNCIONAL EN EL PACIENTE CON ENFERMEDAD ONCOLÓGICA DIGESTIVA Y LA PRESENCIA DE LOS SÍNTOMAS DE ANSIEDAD Y DEPRESIÓN ¿LA PÉRDIDA FUNCIONAL DURANTE LA INTERNACIÓN SE RELACIONA CON LA ANSIEDAD Y LA DEPRESIÓN EN PACIENTES CON CÁNCER? <b>Pilar Muñoz</b>	355
EL PROCESO DEL MORIR EN LA EDUCACIÓN MÉDICA: PERCEPCIONES DE LOS ESTUDIANTES DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR, BAHÍA BLANCA. <b>Estefanía Panizoni</b>	366

# GENERACIÓN DE MODELOS EXPERIMENTALES DE CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS SOBREENPRESANDO LAS ISOFORMAS DE RECEPTOR DE PROGESTERONA A O B PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE PROGESTÁGENOS/ANTIPIROGESTÁGENOS SOBRE EL PROCESO METASTÁSICO

**Michelle Marilyn Alvarez**

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET

**Directora:** Claudia Lanari

## RESUMEN

En este trabajo evaluamos el efecto del acetato de medroxiprogesterona (MPA) y de dos antiprogéstágenos: la mifepristona (MFP) y telapristona (TLP), sobre el crecimiento y establecimiento de metástasis en tumores del modelo murino de carcinomas mamarios inducidos por MPA, expresando mayor proporción de isoforma A de receptor de progesterona (RPA) que B (RPB) (tumores sensibles a MFP), o con el perfil opuesto (tumores resistentes a MFP).

Además, buscamos desarrollar modelos experimentales que permitan estudiar la relación entre la expresión diferencial RPA/RPB y el establecimiento de metástasis.

El crecimiento del tumor sensible y la incidencia de metástasis ( $p < 0,001$ ) disminuyeron al tratarlo con MFP. La TLP ejerció efectos similares aunque menos marcados, mientras que el MPA, indujo metástasis de mayor área. En la variante resistente adquirida (Radq), la TLP tuvo un posible efecto inhibitorio del crecimiento tumoral y del establecimiento de metástasis, no así la MFP por lo que TLP sería una terapia alternativa para estos tumores; mientras que el MPA, resultó prometastático ( $p < 0,05$ ). En la resistente constitutiva (RC), MFP incrementó las metástasis ( $p < 0,05$ ), y los tratamientos no modificaron el crecimiento tumoral.

Finalmente, generamos las líneas 4T1-12B y MC4-L2 sobreexpresando RPA que se caracterizaron *in vitro* para realizar posteriormente estudios *in vivo*.

## ABSTRACT

In this study the group have evaluated the effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and two antiprogestins: mifepristone (MFP) and telapristone (TLP), on tumor growth and incidence of metastasis of murine mammary carcinomas from the MPA-induced breast cancer model expressing higher levels of isoform A of the progesterone receptor (PRA; MFP-responsive tumors) than isoform B (PRB; MFP-resistant tumors).

In addition, it was attempted to develop new experimental models in which the role of antiprogestins could be evaluated in relation to the PRA/PRB ratio of metastatic mouse mammary carcinomas.

Tumor growth and the incidence of metastasis were completely inhibited by MFP as expected in the MFP-responsive tumor ( $p < 0.001$ ). TLP exerted similar effects as MFP although it was less effective, and MPA increased the area of the metastatic foci as compared to control animals ( $p < 0.05$ ). In the tumor variant with acquired MFP resistance TLP showed a slight inhibitory effect on tumor growth and metastasis suggesting that this agent might be an alternative for these tumors while MPA maintained its prometastatic effect. In constitutive MFP resistant tumors, MFP proved to exert a prometastatic effect.

Finally there were generated the 4T1-12B and MC4-L2 cells overexpressing PRA to be used in syngeneic mice.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama a nivel mundial es el cáncer más frecuente en mujeres y representa la segunda causa de muerte en mujeres de países en desarrollo. Aproximadamente el 70% de los tumores



expresan receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP), por lo que la terapia endócrina constituye una de las alternativas terapéuticas actualmente enfocada al bloqueo del RE.

El RP presenta dos isoformas, RPA (83/94 kDa: ratón/humano) y RPB (115/116 kDa: ratón/humano) originadas de un mismo gen a partir de promotores alternativos, las cuales cumplirían funciones diferenciales en los tejidos blanco. A nivel molecular, se sabe que la proporción RPA/RPB es un determinante crítico en la selectividad del RP por los genes que regula.

En trabajos previos el equipo demostró una correlación entre los niveles de expresión RPA/RPB y la respuesta al tratamiento con antiprogéstágenos como la MFP en diversos modelos experimentales de carcinomas mamarios. Al transplantar en un flanco de los ratones tumores que expresan mayores niveles de RPA que RPB (C4-HI), y en el otro, tumores con el perfil de isoformas opuesto (C4-2-HI), se observa que sólo hay inhibición del crecimiento con antiprogéstágenos en los primeros. En estudios recientes [19], se han extendido los resultados anteriores a otros modelos experimentales utilizando células de cáncer de mama humano modificadas para expresar exclusivamente una u otra isoforma (modelo T47D-YA/-YB) o mayores niveles de éstas (modelo IBH-6-YA/YB) y se observa que el antiprogéstágeno MFP también inhibe el crecimiento tumoral de xenotransplantes con alta proporción RPA/RPB y no tiene efecto o estimula el crecimiento de los que sobreexpresan RPB. A nivel molecular, se demuestra que la MFP activa al RP reclutando coactivadores como AIB1 sobre el promotor de MYC en un contexto estimulador de la proliferación, y corepresores como SMRT en un contexto de inhibición, cuando prevalece RPA sobre RPB.

En base a nuestras observaciones, proponemos apuntar la terapia al RP. La evidente respuesta diferencial al tratamiento con MFP en función del perfil de isoformas de RP que exprese el tumor da cuenta de la importancia de evaluar el patrón de isoformas de RP en los carcinomas mamarios humanos en el caso de utilizar la MFP como agente terapéutico y de encontrar antiprogéstágenos alternativos que resulten inhibitorios para aquellos tumores con mayor expresión de RPB que RPA.

Curiosamente, y en contraposición a lo anteriormente expuesto, al tratar el tumor C4-2-HI, con menor proporción de RPA que RPB con MPA, se detecta inhibición del crecimiento tumoral. A su vez, en el modelo de células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 transfectado con RPB, desarrollado por el Dr. Sebastián Giulianelli en el laboratorio, se observa que tanto la MFP como el MPA estimulan el crecimiento tumoral pero tienen efectos opuestos en cuanto a la incidencia de metástasis, teniendo la MFP un efecto prometastático y el MPA un efecto opuesto (resultados no publicados). Si se considera que todavía no se sabe por qué algunos carcinomas mamarios responden al tratamiento con progestágenos<sup>33</sup>, postulamos que la relación entre ambas isoformas está relacionada a la especificidad de respuesta a los progestágenos o antiprogéstágenos.

Por otro lado, hay muy pocos estudios que evalúan los efectos de progestágenos o antiprogéstágenos en modelos metastásicos de cáncer de mama. En un trabajo realizado en el laboratorio utilizando el tumor C7-2-HI (que expresa mayor proporción de RPA que RPB), se demostró que el tratamiento con MFP inhibe, además del crecimiento tumoral, las metástasis axilares y pulmonares<sup>16</sup>. Hasta el momento, no hemos evaluado el efecto del MPA ni de la TLP sobre la incidencia de metástasis en las variantes tumorales hormono independientes de nuestro modelo experimental.

Por lo tanto, en este trabajo se propuso evaluar el efecto del MPA y de dos antiprogéstágenos, el MFP y la TLP, sobre el crecimiento y establecimiento de metástasis en tumores de una variante sensible y en dos variantes resistentes a la MFP, utilizando el modelo murino de carcinomas mamarios inducidos por MPA con expresión diferencial de isoformas de RP.

En base a los antecedentes presentados se postula que el MPA y la MFP inhibe/estimula respectivamente el crecimiento tumoral, en aquellos tumores que expresan mayor proporción de RPB que RPA. Por el contrario, en aquellas variantes tumorales con mayor proporción de RPA que RPB e inhibidas por la MFP, el MPA seguirá siendo promotor de la proliferación y del desarrollo de las metástasis.

En la misma línea, y teniendo en cuenta la escasez de modelos adecuados para el estudio de isoformas de RP y su relación con el establecimiento de metástasis en respuesta al tratamiento hormonal, se propone desarrollar modelos experimentales adecuados a fin de disponer de herramientas para estudios mecanísticos posteriores.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron ratones hembras BALB/c vírgenes de dos meses de edad, manipulados según las normas internacionales, las cuales están acordes con la Guía de cuidados y uso de animales de laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources 1996).

### **Tumores utilizados y tratamientos**

Se utilizó la familia C7 de carcinomas mamarios murinos derivada del modelo tumoral originado en el laboratorio, inducidos por la administración prolongada de MPA a ratones hembra de la cepa BALB/c y mantenidos por trasplantes singenéticos [6, 7, 9]. Los tumores utilizados no requirieron de la administración de MPA para crecer. Se denominó **C7-2-HI** a aquella variante sensible al tratamiento con MFP, **C7-HI** a la forma RC a dicho tratamiento, y **C7-2-HIR** a la originada a partir de los tumores C7-2-HI que perdieron en el tiempo la sensibilidad al tratamiento endócrino, generando por lo tanto una variante RADq. Los tumores se inocularon de manera subcutánea en el flanco inguinal derecho de ratones hembra BALB/c y se registró el tamaño tumoral. Una vez que los tumores alcanzaron los 25mm<sup>2</sup>, se aplicaron los tratamientos (MFP (6 mg; Abcam), TLP (6 mg; Repros) o MPA (20 mg; Abcam), vehículo (silastic, CTL) mediante la implantación subcutánea de *pellets* en el dorso mediante trócar [11], los que se repusieron a los 30 días. Para el caso del tumor C7-HI dado que tiene alta tasa de crecimiento, se operaron los ratones al día 20, se extirpó completamente el tumor y se siguió el curso del experimento a fin de poder tener los animales en experimentación por más de 40 días para permitir el establecimiento de metástasis. En todos los casos, cuando los tumores alcanzaron el tamaño máximo permitido, se eutanasiaron los ratones y se realizó necropsia completa. Se tomaron muestras de tejidos para incluir en parafina y muestras de tumor para analizar perfil de isoformas de RP mediante western blot, incubando con anticuerpo primario anti-PR H190 o anti-PR C19 (Santa Cruz Biotech). La intensidad de las bandas se cuantificó usando el software Image J (1.345 NIH).

### **Líneas celulares**

Las células 4T1-12B no expresaron RE o RP, derivaron de la línea celular 4T1 transfectada con luciferasa, por lo que la expresaron en forma estable [14]. La línea celular MC4-L2 fue desarrollada en el laboratorio a partir de un cultivo primario derivado del tumor C4-HD y expresó RE y RP [8]. Ambas líneas fueron metastásicas en ratones BALB/c.

La línea 4T1-12B se transfectó con los vectores que contenían las isoformas de RP humano y su correspondiente vector vacío (pSG5/Amp), mientras que la MC4-L2 se transfectó con las isoformas de RP murino y su correspondiente vector vacío (pcDNA1/Amp). Cada plásmido fue co-transfectado con un vector de resistencia a neomicina (pIRES-N1) y se realizó un posterior proceso de clonado. En todos los casos se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron con 400 mg/ml de Geneticina (G418, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) y se mantuvieron con 200 mg/ml. Se corroboró la expresión de RP de cada clon por *western blot* e inmunofluorescencia.

### **Inmunofluorescencia sobre cultivo celular**

Las células se fijaron y permeabilizaron con etanol 70%, el bloqueo se realizó con 10% SFB en PBS1X y se incubaron con anticuerpo primario anti-PR H190 (Santa Cruz Biotech) en una dilución 1:100 en solución de bloqueo, ON a 4°C. Se utilizó un anticuerpo fluoresceinado anti-rabbit FITC en una dilución 1:100 en PBS 1X. Los preparados se observaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800. Las imágenes correspondientes fueron tomadas con el software EZ-C1 2.10. Para cada anticuerpo se analizaron las muestras a comparar entre sí, en el mismo momento y con la misma ganancia.

### **Estudios in vitro**

Se realizó recuento celular sobre células sembradas en 10% SFB, ayunadas con 1% SFBch, los tratamientos se aplicaron durante 4 días, todos en concentración 10nM en 1% SFBch. Finalmente, se realizó el recuento celular utilizando una cámara de Neubauer. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

Se realizaron ensayos de migración sobre células sembradas a confluencia en 10% SFB. Se las ayunó con 1% SFBch y al día siguiente se realizó la herida (to), se continuó en presencia de los tratamientos en concentración 10nM en 1%SFBch. se tomaron fotografías en microscopio de contraste de fase a un aumento de 100X de cada una de las heridas a to y a las 18h y 22 h de realizada la herida. Las fotografías se procesaron utilizando el *software* "Image J" para calcular el área de cierre de herida.

### **Análisis estadístico**

Para los gráficos de medias, se compararon las diferencias entre tratamientos y el control usando ANOVA y test de Tukey para tratamientos. Las diferencias entre medias de dos tratamientos se evaluaron con una prueba "t" de Student. En las curvas de crecimiento tumoral se realizó comparación de pendientes por regresión lineal para analizar diferencias significativas. Para la incidencia de metástasis se realizaron comparaciones utilizando el método de Chi cuadrado, comparando control vs tratamiento, ratones con tumor vs ratones sin tumor. Todos los análisis estadísticos mencionados se realizaron con el programa GraphPad Prism (versión 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc.).

## **RESULTADOS**

### ***Efecto de progestágenos y antiprogestágenos sobre el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis en carcinomas mamarios murinos con distinta proporción de isoformas de RP***

En trabajos previos, se demostró que la MFP inhibe el crecimiento tumoral de carcinomas mamarios con perfil de isoformas de RP: RPA>RPB, en el modelo de tumores mamarios inducidos por MPA [9,18]. A su vez, utilizando un tumor sensible a MFP de dicho modelo observamos que este antiprogestágeno es capaz de inhibir las metástasis a distancia [16]. En este trabajo extendimos el estudio explorando el efecto de otro antiprogestágeno, la TLP y el progestágeno MPA sobre el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Para eso, utilizamos la familia de tumores metastásicos del modelo inducido por MPA del laboratorio. El tumor C7-2-HI, sensible a MFP muestra mayor expresión de RPA que RPB; mientras que las variantes resistentes, C7-2-HIR (Radq) y C7-HI (RC) muestran el perfil de expresión opuesto (**Fig. 1**).

Los resultados mostraron que el tumor C7-2-HI respondió a MFP como era esperado, mientras que la TLP ejerció un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral aunque menor que el anterior tratamiento ( $p<0,001$ ). En ambos casos, esta regresión tumoral fue acompañada de un incremento de las apoptosis por campo de gran aumento ( $p<0,001$ ) y una disminución de las mitosis ( $p<0,01$ ) respecto al control. El MPA no modificó la tasa de crecimiento tumoral (**Fig. 2A**). A nivel histológico, este tumor es un carcinoma ductal infiltrante semidiferenciado (**Fig. 2B**). El tratamiento con MPA produjo una menor diferenciación, observándose menor cantidad de luces glandulares y tejido estromal interpuesto (flecha). Bajo el tratamiento con TLP se observó mayor grado de diferenciación (mayor proporción de luces glandulares y tabiques estromales de mayor calibre, **Fig. 2B, flechas**). Los tumores tratados con MFP regresionaron totalmente o mostraron aspectos histológicos similares al tratamiento anterior. A nivel de desarrollo de metástasis se observó que la MFP inhibió significativamente las metástasis sin observarse ningún foco metastásico en pulmón (**Fig. 2C, D y E**), y si bien no se pudo observar la histología de los ganglios axilares, éstos mostraron tamaño normal al momento de la necropsia. Por su parte la TLP, inhibió la invasión hacia el ganglio axilar (**Fig. 2C**) y mostró menor cantidad de focos metastásicos por pulmón respecto al control (**Fig. 2D, izq**). Si bien no se hallaron diferencias a nivel de la incidencia de metástasis bajo el tratamiento con MPA, analizando los resultados de histología se observó un efecto prometastásico de esta hormona ya que indujo un incremento significativo sobre el área de los focos metastásicos pulmonares (**Fig 2D dcha y E**). Se concluyó que en el tumor C7-2-HI, respondedor a MFP (Vanzulli 2005), la TLP en tratamiento prolongado y administrada en forma de *pellet* fue menos efectiva que la MFP para inducir la regresión tumoral completa, aunque inhibió el crecimiento tumoral en forma significativa respecto al control ( $p<0.001$ ) y la formación de metástasis a distancia al igual que la MFP. Por otro lado, el MPA tendría un efecto promotor del crecimiento de los focos metastásicos en pulmón.

El crecimiento del tumor Radq, C7-2-HIR, tal como era esperado no fue inhibido por MFP (**Fig. 3A**), aunque tampoco fue estimulado como habíamos observado previamente con tumores que expresan igual perfil de isoformas de RP [19]. Esta variante tumoral tiene la particularidad de crecer de

manera no uniforme lo que explicó la dispersión observada en los datos y da cuenta de la necesidad de repetir el experimento nuevamente para extraer conclusiones, sin embargo fue interesante el efecto inhibitorio, aunque leve, de la TLP en este tumor resistente a MFP ( $p < 0,001$ ). A nivel histológico, este tumor era un carcinoma indiferenciado y el aspecto observado fue similar entre los grupos (**Fig. 3B**). El tratamiento con MPA indujo deposición de material extracelular en zonas estromales (flecha corta), mientras que los antiprogéstágenos incrementaron la proporción de tejido estromal siendo más marcado el efecto con TLP (flechas largas). En cuanto a la incidencia de metástasis, el tratamiento con MPA produjo un incremento significativo de la invasión hacia pulmón ( $p < 0,05$ ). Llamativamente, ninguno de los animales tratados con TLP tuvo metástasis pulmonares. No se observaron diferencias en las metástasis axilares entre los grupos (**Fig. 3C**). Estos resultados preliminares para TLP, indicaron que podría tener un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral y de la génesis de metástasis pulmonares.

Se realizó un experimento preliminar de respuesta a MPA y MFP sobre la variante RC, observándose estimulación del crecimiento bajo el tratamiento con el antiprogéstágeno ( $p < 0,001$ ), y sin diferencias para el progéstágeno (**Fig 4A, arriba**). Posteriormente se incluyó el grupo TLP, y al momento de la cirugía no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (**Fig 4A, abajo**), aunque los tres tratamientos evaluados incrementaron el número de mitosis por campo de gran aumento respecto al control ( $p < 0,001$ ). El tumor C7-HI, al igual que el anterior, era un carcinoma indiferenciado; la arquitectura tumoral general resultó similar entre los grupos estudiados (**Fig. 4B**). En la **Fig. 4C** se muestra la incidencia de metástasis pulmonares, la cual si bien en el experimento único no fue diferente entre los tratamientos, al incorporar los datos del equipo con datos de experimentos previos, se verificó un incremento significativo de la incidencia de metástasis pulmonares bajo el tratamiento con MFP. Se demostró que tanto el progéstágeno como los antiprogéstágenos estimularon la división celular en este tumor y se evidenció el efecto promotor de metástasis de la MFP.

#### ***Desarrollo de modelos experimentales para el estudio del efecto de progéstágenos y antiprogéstágenos sobre el proceso metastásico en carcinomas mamarios con distinta proporción de isoformas de RP.***

Se trabajó con dos líneas celulares murinas y metastásicas, una sin expresión de RP ni RE, la 4T1-12B y la otra con expresión de RP (RPB>RPA), con el propósito de obtener células que expresen una u otra isoforma de RP, o ambas isoformas en distinta proporción; respectivamente. Dado que no se disponía de plásmido murino, se comenzó la transfección de la línea 4T1-12B con los plásmidos de isoformas de RP humano, y posteriormente la transfección de la línea MC4-L2 con los plásmidos de isoformas de RP murino. Sólo se muestran resultados para la isoforma A, ya que fue la única que se logró transfectar exitosamente. En la **Fig. 5A** se muestran inmunofluorescencias representativas anti-RP (verde), las células 4T1-12B (arriba) transfectadas con el vector vacío (-pSG5) no muestran expresión de RP, mientras que las células que llevan el vector de expresión, resultaron marcadas con el anticuerpo. Las células MC4-L2 (abajo) transfectadas con el vector vacío (-pCDNA1) muestran la expresión típica de RP en estas células, la cual se ve incrementada en las células transfectadas con RPA. En la misma línea, en la **Fig. 5B**, se observan western blots representativos para la línea 4T1-12B (arriba) y MC4-L2 (abajo). Se observa ausencia de expresión de RP en la línea 4T1-12B-pSG5 y banda de 94kDa correspondiente a RPA(h) en la línea 4T1-12B-RPA(h). En la línea MC4-L2 se observa mayor expresión de RPB que RPA en la línea control (RPA/RPB: 0,82), mientras que en la MC4-L2-RPA(m), esta proporción se revierte (RPA/RPB: 1,25).

Posteriormente, se comenzó la caracterización de las líneas generadas a partir de las células 4T1-12B mediante ensayos *in vitro*. En los experimentos de recuento celular, se incluyó el glucocorticoide dexametasona (DEXA) como control positivo dado que se sabe que estas células expresan altos niveles de receptor de glucocorticoides (RG) [14]. Los tratamientos con MPA y MFP estimularon la proliferación celular de la línea control; y al expresar RPA (h) se inhibió la proliferación celular bajo el tratamiento con MFP y con DEXA (**Fig. 6A**). Por lo tanto, la expresión de RPA(h) en esta línea indujo cambios en la proliferación celular en respuesta al tratamiento con MFP, MPA y DEXA. Finalmente, al evaluar la capacidad migratoria de las células bajo el tratamiento con los antiprogéstágenos TLP y MFP (**Fig. 6B**), se observó que la MFP estimuló la migración de las células control, lo cual no se observó en la línea transfectada con RPA(h). La expresión de RPA(h) en estas células alteró la respuesta proliferativa y migratoria a MFP.

## DISCUSIÓN

El laboratorio muestra evidencias que sugieren que la proporción de isoformas del RP en un carcinoma mamario es determinante de su respuesta al tratamiento con antiprogestágenos. Actualmente al equipo le interesa estudiar no sólo el crecimiento tumoral sino cómo inciden los antiprogestágenos y el MPA en el desarrollo de metástasis espontáneas en tumores con distinta relación de isoformas de RP, ya que el punto final de evaluación de la mayor parte de los experimentos que se realizan hasta el momento están enfocados en los efectos sobre el crecimiento de tumores primarios.

Estos conceptos cobran relevancia si se piensa que la mayoría de los tratamientos de adyuvancia evalúan el efecto terapéutico de los agentes en pacientes cuyo tumor primario ha sido removido quirúrgicamente. Una de las cualidades de nuestro modelo experimental murino, es la posibilidad de disponer de familias de carcinomas mamarios con expresión diferencial de isoformas de RP altamente metastásicas en pulmón y ganglio. Idealmente sería muy conveniente disponer de modelos experimentales con estas mismas características que desarrollaran metástasis en hueso y cerebro, sitios comunes de metástasis de cáncer de mama humano [2]. En la actualidad son escasos los modelos adecuados para este tipo de estudios ya que la mayor parte de las líneas celulares de cáncer de mama de origen luminal son muy poco metastásicas, los modelos murinos provenientes de animales genéticamente modificados no expresan receptores hormonales y los modelos tradicionales de carcinogénesis química/hormonal no son metastásicos [9]. En este trabajo, se exploran las curvas de crecimiento y el patrón metastásico para tres variantes tumorales con distinto grado de resistencia endócrina bajo tratamiento con progestágenos o antiprogestágenos. Por otro lado, se inicia el camino hacia la generación de modelos experimentales que permitan estudiar el efecto de una u otra isoforma de manera exclusiva, o en combinación con un balance diferencial entre las mismas, sobre el proceso metastásico.

Estudios realizados en la familia de tumores C<sub>4</sub> de nuestro modelo tumoral, sugerían que el MPA era inhibitorio del crecimiento tumoral en una de las variantes resistentes a la MFP (Tesis Doctoral, Wargon V, 2010). Esta observación experimental, sumada a otras observaciones ya mencionadas del Dr. Giulianelli en las células MDA-MB-231-RPB (resultados no publicados), junto con el hecho de que el MPA ha sido utilizado ampliamente en la terapia de cáncer de mama mostrando efectos beneficiosos en algunas pacientes [13], lleva a hipotetizar que los tumores de mama estimulados por MFP podrían ser aquellos que respondieran a una terapia con MPA.

La mayor parte de los estudios se han realizado utilizando modelos experimentales de líneas celulares, observándose respuesta diferencial al tratamiento con MPA en función de las características del modelo. Los resultados obtenidos en la familia tumoral C<sub>7</sub> muestran un efecto del MPA potenciador metastásico (entendido como incremento de incidencia de metástasis pulmonares o del número o área de los focos metastásicos pulmonares) no sólo en el tumor respondedor a MFP, sino también en una de las variantes resistentes. En base a estas evidencias concluimos que el efecto inhibitorio/estimulador sobre el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis del MPA, contrariamente a la hipótesis inicial, es independiente de la proporción de isoformas de RP, y dependerá del repertorio de receptores hormonales que exprese el tumor incluyendo además receptor de andrógenos (RA), RE y RG. Asimismo, es importante destacar los efectos propuestos de la progesterona (Pg) sobre el sistema inmune [1], y en particular el MPA que tiene efectos androgénicos y glucocorticoides además de progestacionales [9], que podrían afectar la capacidad metastásica y el crecimiento tumoral a través de efectos sistémicos. El efecto promotor de metástasis del MPA está en línea con trabajos del grupo de Kate Horwitz que muestran que el MPA favorece el predominio de la población de células troncales [4]. Por otro lado, cabe aclarar que si bien los experimentos en ratones NSG se encuentran en curso, sabemos que no hay diferencias importantes en el crecimiento en cuanto a la respuesta a antiprogestágenos de los tumores del modelo del equipo creciendo en ratones PRKO o NSG<sup>5</sup>.

Luego de numerosos estudios, se ha demostrado que la MFP podría ser efectiva para tratar tumores con mayor expresión de RPA que RPB [3,17,18,19], tal como observamos en este trabajo con el tumor sensible, C<sub>7</sub>-2-HI. Por el contrario, trabajos previos del laboratorio demostraron que podría ser perjudicial en caso de aplicarse como tratamiento a tumores con el perfil de expresión de isoformas inverso, ya que podría estimular el crecimiento tumoral [19]. Sin embargo, hasta el momento no

habíamos estudiado el efecto de este antiprogéstágeno sobre el desarrollo metastásico en los tumores resistentes de nuestro modelo. Observamos que la aplicación de MFP sobre la variante RAdq no tuvo efecto, mientras que aumentó significativamente el desarrollo de metástasis en la variante RC. Estos resultados sugieren que las pacientes con tumores con perfil de expresión RPB>RPA podrían no beneficiarse con el tratamiento con antiprogéstágenos, o incluso sufrir efectos perjudiciales en algunos casos.

Es conocido que la MFP, cuando ejerce su efecto antitumoral, aumenta la apoptosis, inhibe la proliferación celular o aumenta la diferenciación [10, 15]. En cuanto a la TLP, los resultados aportan evidencia a lo observado anteriormente por el grupo del Dr. Wiehle, que reportó en tumores inducidos por N-metil-N-nitrosourea en ratas como efecto antitumoral de la TLP: inhibición de la proliferación celular, incremento de apoptosis e incremento de espacio intercelular [20]. Los resultados aportarían evidencia de que la TLP ejerce su efecto antitumoral en forma similar a la MFP mediante los mecanismos mencionados y además, tendría un efecto hasta ahora no descrito a través de inducción de diferenciación celular.

En cuanto a la eficiencia de la TLP en comparación con la MFP es necesario considerar que fueron administradas en forma de *pellet* con 6mg de hormona. El peso molecular de la MFP es menor al de la TLP (429,60 g/mol y 505,65 g/mol, respectivamente), con lo cual en cada *pellet* la cantidad de moléculas activas de TLP sería levemente inferior, pudiendo justificar la menor eficiencia del tratamiento. Por estudios *in vitro*, se sabe que la MFP muestra mayor afinidad por la unión al RP que la TLP, en útero de conejo y humano (Attardi et al 2002), aunque este factor no es necesariamente predictor de actividad funcional [21]. Recientemente, Wargon y Riggio *et al.*, también mostraron mayor eficacia de MFP sobre la TLP en algunos tumores, aplicando los tratamientos a tumores sensibles pero mediante inyecciones de igual dosis de droga (10 mg/kg/día) [19], con lo que podemos descartar que la menor eficiencia que observamos sea debida a la aplicación del tratamiento mediante *pellet*. Probablemente, se deba a la menor cantidad de moléculas por gramo de droga presentes en la TLP, sumada a la potencial menor actividad funcional debida a la afinidad inferior de ésta sobre el RP (menor  $K_a$ ). Se podrían realizar otros estudios incrementando la dosis de TLP a modo de ver si es capaz de alcanzar la eficiencia de la MFP, y evaluar los efectos adversos de la droga a mayor dosis. Finalmente, para el caso del MPA utilizamos 20 mg porque ésta es la dosis que se usa de rutina para mantener el crecimiento de tumores hormono dependientes del modelo experimental.

Pocos son los trabajos publicados sobre la acción de TLP en experimentos *in vivo*, y en su mayoría apuntan a su uso como terapia preventiva de la carcinogénesis, incluso no hay en bibliografía datos previos en cuanto al efecto de la TLP sobre la capacidad metastásica de los tumores. En este trabajo se demuestra que para el tumor respondedor a MFP, C7-2-HI con mayor expresión de RPA que de RPB, la TLP inhibió la formación de metástasis tanto en pulmón como en ganglio axilar. Sorpresivamente, en el experimento con el tumor C7-2-HIR, RAdq, con perfil de expresión de isoformas de RP opuesto, el crecimiento tumoral se enlenteció y no se detectaron focos metastásicos en ninguno de los ratones tratados con TLP, en contraposición a lo hallado para MFP. Sin embargo, en el tumor C7-HI, RC, la tendencia no fue la misma. De manera que, si bien la TLP sería un antiprogéstágeno menos eficiente que la MFP para el tratamiento de tumores con mayor expresión de RPA que de RPB; podría ser una posible terapia para un subgrupo de los tumores con el perfil de isoformas opuesto, los cuales no se inhibirían al ser tratados con MFP.

Desde el punto de vista clínico, los pacientes con tumores similares a los RC de nuestro modelo, con mayor expresión de RPB que RPA, no se beneficiarían bajo el tratamiento con TLP, por lo que habría que excluirlos de esta terapia. Por otro lado, el tumor RAdq representaría un paciente cuyo tumor se vuelve resistente al tratamiento con MFP, y es alentador pensar que la TLP no va a tener el efecto adverso sobre éstos, e incluso podría funcionar como un antagonista alternativo. Queda por estudiar si las células que crecen en el sitio de metástasis conservan la misma proporción de isoformas de RP que el tumor original.

En cuanto a la búsqueda de modelos experimentales murinos, se eligió la línea 4T1-12B por ser equivalente a la línea MDA-MB-231 humana, triple negativa que no expresa RE o RP y expresar luciferasa, una condición ideal para estudios de metástasis. Desarrollamos a partir de esta línea celular, células que expresan exclusivamente RPA humano en las cuales observamos cambio de respuesta proliferativa y migratoria a MFP comparado con la respuesta a esta hormona en el control. Resulta llamativo que un antagonista de RP (MFP) produzca los mismos efectos que el agonista (MPA) sobre la

proliferación de las células 4T1-12B-pSG5. La Pg, la cual no se une al RG, no modifica la proliferación celular (*resultados preliminares no mostrados*). Por otro lado, se halló una respuesta inhibitoria del glucocorticoide DEXA en la proliferación celular de la línea 4T1-12B-RPA(h) en contraposición a la respuesta estimuladora observada en los controles. Estos resultados están en línea con los trabajos que sostienen que RPA inhibiría la activación de otros receptores hormonales [12]. Dado que no están claros los efectos hormonales en la línea control y creemos que podrían estar mediados por el RG, consideramos no continuar con los experimentos en estas células ya que el efecto a través del RG podría enmascarar los efectos de nuestro interés mediados por RP, priorizando en modelo MC4-L2 para la continuación de nuestras investigaciones. De todos modos, es interesante haber demostrado que el RPA(h) es funcional en células murinas.

A partir de la línea celular MC4-L2, desarrollada en el laboratorio, que basalmente expresa mayores niveles de RPB que RPA se ha logrado una línea estable con mayor proporción de RPA al transfectarla con el vector de RP murino y su línea control. Este par de líneas, una con mayor expresión de RPB y la otra con mayor expresión de RPA que RPB, serán utilizadas en estudios posteriores para validar las observaciones realizadas en la familia C7 y para manipular genes metastásicos regulados por RP claves, como NM23 o NRG2 en la regulación de los procesos relacionados con la inducción de metástasis. Además, se planifica transfectar la línea obtenida, MC4-L2-RPA(m), con el gen de luciferasa para valernos de tecnologías de imágenes al estudiar el proceso metastásico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, Paladino N, Barboza M, Lanari C, et al. NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *J.Immunol.* 2008; 180: 5746-5753.
- <sup>2</sup> Chikarmane SA, Tirumani SH, Howard SA, Jagannathan JP & DiPiro PJ. Metastatic patterns of breast cancer subtypes: what radiologists should know in the era of personalized cancer medicine. *Clin.Radiol.* 2015; 70: 1-10.
- <sup>3</sup> Helguero LA, Viegas M, Asaithamby A, Shyamala G, Lanari C & Molinolo AA. Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res.Treat.* 2003; 79: 379-390.
- <sup>4</sup> Horwitz KB. The Year in Basic Science: update of estrogen plus progestin therapy for menopausal hormone replacement implicating stem cells in the increased breast cancer risk. *Mol.Endocrinol.* 2008; 22: 2743-2750.
- <sup>5</sup> Lamb C, Sahores A, Lydon J, Molinolo A, Lanari C. Mifepristone: pharmacology, medical uses and potential side effects. En: Nova Biomedical. Chapter III. 2014.
- <sup>6</sup> Lanari C, Molinolo AA & Pasqualini CD. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett.* 1986; 33: 215-223.
- <sup>7</sup> Lanari C, Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD & Charreau EH. Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int.J.Cancer.* 1989; 43: 845-850.
- <sup>8</sup> Lanari C, Luthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, et al. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Res.* 2001; 61: 293-302.
- <sup>9</sup> Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MC, et al. The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr.Relat Cancer.* 2009; 16: 333-350.
- <sup>10</sup> Michna H, Gehring S, Kuhnle W, Nishino Y & Schneider MR. The antitumor potency of progesterone antagonists is due to their differentiation potential. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 1992; 43: 203-210.
- <sup>11</sup> Sahores A, Luque GM, Wargon V, May M, Molinolo A, Becu-Villalobos D, et al. Novel, low cost, highly effective, handmade steroid pellets for experimental studies. *PLoS.ONE.* 2013; 8: e64049.
- <sup>12</sup> Scarpin KM, Graham JD, Mote PA & Clarke CL. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl.Recept.Signal.* 2009; 7: e009.
- <sup>13</sup> Stanczyk FZ & Bhavnani BR. Use of medroxyprogesterone acetate for hormone therapy in postmenopausal women: is it safe? *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2014; 142: 30-38.
- <sup>14</sup> Tao K, Fang M, Alroy J & Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC.Cancer* 2008; 8: 228.
- <sup>15</sup> Vanzulli S, Efeyan A, Benavides F, Helguero L, Peters G, Shen J, et al. p21, p27 and p53 in estrogen and anti-progestin-induced tumor regression of experimental mouse mammary ductal carcinomas. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 749-757.
- <sup>16</sup> Vanzulli SI, Soldati R, Meiss R, Colombo L, Molinolo AA & Lanari C. Estrogen or anti-progestin treatment induces complete regression of pulmonary and axillary metastases in an experimental model of breast cancer progression. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1055-1063.
- <sup>17</sup> Wargon V, Helguero LA, Bolado J, Rojas P, Novaro V, Molinolo A, et al. Reversal of anti-progestin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res.Treat.* 2009; 116: 449-460.
- <sup>18</sup> Wargon V, Fernandez SV, Goin M, Giulianelli S, Russo J & Lanari C. Hypermethylation of the progesterone receptor A in constitutive anti-progestin-resistant mouse mammary carcinomas. *Breast Cancer Res.Treat.* . 2011; 126: 319-332.
- <sup>19</sup> Wargon V, Riggio M, Giulianelli S, Sequeira GR, Rojas P, May M, et al. Progestin and anti-progestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int.J.Cancer.* 2015; 136: 2680-2692.
- <sup>20</sup> Wiehle R, Lantvit D, Yamada T & Christov K. CDB-4124, a progesterone receptor modulator, inhibits mammary carcinogenesis by suppressing cell proliferation and inducing apoptosis. *Cancer Prev.Res.(Phila).* 2011; 4: 414-424.
- <sup>21</sup> Xu X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, et al. Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat.Genet.* 1999; 22: 37-43.



ANEXO

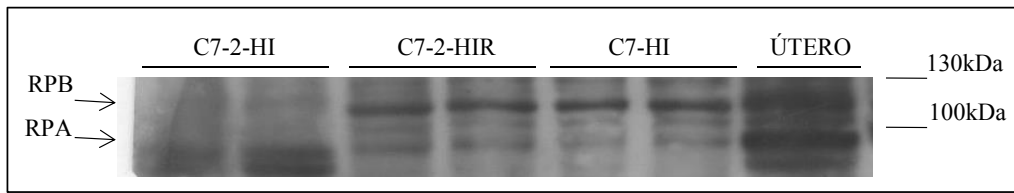


Figura 1. Los tumores con resistencia constitutiva (C7-HI) y adquirida (C7-2-HIR) expresan mayores niveles de RPB que RPA, mientras que los tumores sensibles a la MFP (C7-2-HI) muestran el patrón inverso. Se muestran *western blots* de extractos totales de los tumores pertenecientes a la familia C7 crecidos sin tratamiento hormonal, separados en un gel de 8% poliacrilamida y revelados con el Ac anti RP C-19 (flecha). Se utilizó como control positivo extracto proteico total de útero. Se reveló ERK como control de carga. Experimento representativo de tres repeticiones. A la derecha se muestra la posición de los marcadores de peso molecular (MK).

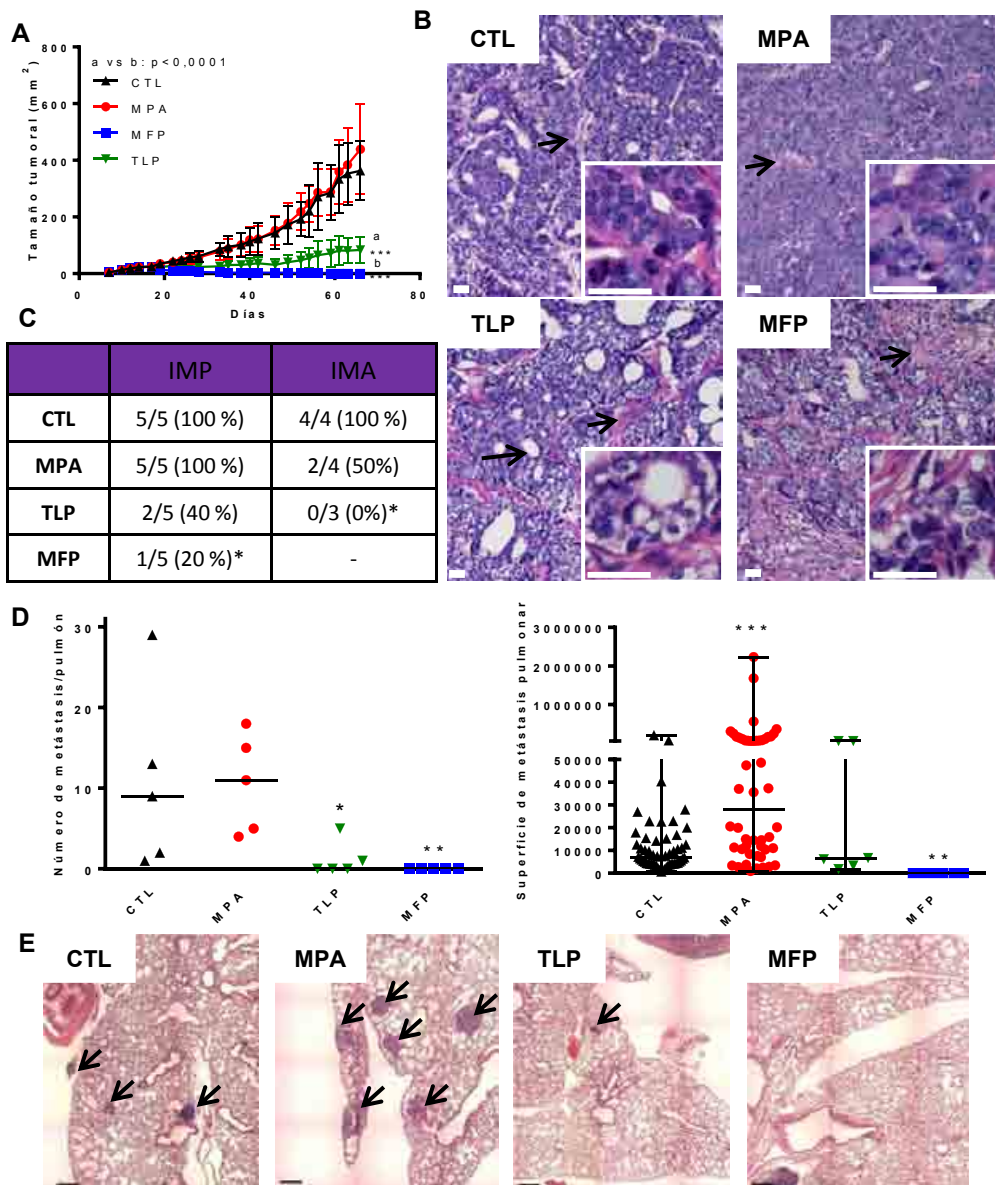
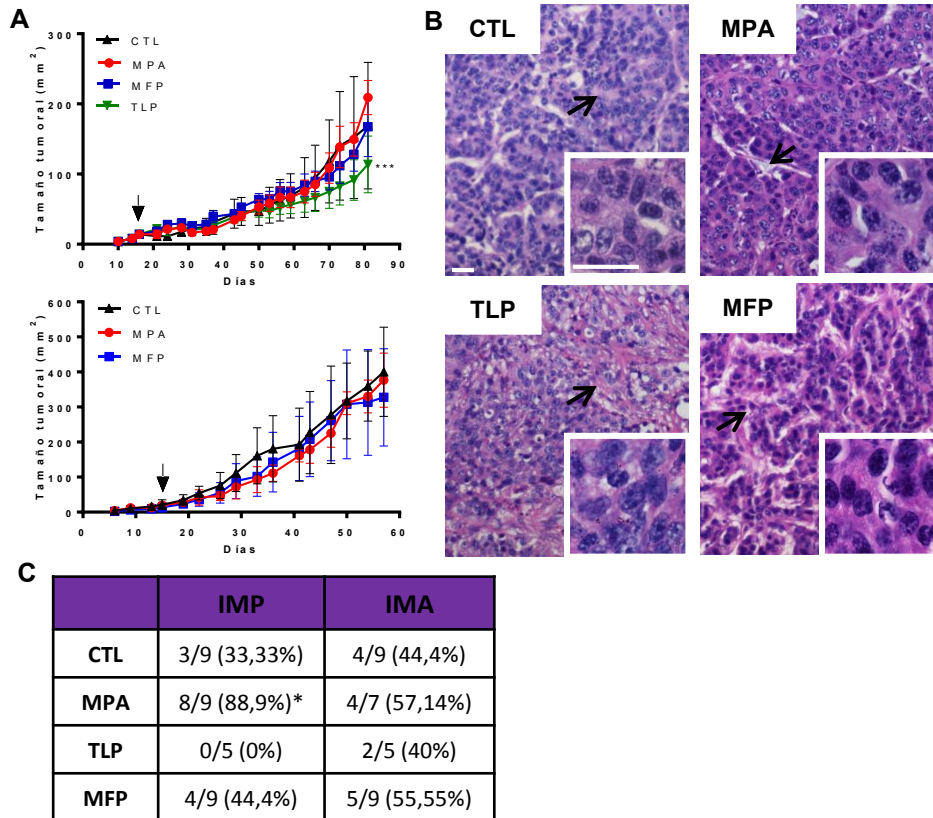


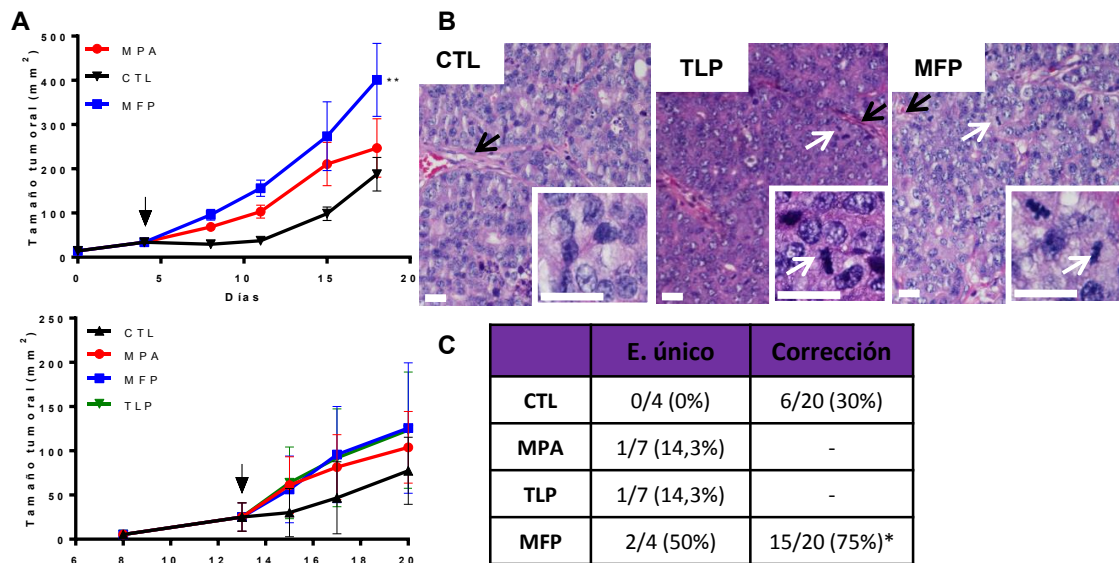
Figura 2. Tratamiento con MPA y antiprogestágenos en el tumor respondedor C7-2-HI. A. Tamaño tumoral (ancho x largo;  $x \pm DS$ ) en función del tiempo. La flecha indica el comienzo de los tratamientos

por medio de la implantación sc de *pellets*, que se renovaron a los 30 días. **B.** Imágenes representativas de cortes histológicos del tumor luego de 53 días de los respectivos tratamientos. Los tumores tratados con antiprogéstágenos muestran aumento de diferenciación (mayor cantidad de luces ductales, flechas largas) y tejido estromal (flechas cortas). Aumento: 20X y 60X. Tinción: Hematoxilina-eosina (H/E). **C.** Incidencia de metástasis pulmonares (IMP) y axilares (IMA) en ratones BALB/c, luego de 66 días de inoculación. La incidencia se presenta como el número de ratones con al menos un foco pulmonar metastásico/con ganglio infiltrado con células tumorales, sobre el total de ratones para cada tratamiento. **D.** Se representa el número de metástasis por pulmón halladas en cortes histológicos (izq.) y el área de metástasis total calculada como la sumatoria de las áreas de todas las metástasis encontradas en cortes histológicos (dcha.) en pulmones de ratones luego de 53 días con los tratamientos indicados. Se muestran los valores individuales y la mediana. **E.** Se observan imágenes representativas del número y tamaño de focos metastásicos pulmonares (flechas). El MPA incrementa el área de los focos metastásicos y los antiprogéstágenos inhiben las metástasis a distancia. Cada imagen es resultado de una fusión de 12 fotos en aumento: 100X. Tinción: H/E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$  y \*\*\*:  $p < 0.001$ . Barra blanca= 25  $\mu\text{m}$ , barra negra: 225  $\mu\text{m}$ .

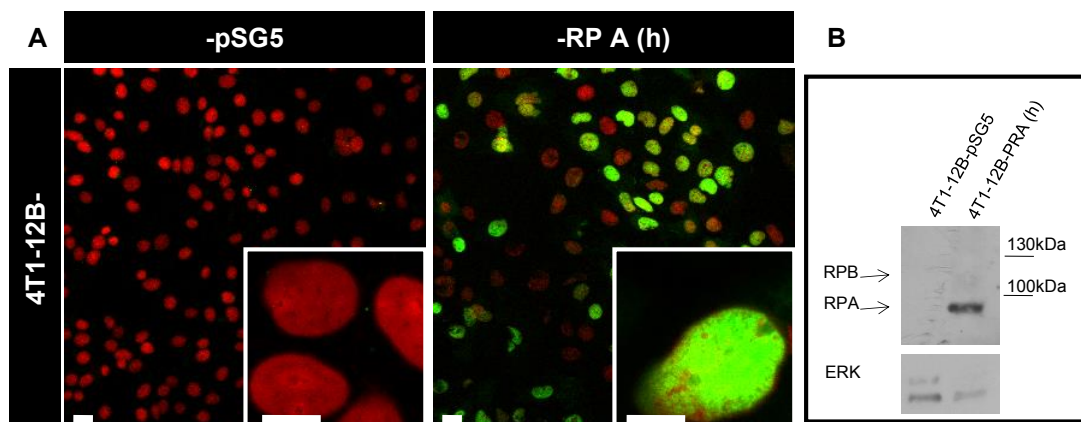


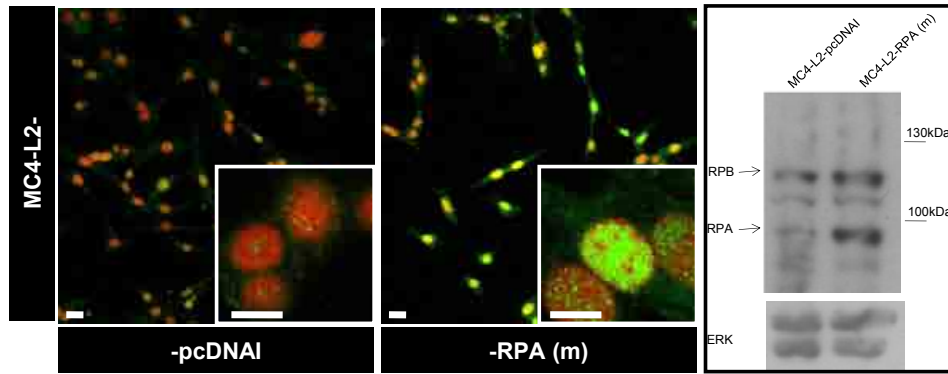
**Figura 3. Tratamiento con MPA y antiprogéstágenos en el tumor resistente C7-2-HIR.** **A.** Tamaño tumoral (ancho x largo;  $x \pm DS$ ) en función del tiempo. Se muestran los resultados de dos experimentos para el tumor creciendo en ratones BALB/c. Arriba: se evidencia disminución leve del tamaño tumoral bajo el tratamiento con TLP. MPA y MFP no afectaron el crecimiento tumoral en ninguno de los experimentos. La flecha indica el comienzo de los tratamientos por medio de la implantación sc de *pellets*, que se renovaron a los 30 días. **B.** Imágenes representativas de cortes histológicos del tumor luego de 65 días de los respectivos tratamientos. El aspecto histológico es similar entre los grupos. El tratamiento con MPA indujo deposición de material extracelular en zonas estromales (flecha corta), mientras que los antiprogéstágenos incrementaron la proporción de tejido estromal siendo más marcado el efecto con TLP (flechas largas). Aumento: 20X y 60X. Barra = 25  $\mu\text{m}$ . Tinción: H/E. **C.** Incidencia de metástasis pulmonares (IMP) y axilares (IMA), calculadas igual que en **Fig.2C**, para dos

experimentos en ratones BALB/c luego de 66 días de inoculación. El MPA produjo un aumento significativo en la incidencia de metástasis pulmonares. \*:  $p < 0.05$  y \*\*\*:  $p < 0.001$ .

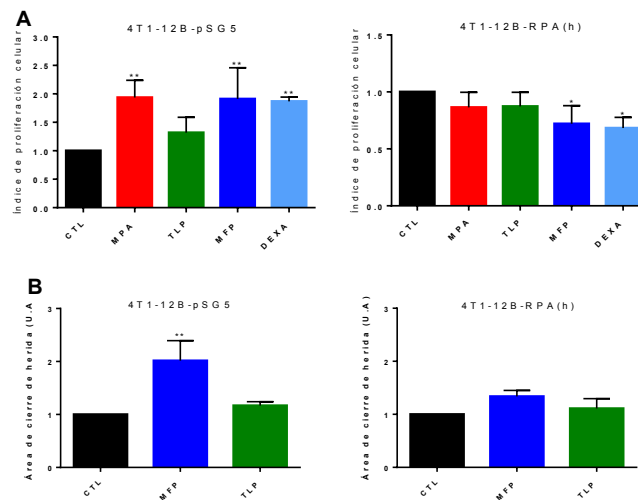


**Figura 4. Tratamiento con MPA y antiprogestágenos en el tumor resistente C7-HI.** Se realizaron dos experimentos, uno preliminar de evaluación de respuesta a MFP y MPA (n=9) y otro posterior evaluando la respuesta a MFP, MPA y TLP (n=24). Los tumores fueron operados al día 19-20 y los animales sacrificados al día 51-52, en cada experimento respectivamente. **A.** Tamaño tumoral (ancho x largo;  $x \pm DS$ ) en función del tiempo para el tumor creciendo en ratones BALB/c. Arriba: Experimento preliminar: se evidencia resistencia a MFP y alta tasa de crecimiento tumoral. Abajo: Experimento posterior: no se observan diferencias significativas en el crecimiento de los tratados respecto al grupo control. La flecha indica el comienzo de los tratamientos por medio de la implantación sc de *pellets*, que se renovaron a los 30 días. **B.** Imágenes representativas de cortes histológicos del tumor luego de 37 días de los respectivos tratamientos. La arquitectura tumoral no sufrió cambios evidentes luego de los tratamientos, manteniéndose la proporción masa tumoral/estroma (flechas negras). Sin embargo, se observa que bajo el tratamiento con MFP y TLP aumenta el número de mitosis (flechas blancas). Aumento: 20X y 60X. Barra = 25  $\mu$ m. Tinción: H/E. **C.** Incidencia de metástasis pulmonares, calculada igual que en Fig.2C, para un experimento único (E.único) o corregida en base a pool de datos de cuatro experimentos en ratones BALB/c luego de 66 días de inoculación. La MFP produjo un aumento significativo en la incidencia de metástasis pulmonares. \*:  $p < 0.05$  y \*\*\*:  $p < 0.001$ .





**Figura 5. Expresión de RP en células 4T1-12B transfectadas con vector vacío (-pSG5) o RPA humano (-pSG5-RPA) y en células MC4-L2 transfectadas con vector vacío (-pcDNA1) o RPA murino (-pcDNA1-RPA). A.** Se muestran inmunofluorescencias contra el RP (verde) realizadas sobre células 4T1-12B (arriba), MC4-L2 (abajo) transfectadas con pSG5-RPA(h) y pcDNA1-RPA(m) respectivamente (panel dcho) y con el correspondiente vector vacío en cada caso (panel izq), creciendo en 10%SFB. Se utilizó el Ac H190, que revela ambas isoformas de RP. Los núcleos se contratiñeron con Ioduro de propidio (rojo). Las células 4T1-12B transfectadas con el vector vacío fueron utilizadas como control negativo del Ac ya que no expresan RP. Aumento: 200X; inset: 600X. Barra chica: 20µm. Barra grande: 10µm. **B.** Se muestran *western blots* realizados a partir de extractos proteicos totales de las líneas obtenidas, creciendo en cultivo en 10% SFB: células 4T1-12B (arriba) y células MC4-L2 (abajo). Se separaron en un gel de 8% poliácridamida y se revelaron con el Ac de RP H190 y C19 respectivamente. Se utilizó como control positivo extracto proteico total de útero. Se reveló ERK como control de carga. Experimento representativo de 3. A la derecha se observa el MK.



**Figura 6. Evaluación de respuesta a hormonas de la línea 4T1-12B-RPA(h) y su línea control en ensayos *in vitro*. A.** Efecto de distintos tratamientos endócrinos sobre la proliferación de las células 4T1-12B-RPA(h) y su línea control, 4T1-12B-pSG5 (izq). Las células fueron tratadas con los tratamientos indicados en concentración 10nM por 96 h. Luego, fueron levantadas y contadas con cámara de *Neubauer*. El número final de células se relativizó al control y se graficó la media de las medias de 4 experimentos como índice de proliferación. La introducción del RPA(h) cambió la respuesta proliferativa a MPA, DEXA y MFP. **B.** Efecto de antiprogestágenos sobre capacidad migratoria de las líneas celulares 4T1-12B-RPA(h) (dcha) y 4T1-12B-pSG5 (izq). Se realizó la herida sobre células en confluencia y se incubaron luego de ayunarlas, durante 22h con MFP o TLP, 10 nM. El área de cierre se calculó como la diferencia entre el área de herida fotografiada a las 0h de aplicado el tratamiento y a las 22h. Se presentan para cada tratamiento la media de las medias relativizadas al control obtenidas a partir de 3 experimentos en las células -pSG5 y 2 experimentos en las RPA(h). La introducción del RPA(h) cambió la migración celular observada. \*:  $p < 0.05$  y \*\*:  $p < 0.001$ , experimental vs control.



# MODULACIÓN EJERCIDA POR HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LAS CÉLULAS ESTROMALES/MADRE MESENQUIMALES DENTRO DEL ENTORNO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

**Mariana Andrea Amorós**

Instituto de Biología y Medicina Experimental

**Directora:** Dra. Marcela F. Bolontrade

## RESUMEN

Las células madre mesenquimales (MSC) son residentes del estroma tumoral con la habilidad de modular activamente su microambiente. Esta habilidad está asociada a propiedades biológicas clave en la regulación de la progresión tumoral, incluyendo migración, diferenciación, inmunomodulación e inducción de respuesta angiogénica. El establecimiento de un tumor es un proceso complejo que involucra la interacción entre señales producidas por las células tumorales y su microambiente. En este contexto, las hormonas tiroideas (HT) son moduladoras maestras del metabolismo celular y poseen un rol importante, aunque aún poco claro, en la progresión tumoral. De esta manera, las HT podrían ejercer un efecto sobre el crecimiento y progresión tumoral afectando a los componentes estromales celulares del tumor. El objetivo global del proyecto que enmarcó este plan de trabajo, fue evaluar la contribución de las MSC humanas adultas derivadas de médula ósea a la progresión tumoral en un modelo xenogéneo de leucemia linfoblástica de células T (T-ALL) haciendo uso de la línea tumoral humana CUTLL1. Para ello se estableció un nuevo modelo experimental *in vivo* T-ALL el cual representa un desorden hematológico agresivo que involucra a progenitores hematopoyéticos; este tipo de patología posee un componente inflamatorio y un nicho estromal bioquímicamente similar al de la médula ósea en donde residen las MSC que se incorporan al tumor. En el presente trabajo buscamos establecer si existen efectos moduladores de las HT sobre las MSC que afectarían a la progresión tumoral. De esta manera, hipotetizamos que las HT no solo modularían a las células tumorales sino que podrían modular propiedades biológicas de las MSC derivadas de médula ósea incorporadas en el tumor.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are residents of the tumor stroma with the ability to actively modulate the tumor microenvironment. This ability is associated with key biological properties which regulate tumor progression, including migration, differentiation, immunomodulation and angiogenic response induction. Tumor establishment is a complex process involving interactions between signals produced by tumor cells and their microenvironment. In this context, thyroid hormones (HTs) are master key modulators of cellular metabolism and have an important but still unclear role in tumor progression. In this way, HTs may exert an effect on tumor growth and progression affecting tumor stromal cell components. The overall objective of the project that framed this work plan was to assess the contribution of adult human MSCs derived from bone marrow to tumor progression in a xenogeneic model of T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) established with the human tumor line CUTLL1. For this goal a new *in vivo* experimental model of T-cell lymphoblastic leukemia was established, which represents an aggressive haematological disorder involving hematopoietic progenitors; this pathology has an inflammatory and stromal niche similar to the bone marrow where reside MSCs, which ultimately incorporate into the tumor. In the present work we sought to establish whether there are modulatory effects of HTs on MSCs which may affect tumor progression. Thus, we hypothesize that HTs could modulate not only tumor cells but could also modulate biological properties of bone marrow-derived MSCs incorporated into the tumor.

## INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales adultas (MSC) son una población celular heterogénea con características de células madre multipotentes y residentes del estroma en diversos tejidos que intervienen

en procesos responsables de la regeneración y homeostasis celular. Estas células han sido identificadas y aisladas de varios tejidos, incluyendo músculo, grasa, hígado y médula ósea [1, 2]. Entre las propiedades biológicas de las MSC figuran un tropismo diferencial o migración específica hacia sitios de inflamación y remodelación, como lo son los tumores [3, 4]. De esta forma, cuando se liberan a la circulación señales químicas como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) entre otras señales asociadas a injuria, remodelación tisular o crecimiento tumoral, se produce la movilización de las MSC hacia dichos sitios [5, 6]. De esta manera las MSC se incorporan a sitios bajo remodelación promoviendo la regeneración tisular y/o desarrollo estromal. A su vez, dichas señales químicas son mediadoras de procesos clave en el desarrollo tumoral. El establecimiento y diseminación de un tumor es un proceso complejo que involucra la interacción entre las células tumorales y su microambiente [7]. De esta forma, las células tumorales pueden activar a las células estromales tumorales, induciendo así la liberación de factores estromales de regulación que afectarían la homeostasis del tejido. Esta interacción puede favorecer no solo el crecimiento tumoral sino también la aparición de metástasis. Aún más, las MSC poseen capacidad parácrina, siendo capaces de secretar factores tal como VEGF que contribuirían como mediadores favoreciendo el crecimiento del tumor y a su vez el establecimiento de un nicho metastásico adecuado [8, 9]. Estas evidencias sugieren una estrecha interacción establecida mediante factores solubles secretados tanto por las células tumorales, el estroma asociado al tumor y por las mismas MSC, que modularía el comportamiento biológico del microambiente y la progresión tumoral.

A pesar de los numerosos estudios sobre los componentes estromales y su modulación sobre la progresión tumoral, poco se conoce sobre la interacción entre MSC, estroma tumoral y célula tumoral en cuanto a los efectos sobre la progresión tumoral, incluso reportando resultados discrepantes según el modelo de estudio. Para comenzar a dilucidar estos mecanismos que llevan a la progresión tumoral y al desarrollo de metástasis creemos que los componentes celulares estromales asociados al tumor, aportado por fibroblastos locales y por MSC derivadas de médula ósea, son clave al establecer un nicho propicio para sustentar el desarrollo del tumor. Como ya se mencionó, dentro de la compleja interacción que puede favorecer la progresión tumoral existen factores químicos definidos que modularían la progresión tumoral y es, en este contexto, que las hormonas tiroideas (HT) podrían modular crecimiento tumoral. De este modo, existen evidencias que sugieren efectos de las hormonas tiroideas (HT) sobre el crecimiento tumoral, además de alteraciones en el eje tiroideo durante el curso de enfermedades neoplásicas, con resultados no concluyentes hasta la fecha. Se ha demostrado mayor incidencia de cáncer en pacientes hipotiroideos y un menor desarrollo de neoplasias en pacientes con hipertiroidismo [10, 11]. Sin embargo también se ha descrito una menor incidencia de carcinoma mamario en pacientes hipotiroideos [12] y una menor incidencia y mortalidad en pacientes tratadas con radioyodo por su hipertiroidismo.

El rol que adquieren las MSC durante la progresión tumoral, una vez que arriban al tumor, sigue siendo controversial y se conoce muy poco sobre los efectos regulatorios de las HT sobre las MSC. Se hipotetiza que las HT se encuentran implicadas en la modulación de propiedades biológicas clave de las MSC, tales como la migración, diferenciación y la angiogénesis. De esta manera, la comprensión de los mecanismos por los cuales las HT afectan al comportamiento de las MSC en cuanto a funciones asociadas a progresión tumoral y diseminación metastásica contribuiría al desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Líneas Celulares y Cultivos Primarios***

Los cultivos primarios de MSC humanas fueron establecidos previamente a partir de aspirados de médula ósea humana de donantes voluntarios para trasplante alogeneico con consentimiento informado, y aprobación de los comités de ética institucionales requeridas [13]. Las MSC fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen/Life Technologies) bajo en glucosa suplementando con 20% Suero Fetal Bovino (SFB; Internegocios S.A.), Penicilina/Estreptomycin 10mg/ml (Invitrogen/Life Technologies) y Glutamina 2mM (Invitrogen/Life Technologies) e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

La línea celular tumoral T-ALL de procedencia humana, CUTLL1 (Columbia University T-cell Lymphoblastic Lymphoma 1), fue cedida por el Dr. Cerchiatti (WeillCornell Medical College) y utilizada

para establecer nuestro modelo *in vivo* xenogéneo. Dicha línea procede de células provenientes de una efusión pleural, donadas por un paciente pediátrico y presentan respuesta biológica a mutaciones de la vía NOTCH [14]. Los cultivos fueron mantenidos con Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI; Gibco®) completo y suplementado con SFB 10% (Gibco®). Por otro lado, también se contó con la línea tumoral inmadura HUT78 (representa células de Leucemia Linfoblástica de células-T cutáneas) y la línea tumoral madura Ly12 (representativa de linfoma anaplásico de células grandes ALK negativo). Ambas líneas fueron tratadas y mantenidas en igual forma que CUTLL1.

La línea celular de microendotelio humano, HMEC-1 (Human Microendothelial Cells-1), fue cedida por el Dr. Candal (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Dichas células retienen las características morfológicas, fenotípicas y funcionales de un microendotelio vascular humano normal<sup>(45)</sup>. Las HMEC-1 fueron cultivadas y mantenidas en medio DMEM alta glucosa completo y suplementado con SFB 10% (Internegocios, SA).

El SFB utilizado fue testeado previamente por ELISA para medir los niveles de HT presentes y constatar que no excedían rango fisiológico. Todos los cultivos utilizados fueron sometidos a controles de contaminación por *Mycoplasma* (*Mycoplasma sp*) en forma mensual.

### **Análisis RT-qPCR de receptores de HT nucleares y de membrana plasmática**

Se evaluó expresión de ARNm de los receptores nucleares para HT (THR $\alpha$  y THR $\beta$ ) mediante RT-qPCR, tanto en MSC como en las líneas celulares HMEC-1 y CUTLL1. Los datos se relativizaron al *housekeeping gene* B2M. La extracción de ARN total fue realizada utilizando Trizol-OneStep RNA Reagent (Bio Basic Inc.) y se obtuvo el cDNA utilizando el kit comercial QUIAGEN según las indicaciones del fabricante. Las secuencias de *primers* utilizadas se exponen a continuación.

Gen	Secuencia	Sentido
B2M	AGATGAGTATGCCTGCCGTGTGAA	Forward
	TGCTGCTTACATGTCTCGATCCCA	Reverse
THR $\alpha$	CTGATCCACATTGCCACAGA	Forward
	TTCCAGGTCCACCTTGTCTC	Reverse
THR $\beta$	ACCAGAGTGGTGGATTTTGC	Forward
	AAGGGACATGATCTCCATGC	Reverse

### **Preparación de Medios Condicionados**

Los medios condicionados preparados a partir de muestras tumorales fueron crecidos en ratones SCID (NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J) inoculados con una dosis de  $2.10^7$  células de CUTLL1 administrada por vía subcutánea sobre el flanco derecho, en la media distal posterior. Brevemente, tras 3,6 semanas post inoculación se extrajeron muestras tumorales que fueron procesados en forma mecánica en fragmentos estimativos de  $1\text{mm}^3$  y dispuestas en pocillos de placa de 24 suplementados con RPMI en ausencia de SFB durante 24h. Tras este periodo, se recolectó el medio de cada pocillo para ser centrifugado a 1250rpm durante 5 minutos a 4°C y fraccionado en alícuotas para su almacenamiento inmediato a -80°C.

Para la producción de medios condicionados por la línea tumoral, las células CUTLL1 en confluencia fueron hambreadas (esto es, en ausencia de SFB) en su medio de cultivo RPMI durante 24 horas. El medio así condicionado fue centrifugado y almacenado como se describió anteriormente.

La producción de medios condicionados en presencia de hormonas requirió una pre-estimulación durante el periodo de hambre de las células CUTLL1 con HT (1nM T<sub>3</sub> y 100nM T<sub>4</sub>; Sigma Chemical Co., St. Louis, MI) acopladas a agarosa [16]. La posible contaminación de HT libre fue analizada mediante RIA probando ser muy bajos, menos de 1 mol de hormonas libres por cada  $10^5$  o  $10^4$  moles de HT acopladas a agarosa. Aún más, se midió la estabilidad de dichos conjugados hormonales con agarosa en el sobrenadante de cultivos tratados durante 24h, los cuales fueron depletados de células y agarosa por medio de centrifugación. En estos medios condicionados no hubo detección de hormonas libres.

### **Ensayo de Migración *in vitro***

La capacidad de inducción de respuesta quimiotáctica de los medios condicionados fue evaluada mediante un esquema de 2 dimensiones en una micro-cámara de quimiotaxis de 48 pocillos

(#AP48 Neuropobe, Inc.). Se utilizaron cultivos de MSC o bien HMEC-1 con un número de pasajes de cultivo bajo (entre 3 y 5 subpasajes); y con 24 horas previas de hambreado. Se sembraron 12.000 células por micro-well y 26,4µl del medio condicionado (por xenotumores o línea celular CUTLL1) y los respectivos controles (RPMI, DMEM bajo glucosa, SFB 5%). La cámara fue incubada a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante un lapso de 4 horas. Se utilizaron membranas de Policarbonato (8µm; Neuropobe, Inc.), la cual para su análisis fue fijada en PFA 4% y teñida con Hoechst (0.1µg/1ml PBS; Molecular Probes, Invitrogen). Para cuantificar los resultados se tomaron imágenes digitales con microscopía de fluorescencia y se contaron los núcleos enteros presentes en cada imagen mediante el uso de CellProfiler (Copyright 2009-2013, BroadInstitute).

### Ensayo de Biodistribución *in vivo*

Las MSC fueron marcadas con el marcador lipofílico fluorescente DiR (0,01mg/ml; Molecular Probes, Invitrogen) durante su hambreado previo a ser inyectadas en una dosis de 4.10<sup>6</sup> células/200µl. Dichas células fueron administradas 2 semanas post inoculación tumoral. La señal fluorescente fue detectada y cuantificada utilizando un bioluminómetro Xenogen (Vivo Vision®/IVIS® Lumina).

### Análisis Estadístico

Los datos se expresaron como media ± SEM. Se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA, o bien la prueba T de Student o de Mann-Whitney, según la distribución de los datos de valor. Las diferencias se consideraron significativas cuando p < 0,05. El software utilizado fue GraphPad Prism®6.

## RESULTADOS PRELIMINARES

### I - Perfil migratorio de MSC derivadas de médula ósea hacia medios condicionados por la línea celular CUTLL1

De modo de establecer un patrón de migración *in vitro* a partir del cual podríamos evaluar efectos moduladores ejercidos por componentes químicos del estroma, en este caso efectos moduladores ejercidos por HT, se evaluó la respuesta de MSC hacia medios condicionados a partir de la línea CUTLL1 y hacia medios condicionados por los xenotumores de la misma línea celular. Se observó que el secretoma de la línea tumoral CUTLL1 ejerce una respuesta quimiotáctica sobre las MSCs y que el medio condicionado por los xenotumores ejerce una respuesta quimiotáctica 3 veces menor, probablemente debido a efectos dilutorios asociados a tamaño tumoral (Figura 1).

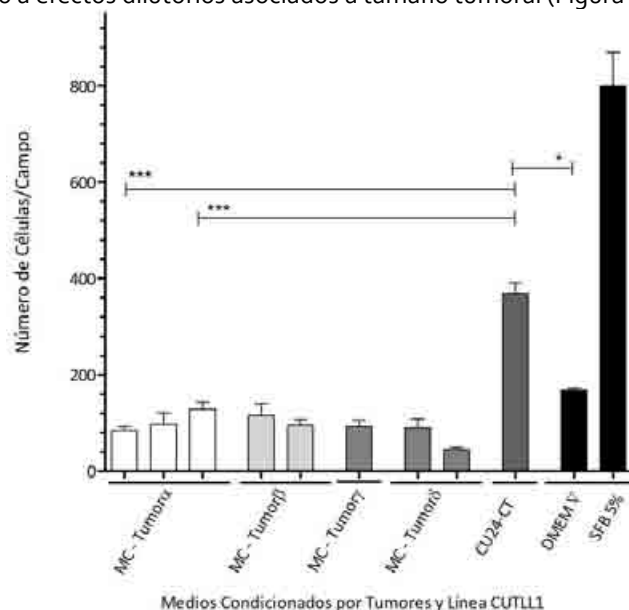
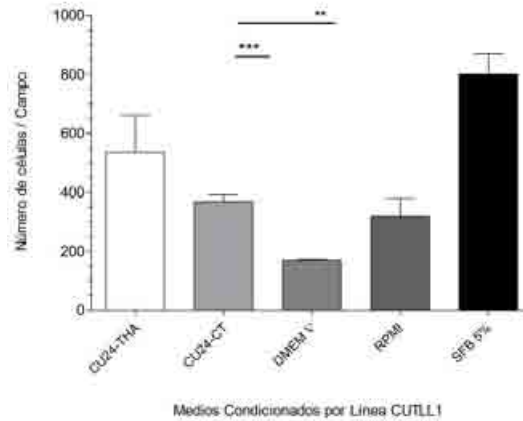


Fig. 1: Respuesta migratoria *in vitro* de MSC frente a medios condicionados por línea tumoral CUTLL1 (CU24-CT); por xenotumores (MC-Tumora, MC-Tumorβ, MC-Tumoraγ, MC-Tumorδ), y sus respectivos controles, DMEM baja glucosa y SFB 5% (Mann-Whitney; \*p<0.05; \*\*\*p<0.0001).



**II - Perfil migratorio de MSC derivadas de médula ósea hacia medios condicionados por la línea celular CUTLL1 con el efecto modulador de las HT.**

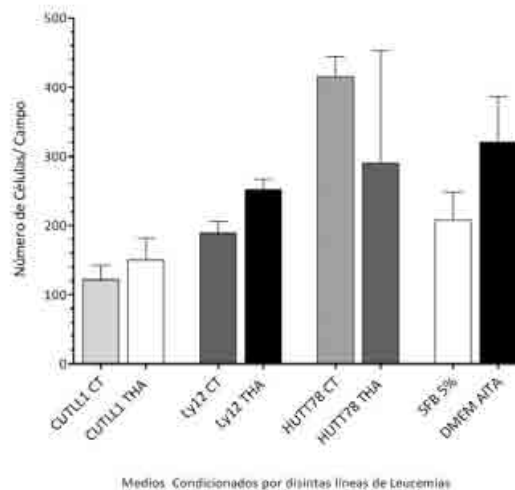
De modo de establecer si las HT presentes en el microambiente tumoral ejercían una modulación sobre el secretoma de células tumorales que afectara la migración de MSC, se pre-estimularon a las células CUTLL1 con HT acopladas a Agarosa. De esta forma, el medio condicionado solo presentará factores solubles secretados por la línea tumoral en ausencia de HT libres que puedan estimular directamente a las MSC migrantes. Se observó que este secretoma induce una tendencia migratoria mayor en las MSC en comparación con el secretoma de CUTLL1 no-estimuladas (Figura 2).



**Fig. 2:** Respuesta migratoria *in vitro* de MSC frente a medios condicionados por línea tumoral CUTLL1 (CU24-CT); por CUTLL1 pre-estimuladas con HT acopladas a agarosa (CU24-THA); y los respectivos controles de quimiotaxis, los medios basales DMEM baja glucosa y RPMI, y SFB 5% (Mann-Whitney) (\*\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ )

**III - Efectos moduladores de las HT sobre otros componentes celulares del estroma tumoral.**

De modo de establecer si otros componentes celulares estromales del microambiente tumoral, como las células microendoteliales se verían moduladas por el secretoma de células tumorales pre-estimuladas con HT, buscamos analizar la respuesta migratoria de células microendoteliales (HMEC-1) hacia secretomas provenientes de células tumorales moduladas por HT. Se utilizó un panel de líneas tumorales celulares representativas de leucemias, encontrando que el secretoma pre-estimulado con HT de CUTLL1 y Ly12 ejercía un leve aumento en la respuesta migratorio de las células microendoteliales, mientras que esto no ocurría en respuesta al secretoma de HUT78 (Figura 3).



**Fig. 3:** Respuesta migratoria *in vitro* de células microendoteliales (HMEC-1) frente a medios condicionados por distintas línea tumorales de leucemia. Los medios condicionados por las líneas celulares en ausencia de estímulo de HT se refieren como CUTLL1 CT, Ly12 CT, HUT78 CT respectivamente. Los medios condicionados provenientes de líneas celulares estimuladas por HT acopladas a agarosa (THA) corresponden a los tratamientos referidos como CUTLL1 THA, Ly12 THA, HUT78 THA; y los correspondientes controles, DMEM alta glucosa a modo de control de quimiotaxis y SFB 5% a modo de control positivo.

#### IV - Expresión de Receptores de HT Nucleares

A fin de establecer si además de los efectos indirectos de las HT sobre la migración de las MSC inducido por el secretoma de células tumorales estimuladas por HT, las HT serían capaces de afectar y/o modular directamente a las MSC se evaluó la expresión de receptores nucleares de hormonas tiroideas (THR $\alpha$  y THR $\beta$ ). Se encontraron niveles elevados de dichos receptores en MSC al comparar con las células de microendotelio HMEC-1 y la línea tumoral CUTLL1. (Figura 4)

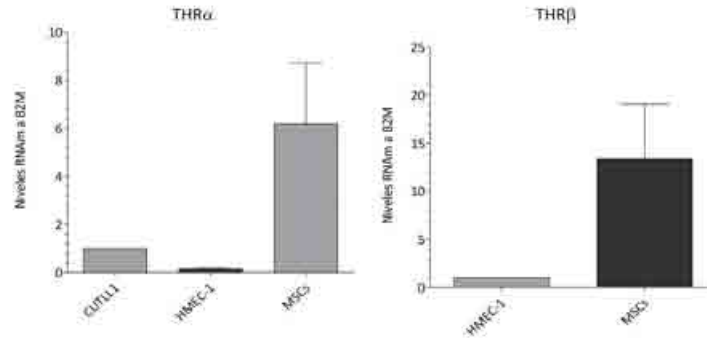


Fig. 4: Expresión de Receptores Nucleares de HT (THR $\alpha$  y THR $\beta$ ) mediante análisis de RT-qPCR. Datos relativizados a B2M.

#### VII – Biodistribución de MSC *ex vivo* en el modelo xenogéneo

Las MSC fueron marcadas previamente a su administración en ratones SCID con el marcador fluorescente DiR+ y fueron visualizadas en tiempo real mediante el uso de bioluminómetro (IVIS Lumina, Xenogen), por medio de detección de señal en el espectro infrarrojo (Figura 5). Observamos señal infrarroja asociada a presencia de MSC en el estroma tumoral donde los niveles alcanzaron un promedio de  $9,47 \times 10^7 \pm 2,03$  (p/sec/cm<sup>2</sup>/sr), indicando una alta capacidad de arribo de las células estromales en el microambiente aportado por células hematológicas neoplásicas. El análisis histopatológico corroboró la presencia de señal infrarroja asociada a MSC.

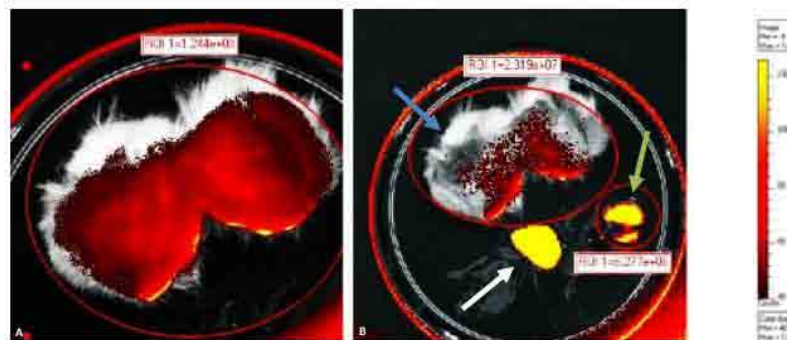


Figura 5: Incorporación de MSC en tumores CUTLL-1. Detección de señal infrarroja (IR) proveniente de MSC, pre-marcadas con DiR (Fluorescente infrarrojo), mediante BLI (A) Cuantificación de señal IR de la masa tumoral aislada. (B) Incorporación de MSC en distintos tejidos: (flecha azul) masa tumoral; (flecha verde): pulmones; (flecha blanca): hígado.

#### CONCLUSIONES PRELIMINARES Y RECOMENDACIONES

Evaluamos el efectos moduladores *in vitro* sobre la migración de MSC ejercido por el secretoma de xenotumores CUTLL-1 o bien por el secretoma proveniente de la línea tumoral representativas de Leucemia (CUTLL1) en presencia de una pre-estimulación o no de HT. Estos medios condicionados ejercen un efecto positivo en la migración quimiotáctica de MSC, aumentando su capacidad de respuesta hacia factores tumorales. Pudimos observar que el efecto quimiotáctico ejercido por el secretoma proveniente de las líneas tumorales es mayor que aquel ejercido por los xenotumores. Esto podría deberse a una concentración diluida de los factores quimiotractantes, dado que los ensayos *in vivo* muestran un fuerte efecto migratorio proveniente del tumor CUTLL1. Se realizarán futuros ensayos con producción de medios condicionados provenientes de muestras de tumores xenogéneos de mayor tamaño y a mayores tiempos (48h-72h). Por otro lado, el enfoque experimental permitió evaluar los efectos indirectos de las HT como componentes del microambiente tumoral, sobre las MSC. Esto es, permitió evaluar los efectos de las HT sobre las células tumorales induciendo un secretoma pre-estimulado con HT acopladas a agarosa, que no permite a las HT libres modular directamente a las MSC. De este modo, observamos un efecto migratorio mayor ejercido por

los medios condicionados provenientes de líneas celulares pre-estimuladas con HT; esto sugiere un efecto diferencial en el comportamiento de MSC, que podría relacionarse con la progresión de patologías neoplásicas hematológicas según el estado del eje tiroideo. Cabe destacar que esta tendencia fue observada en la respuesta migratoria de otras células estromales, las células microendoteliales (HMEC-1), demostrando que otros componentes celulares del estroma tumoral responden a un microambiente tumoral estimulado por HT [17]. Aún más, se han expandido los experimentos a distintos tipos de leucemias, tanto maduras como inmaduras, sistémicas como cutáneas como son las líneas Ly12 y HUT78 respectivamente.

El uso del modelo tumoral xenogéneo, con características que le otorgan relevancia preclínica y farmacológica, dada la presencia de defectos en la vía de señalización de NOTCH, asociados clínicamente con la patología T-ALL, propicia el contexto de microambiente oncológico ideal para abordar preguntas clave en la patogénesis tumoral regulada por el estroma y las MSC. La comprensión de los mecanismos asociados a la interacción ("Cross-talk") entre MSC, estroma tumoral y células neoplásicas, serían de relevancia ya que permitirían identificar nuevos blancos terapéuticos.

Como objetivo a futuro esperamos ahondar en el estudio de las MSC como secretoras clave de factores moduladores en microambientes patológicos tumorales, por otro lado y contando con varios modelos singéneos de leucemias, entre otras patologías oncológicas, nos proponemos estudiar la modulación hormonal ejercida sobre las células neoplásicas que afectan directa o indirectamente a las MSC quienes a su vez modulan al sistema inmune. Aun más, los modelos singéneos nos permitirán estudiar el comportamiento de MSC en un contexto hiper e hipotiroideos durante la progresión tumoral *in vivo*, estableciendo una relación entre migración y homing de MSC, factores neuroinmunomoduladores, como las HT, y el microambiente tumoral.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. Epub 2006/08/23.
2. Friedenstein AJ CR, Latsinik NV et al. Stromal cell responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Transplantation*. 1974;17:331-40.
3. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*. 2009;27(10):2614-23. Epub 2009/08/04.
4. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene therapy*. 2008;15(10):730-8. Epub 2008/04/11.
5. Harold F. Dvorak M. Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986.
6. Mansilla EM, Drago H, Sturla F, Gardiner C, Bossi S, Guzman A, Nunez A, Gil MA, Piccinelli G, Ibar R, Soratti C. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc*. 2006;38:967-9.
7. Joyce J PJ. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Can*. 2009;9:239-52.
8. Shaked Y VE. Bone marrow derived cells in tumor angiogenesis and growth: are they the good, the bad or the evil? *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1796(1):1-4.
9. Zhang T LY, Rui YF, Cheng TY, Jiang XH, Li G. Bone marrow-derived MSCs promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res & Ther*. 2013;4 70.
10. JA. F. Thyroid disease and its treatment: short- and long-term consequences. *J R Coll Physicians Lond*. 1999;33(6):564-7.
11. Reddy A DC, Leerapun A, Mettler TA, Stadheim LM, Lazaridis KN, Roberts RO, et al. Hypothyroidism: a possible risk factor for liver cancer in patients with no known underlying cause of liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5 (1):118-23.
12. Cristofanilli MY, Kau SW, Bevers T, Strom S, Patangan M, Hsu L, et al. Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer*. 2005;103(6):1122-8.
13. Bolontrade MF, Sganga L, Piaggio E, Viale DL, Sorrentino MA, Robinson A, et al. A specific subpopulation of mesenchymal stromal cell carriers overrides melanoma resistance to an oncolytic adenovirus. *Stem cells and development*. 2012;21(14):2689-702. Epub 2012/04/03.
14. Palomero T, Barnes KC, Real PJ, Glade Bender JL, Sulis ML, Murty VV, et al. CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to gamma-secretase inhibitors. *Leukemia*. 2006;20(7):1279-87. Epub 2006/05/12.
15. Ades EW, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*. 1992;99(6):683-90.
16. Frick LR, Rapanelli M, Bussmann UA, Klecha AJ, Arcos ML, Genaro AM, et al. Involvement of thyroid hormones in the alterations of T-cell immunity and tumor progression induced by chronic stress. *Biological psychiatry*. 2009;65(11):935-42. Epub 2009/01/27.
17. Cayrol F, Flaque MC, Tharu F, Shao NY, Sterle HA, Bolontrade M, et al. Integrin avb3 acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells. *Blood*. 2015;125(5):841-51.

# RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA S100A9 Y DE SU REGULACIÓN POR ÓXIDO NÍTRICO (NO)

**Natalia P. Balarino**

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

**Directora:** Dra. Ana María Eiján

## RESUMEN

El cáncer de vejiga (CaV) es la segunda causa de muerte por tumores urológicos en el hombre. Los tumores se clasifican en no invasor del músculo (NMI) e invasores y según el grado histológico en bajo grado (G) o alto G, siendo los últimos de peor pronóstico. Anteriormente el equipo ha demostrado que la expresión de la enzima iNOS, productora de altos niveles de óxido nítrico (NO) en CaV humano, está asociada con recurrencia temprana e invasión. Mediante un ensayo proteómico se ha demostrado que el tratamiento del tumor MB49, de CaV murino, con L-NAME (inhibidor de la producción de NO) disminuyó la expresión de la proteína S100A9. En varios tumores se ha descrito que S100A9 es un marcador de mal pronóstico asociado al reclutamiento de células mieloides supresoras (MDSC). Esto también se ha observado en una muestra piloto de tumores de vejiga humanos. En tumores invasores hay significativamente mayor cantidad de linfomonocitos S100A9 positivos comparado con tumores NMI. Como objetivo se planteó analizar la relevancia biológica de la proteína S100A9 en tumores de vejiga humanos y murinos. La hipótesis es que el incremento de linfomonocitos S100A9 positivos en el tumor o en sangre periférica de pacientes con CaV, será un marcador de progresión y de falta de respuesta a la inmunoterapia con BCG.

## ABSTRACT

Bladder cancer (BCa) is the second leading cause of death for urological tumors in men. Tumors are classified as non-muscle invasive (NMI) and invasive and by histologic grade low-grade (G) or high G, the latter being with worst prognosis. Previously it was demonstrated that iNOS expression, enzyme that produces high levels of nitric oxide (NO), in human BCa is associated with early recurrence and invasion. Using a proteomic assay it was demonstrated that treatment of murine BCa tumor MB49, with L-NAME (inhibitor of NO production) decreased S100A9 expression. It has been described in several tumors that S100A9 is a marker of poor prognosis associated with myeloid suppressor cells recruitment (MDSC). This was also observed in a pilot sample of human bladder tumor. The group demonstrated that invasive tumors have significantly more lymphomonocytes S100A9 positive compared with NMI tumors. The objective of this project was to analyze the biological relevance of protein S100A9 in human and murine bladder tumors. Our hypothesis is that the increased of positive S100A9 lymphomonocytes in the tumor or peripheral blood of patients with BCa, could be a marker of progression and lack of response to BCG immunotherapy.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de vejiga es la segunda causa de muerte por tumores urológicos en el hombre. En Argentina se registran 3546 nuevos casos/año (<http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>, Globocam 2012). Los tumores se clasifican en no invasor del músculo (NMI o pT<sub>1</sub>) e invasores del músculo detrusor (pT<sub>2</sub>, pT<sub>3</sub> y pT<sub>4</sub>) y según el grado histológico en bajo grado (G) o alto G, siendo los últimos de peor pronóstico.

Es uno de los primeros tumores asociados con la exposición laboral a las anilinas y sus derivados [1] y en la actualidad el consumo de cigarrillos es el principal factor de riesgo. Aproximadamente el 90% de los CaV se originan en el epitelio transicional, y se denominan carcinoma transicional de vejiga. En lo sucesivo, teniendo en cuenta lo antedicho, se utilizará el término cáncer de vejiga como un sinónimo de carcinoma transicional de vejiga.

Al momento del diagnóstico alrededor del 75 % de estos tumores son NMI, si son únicos y de bajo G la resección transuretral (RTU) es curativa. En el caso de tumores NMI pT<sub>1</sub> de alto G o de

carcinoma in situ, la instilación endovesical, post RTU, con Bacilo Calmette Guérin (BCG) constituye el mejor tratamiento para prevenir progresión y recurrencia. Sin embargo, aproximadamente del 30% al 50% de los pacientes no responden al tratamiento, progresando hacia la invasión. Esto implica la necesidad de aplicar terapias más radicales como la cistectomía o radioterapia más quimioterapia sistémica. Sin embargo, a pesar de los tratamientos los pacientes con tumores invasores tienen un riesgo del 50 % de desarrollar metástasis en los 2 años y el 60 % morirán dentro de los 5 años [2].

La capacidad de predecir la respuesta al tratamiento (RTU y/o BCG) como así también de identificar pacientes con mayor riesgo de progresar a enfermedad invasora será una herramienta valiosa en el momento de decidir la terapia más adecuada. Es por ello que consideramos que es importante encontrar nuevos marcadores que permitan reconocer aquellos pacientes que, siendo de bajo riesgo con los indicadores utilizados actualmente, tengan mayor chance de progresión. Esto permitirá el médico realizar tratamientos más adecuados en los inicios de la enfermedad, mejorando las posibilidades de curación.

A pesar de los grandes adelantos en investigación básica y clínica que identifican nuevas moléculas (sobrexpresión de oncogenes, inactivación genes supresores, aumento de actividad enzimática etc.) como predictores de agresividad la realidad es que ninguno de ellos se utiliza aún en la clínica y el manejo de pacientes con CaV, se sigue realizando en función de los marcadores conocidos de grado histológico y estado de invasión.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre producido por las enzimas NO sintasas (NOS). Anteriormente identificamos a la expresión de la isoforma inducible iNOS, enzima productora de altos niveles de NO, como un marcador de mal pronóstico en el CaV ya que se podía asociar a la disminución del tiempo libre de recurrencia e invasión tumoral [3, 4]. También identificamos que el NO producido por las células tumorales puede detectarse en la orina de aquellos pacientes que expresan iNOS y que su concentración puede ser usada como marcador de presencia tumoral [3]. La expresión de la enzima iNOS y en consecuencia, la producción de NO pueden a su vez modificar mecanismos biológicos alterando la expresión de proteínas, así como el perfil inmunológico del paciente, con cambios que se vinculan con la progresión tumoral. En base a estos antecedentes se podría plantear a la inhibición de la producción de NO como un blanco terapéutico en pacientes cuyos tumores expresan iNOS.

La proteína S100A9 pertenece a la superfamilia de proteínas inflamatorias S100 con dos sitios de unión a calcio. Esta proteína forma heterodímeros con S100A8 denominado calprotectina, originalmente descrita como una proteína inmunogénica expresada y secretada por neutrófilos, que actúa como un mediador pro-inflamatorio en la inflamación aguda y crónica. La expresión de S100A9 se ha vinculado con la progresión tumoral y con mal pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón, de tracto gastrointestinal y de mama [5]. Es importante el hecho de que esta proteína puede expresarse tanto en células tumorales como también en linfomonocitos que infiltran los tumores [6].

Cuando S100A9 se expresa en células tumorales induce el reclutamiento de células inmunes, que en su mayoría son células supresoras derivadas del linaje mielóide MDSC, (del inglés *myeloid derived suppressor cells*) y regulan negativamente la respuesta inmune hacia el tumor, por lo que se vinculan con la progresión tumoral [7]. Por otro lado se ha demostrado que la expresión de S100A9 es un marcador de MDSC [8].

En humanos las células supresoras derivadas de la serie mielóide se dividen en dos linajes: granulocítico y monocítico que expresan CD15 y CD14 respectivamente. En ratones las MSDC se reconocen por la expresión de CD11b<sup>+</sup> y GR1<sup>+</sup>. Estas son células inmaduras provenientes de la médula ósea que suprimen la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos. Son capaces de inhibir la presentación antigénica así como la función de los linfocitos T a través de la producción de NO y de especies reactivas del oxígeno. La serie monocítica está asociada con un incremento en la actividad de iNOS y de la enzima arginasa (ARG), mientras que la serie granulocítica se asocia a la expresión y actividad solo de ARG [9].

En cáncer de vejiga la información es menos abundante. Sin embargo, se sabe mediante ensayos de carcinogénesis en modelos murinos, que la expresión de varias proteínas de la familia S100 están implicadas en la generación de tumores en vejiga y asociadas al potencial invasor de estos [10].

También se ha detectado que la expresión de S100A9 en suero de pacientes con CaV es un factor de mal pronóstico asociado a mayor grado histológico y a recurrencia tumoral [11]. Un grupo de investigadores en la Universidad Nacional de Hungebuk en Korea del Sur proponen como marcador de

progresión en tumores de vejiga una firma de cuatro genes entre los que se encuentran el gen de S100A8 y S100A9 [12, 13].

Nuestro grupo, mediante estudios proteómicos en un modelo de tumor de vejiga murino MB49, ha encontrado que la expresión de S100A9 disminuye unas 50 veces cuando los animales son tratados con L-NAME (inhibidor de la producción de óxido nítrico) (resultados no publicados). La disminución en la expresión de S100A9 va asociada a la disminución de MDSC y a la inhibición del crecimiento de los tumores. En vista de estos resultados en modelo experimental decidimos estudiar la proteína en una muestra piloto de tumores de vejiga humanos. Encontramos que los tumores invasores presentan un mayor número de linfomonocitos que expresan S100A9, en comparación con los tumores NMI. Este resultado sugiere que este infiltrado de células S100A9 positivas podría ser un marcador de mal pronóstico, que permita subestadificar pacientes [14].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestras murinas*

#### **Ensayo de crecimiento tumoral in vivo:**

**Subcutáneo** Se inocularon células MB49 ( $2,5 \times 10^5$  cel/ratón) de forma subcutánea en ratones singénicos C57BL/6J. La mitad de los ratones de cada grupo recibió L-NAME en el agua de la bebida (0,2g/kg ratón). El crecimiento de tumor fue registrado dos veces por semana con calibre, se realizó midiendo dos diámetros perpendiculares, se utilizó la fórmula  $D \times d^2$ , (donde  $D$  y  $d$  son diámetro mayor y menor respectivamente) para calcular el tamaño del tumor.

**Ortotópico** Se inocularon  $2,5 \times 10^4$  células MB49 /ratón, en la vejiga de ratones C57BL/6J. La mitad de los ratones de cada grupo recibió L-NAME en el agua de la bebida (0,2g/kg ratón). Se determinó el crecimiento del tumor mediante el peso de la vejiga y posterior confirmación histológica.

**Cuantificación de MDSC** Las MDSC fueron cuantificada en suspensiones de tumor, bazo, ganglio drenante y contralateral de ratones portadores de tumor MB49 creciendo en subcutáneo, mediante citometría de flujo. Las suspensiones celulares fueron incubadas en buffer de citometría (buffer fosfato, 10% SFB, 0,1% azida sódica) y se marcaron durante 30 min a 4 °C con los anticuerpos específicos CD11b<sup>+</sup> y GR1<sup>+</sup> (eBioscience), los datos se analizaron con el programa FlowJo.

**Suspensiones celulares** Para obtener esplenocitos se realizó una suspensión mecánica del bazo, luego se eliminaron los glóbulos rojos con una solución de cloruro de amonio – Tris (pH 7,2). Las células de los ganglios drenantes del tumor y los contralaterales fueron obtenidas mediante disgregación mecánica entre dos portaobjetos. Las células de tumor fueron obtenidas por disgregación enzimática con solución de pronasa (0,01% en medio 199, Difco) y DNAsa (1-2,4 mg/ml) durante 30 min. El número de células de cada cultivo y su viabilidad se evaluó con hemocitómetro por el método de exclusión de trypan blue.

**Análisis estadístico:** Las diferencias estadísticas fueron calculadas utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis o el test de Mann Whitney y el Test de Student. Para el análisis se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5,00,  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

### **Muestras humanas**

Se utilizaron cortes de parafina (archivo del Departamento de Patología del Instituto Ángel H. Roffo, de los años 1996 a 2007) 19 tumores, 12 NMI y 7 invasores (INV), (17 hombres y 2 mujeres, edad media 60 años, rango de 42 a 78 años). Se analizó la expresión de iNOS, ARG, S100A9, CD14 y CD15 por inmunohistoquímica, con anticuerpos primarios específicos: anti-iNOS (Abcam ab-15323 1:1200), anti-ARG (Santa Cruz Biotechnology sc-20150, 1:140), anti-S100A9 (Novus Biological NB110-89726, 1:30.000), anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinilado (Vector Laboratories, Inc, 1:500). Para identificar células mieloides que infiltran el tumor del linaje monocítico o granulocítico se emplearon los anticuerpos anti-CD14 y CD15 respectivamente (Dako Laboratorios, 1:300). El ensayo ha sido aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo y cumple con las normas éticas incluidas en la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983.

## RESULTADOS

### ***Tumores Murinos***

Utilizando el modelo de CaV murino MB49, el cual genera tumores NMI que expresan iNOS se demostró que la inhibición de la producción de NO con L-NAME no sólo redujo el crecimiento tumoral ortotópico (Figura 1A), sino también el porcentaje de ratones con tumor, ya que el 75% de los ratones presentaron remisión total del tumor luego del tratamiento (Figura 1B). Estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica (Figura 1C). La reducción del crecimiento tumoral en respuesta a la inhibición del NO fue acompañada por la pérdida de la expresión de S100A9 en los tumores (Figura 1D).

Para evaluar cómo afecta la producción de NO por parte de los tumores iNOS+ en la inmunoterapia con BCG, se utilizó un modelo de crecimiento tumoral en subcutáneo. Se observó que, al igual que ocurre en el crecimiento ortotópico, L-NAME inhibe el crecimiento subcutáneo del tumor MB49, lo cual valida esta vía de inoculación tumoral. Se demostró que tanto BCG como su combinación con L-NAME inhiben el crecimiento tumoral (Figura 2A). Para evaluar la respuesta inmune de los ratones portadores de tumor luego de los diferentes tratamientos se cuantificó el número de MDSC en el bazo y en el ganglio drenante al tumor (Figura 2B y C respectivamente). Nuestros resultados muestran que existe un incremento en el número de MDSC (CD11b<sup>+</sup> / GR1<sup>+</sup>) en los ganglios drenantes y en el bazo de los portadores de tumor. Se encontró que tanto el tratamiento con BCG como su combinación con L-NAME fueron capaces de revertir el aumento de MDSC presentes en los ganglios drenantes (Figura 2B). Por otro lado, solo el tratamiento combinado fue capaz de normalizar el número de MDSC en el bazo (Figura 2C). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la inhibición del NO es un buen blanco terapéutico reduciendo en parte la generación de una respuesta inmune supresora.

### ***Tumores Humanos***

Se analizaron 13 tumores de bajo grado (G) no músculo invasores (NMI), 15 de alto G NMI y 11 de alto G invasores. Nuestros resultados muestran expresión de S100A9 a nivel de las células tumorales en 23% (3/13) de los tumores de bajo G, 46% (12/26) de alto G, 38% (11/29) de los NMI y un 45% (5/11) de los invasores.

Se identificó que la proteína S100A9 se expresó tanto a nivel de las células tumorales como en las células hematológicas que infiltran los tumores (Figura 3). Estas últimas se encontraron dentro de los vasos y en algunos casos infiltrando el tumor.

No se encontraron diferencias significativas a nivel de la expresión de S100A9 en células tumorales de tumores NMI e invasores. Sin embargo se ha detectado una correlación positiva entre la expresión de iNOS y S100A9 en las células tumorales ( $p=0.0003$ , test de Correlación de Pearson), sugiriendo que la expresión de ambas proteínas estaría vinculada (Figura 4)

La expresión de ARG en las células que infiltran los tumores (también llamadas acompañantes) es similar en tumores NMI e invasores (dato no mostrado). Los tumores invasores presentaron un mayor número de células inmunes supresoras, caracterizadas por la expresión de S100A9, en comparación con los tumores NMI. En los tumores invasores hubo un predominio de células acompañantes que expresaron S100A9 frente a las que expresaron iNOS (Figura 5A). Las células acompañantes con expresión de S100A9 fueron consideradas células inmunosupresoras, mientras que las que expresaron iNOS fueron consideradas con función citotóxica. En consecuencia, el resultado sugirió que en los tumores de peor pronóstico, existiría un reclutamiento de células inmunes que expresan un fenotipo inmunosupresor (S100A9). Este infiltrado de células es a predominio de monocitos/macrófagos (CD14) en los tumores NMI, mientras que en los invasores hubo un nivel similar de células CD14 y CD15, indicando que tanto la serie monocítica como la granulocítica estuvieron en proporciones similares en los tumores de peor pronóstico (Figura 5B).

## DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevos marcadores de predicción es de suma importancia para identificar pacientes con mayor riesgo de progresión y así orientar al médico en la administración de terapias más adecuadas.

Como se menciona previamente, el grupo ha demostrado que la expresión de la enzima iNOS, productora de altos niveles de NO, es un marcador de mal pronóstico en pacientes con CaV y está asociada a recurrencias



tempranas e invasión tumoral [3, 4]. Otros grupos han sugerido que la expresión de esta enzima estaría relacionada con la falta de respuesta a BCG [9].

Resultados preliminares de análisis proteómico del laboratorio utilizando el modelo murino MB49 demuestran que el tumor expresa la proteína S100A9, la cual a su vez se ha asociado a un fenotipo inmunosupresor [8]. La inhibición de la producción de NO con un análogo de la arginina como el L-NAME, reduce la expresión de la enzima al mismo tiempo que reduce el crecimiento tumoral. En el presente trabajo hemos analizado la expresión de S100A9 en tumores humanos y murinos y su vinculación con la producción de NO.

Los resultados indican que los tumores humanos invasores presentan una mayor cantidad de células inmunes acompañantes que expresan un fenotipo inmunosupresor (S100A9) comparado con los tumores NMI. Estos resultados proponen que el infiltrado de células MDSC con expresión de S100A9, sería un marcador de mal pronóstico que sugiere progresión tumoral.

La correlación entre la expresión de iNOS y S100A9 en células tumorales de pacientes sugiere la posibilidad de que la producción de NO en altas concentraciones y por tiempo prolongado sea capaz de inducir un perfil inmunológico supresor. Esto nos hace plantear la hipótesis de que la inhibición de la producción de NO puede ser un blanco terapéutico en pacientes que expresen iNOS ya que sería capaz de disminuir el número de MDSC y capacitar al paciente para que monte una respuesta inmune satisfactoria contra el tumor.

Esta hipótesis fue puesta a prueba mediante la experimentación en el modelo murino de CaV. Los resultados muestran que el inhibidor de la producción de NO, L-NAME, reduce el crecimiento del tumor MB49 tanto en la vejiga como en el subcutáneo. Esta reducción es acompañada por la disminución en la expresión de la proteína S100A9. Se pudo demostrar que el tratamiento combinado de BCG con L-NAME es más eficaz que los tratamientos por separado para restaurar la respuesta inmune disminuyendo el número de células con función supresora.

En conjunto, los resultados muestran que la expresión de S100A9 por parte de células inmunológicas es un buen marcador de progresión tumoral. Por otro lado, a través de la experimentación utilizando un modelo *in vivo* se demuestra que la inhibición de la producción de NO es un buen blanco terapéutico que no solo reduce el tamaño tumoral, sino también disminuye el número de células supresoras permitiendo una respuesta inmune más adecuada que favorece el tratamiento con BCG.

## CONCLUSIONES

La expresión de S100A9 en células tumorales se asocia con la expresión de iNOS, sugiriendo que la producción de óxido nítrico generaría un tumor con capacidad inmunosupresora. Además, se observó un mayor número de células inmunosupresoras (S100A9 positivas) en los tumores de vejiga invasores. Estos resultados muestran a S100A9 como un potencial blanco terapéutico en el cáncer de vejiga. Podríamos hipotetizar que la disminución de S100A9 mediante la inhibición de iNOS, podría permitir al sistema inmune reconocer y atacar eficientemente a las células tumorales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jung, I., Messing, E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. *Cancer Control*, 7: 325, 2000
2. Simon MA, Lokeshwar VB, Soloway MS. Current bladder cancer tests: unnecessary or beneficial? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003 Aug; 47(2):91-107. Review
3. Sandes EO, Faletti AG, Riveros MD, Vidal M del C, Gimenez L, Casabe AR, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in tumoral and non-tumoral epithelia from bladder cancer patients. *Nitric Oxide*. 2005;12:39-45.
4. Sandes EO, Lodillinsky C, Langle Y, Belgorosky D, Marino L, Gimenez L, et al. Inducible nitric oxide synthase and PPARgamma are involved in bladder cancer progression. *J Urol*. 2012;188:967-73.
5. Kawai H, Minamiya Y, Takahashi N. Prognostic impact of S100A9 overexpression in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2011 Aug; 32(4):641-6. Epub 2011 Mar 3
6. Gebhardt C, Németh J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochemical pharmacology*. 2006 72, 1622 – 1631
7. Wang L, Chang EW, Wong SC, Ong SM, Chong DQ, Ling KL. Increased myeloid derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J Immunol*. 2013 Jan 15; 190(2):794-804. doi:10.4049/jimmunol.1202088. Epub 2012 Dec
8. Zhao F, Hoechst B, Duffy A, Gamrekelashvili J, Fioravanti S, Manns MP, et al. S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells. *Immunology*. 2012 Jun;136(2):176-83. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03566
9. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol*. 2011;32:19-25.
10. Dokun OY, Florl AR, Seifert HH, Wolff I, Schulz WA. Relationship of SNCG, S100A4, S100A9 and LCN2 gene expression and dna methylation in bladder cancer. *int j cancer*. 2008 dec 15;123(12):2798-807
11. Minami S, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Kawashima Y, Yoshio K, et al. Proteomic study of sera from patients with bladder cancer: usefulness of S100A8 and S100A9 proteins. *Cancer Genomics Proteomics*. 2010 Jul-Aug;7(4):181-9.
12. Kim SK, Kim EJ, Leem SH, Ha YS, Kim YJ, Kim WJ. Identification of A100A8-correlated genes for prediction of disease progression in non-muscle invasive bladder cancer. *BMC Cncr* 2010, 10: 21-31.
13. Kim WJ, Kim SJ, Jeong P, Yun SJ, Cho IC, Kim IY, et al. A four-gene signatures predicts disease progression in muscle invasive bladder cancer. *Mol Med* 2011, 17 (5-6): 478-485.
14. Langle Y, Sandes E, Belgorosky D, Balarino N, Prack Mc Cormick B, Marino L, et al. *Revista Argentina de Urología* vol 79 Nro 2 64-70, 2014. ISSN 0327-3326)

ANEXO

Figura 1

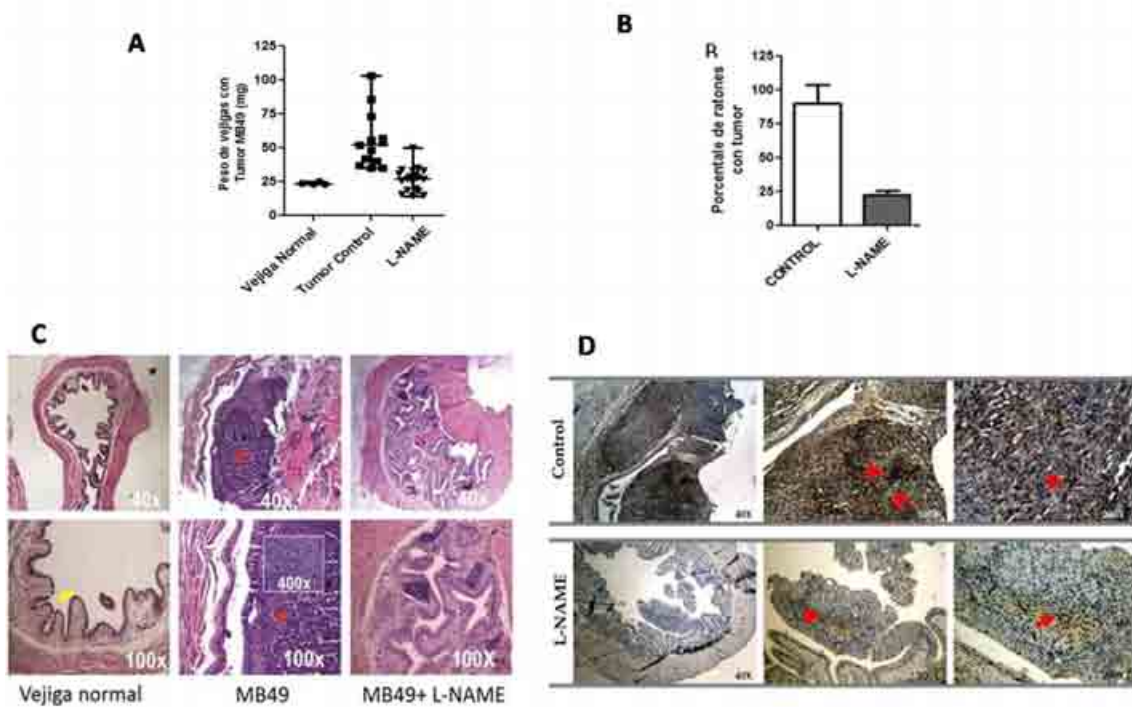


Figura 2

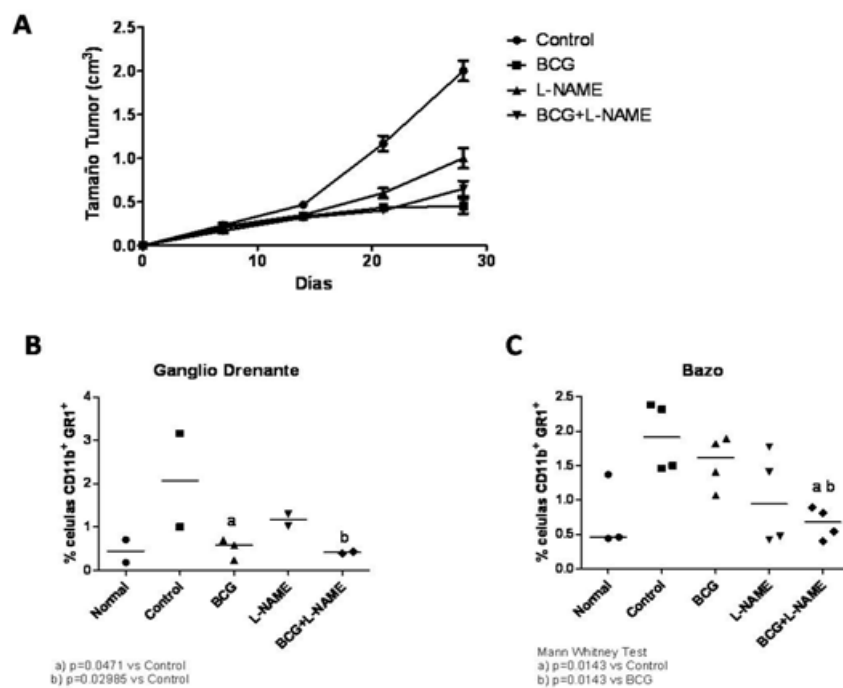


Figura 3

Expresión de S100A9 en tumores de vejiga humanos

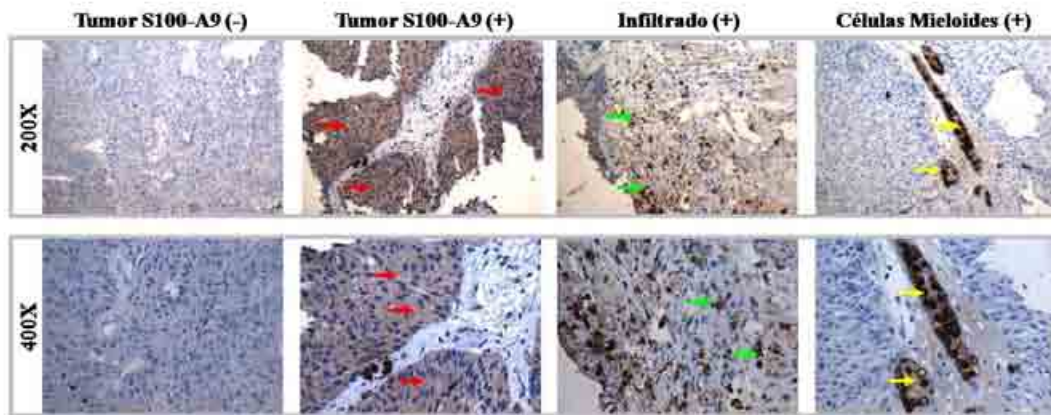


Figura 4

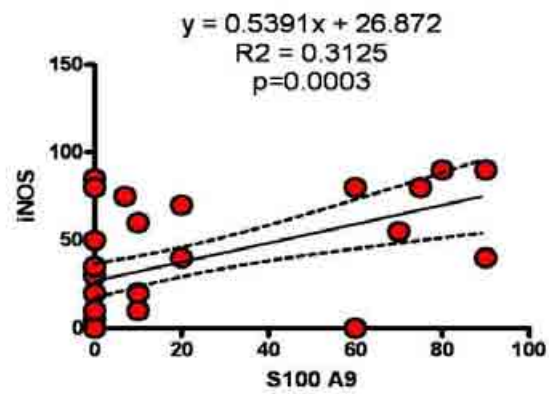
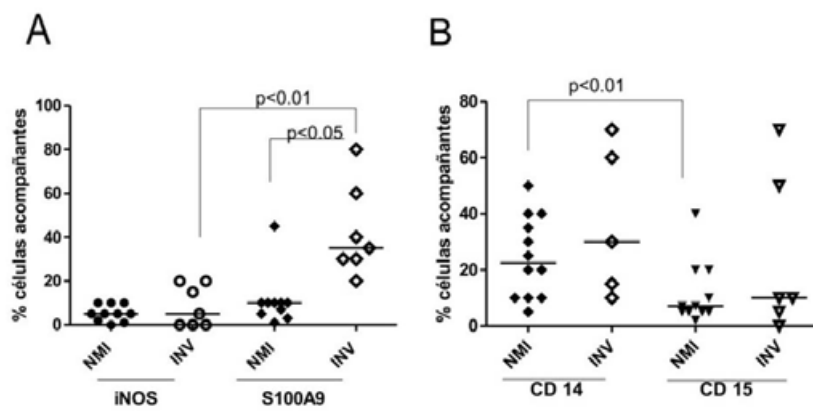


Figura 5



**Figura 1:****A)** L-NAME reduce el crecimiento ortotópico de los tumores de vejiga MB49 (a:  $p < 0.01$  vs vejiga normal, b:  $p < 0.05$  vs tumor MB49). **B)** Porcentaje de ratones con tumor de vejiga luego del tratamiento. **C)** Coloración de hematoxilina-eosina, epitelio vejiga normal (flecha amarilla), tumor MB49 (flecha roja). **D)** Expresión de S100A9, intensa en tumores MB49 (flecha roja panel superior), leve en tumores tratados con L-NAME (flecha roja, panel inferior).

**Figura 2:****A)** L-NAME y BCG+L-NAME inhiben el crecimiento del tumor murino MB49 ( $p < 0.05$ ). **B)** Porcentaje de MDSC ( $GR1^+ / CD11b^+$ ) en ganglio drenante al tumor. **C)** Porcentaje de MDSC ( $GR1^+ / CD11b^+$ ) en bazo.

**Figura 3:** La expresión de S100A9 determinada por inmunohistoquímica, se detectó en el citoplasma de las células malignas de los tumores de vejiga (flecha roja), en células mieloides dentro de los vasos que irrigan al tumor (flecha amarilla) y en células inmunes que infiltran el tumor (también denominadas como células acompañantes: flecha verde).

**Figura 4:** La expresión de S100A9 e iNOS en células del tumor muestran una correlación positiva sugiriendo que la sobreexpresión de iNOS induce expresión de S100A9.

**Figura 5:** Expresión de S100A9 en células acompañantes. **A)** Porcentaje de células que expresan iNOS y S100A9 en células acompañantes que infiltran los tumores NMI e invasores de vejiga. **B)** Porcentaje de células del linaje monocítico (CD14) y del linaje granulocítico (CD15) en tumores de vejiga. (NMI: no músculo invasores, INV: invasores)

# ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN LA ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A LA TERAPIA ENDOCRINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE MAMA

**Melina Elena Bilinski**

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET), Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal

**Directora:** Victoria Teresa Fabris

## RESUMEN

La mayoría de los tumores mamarios son aneuploides, consecuencia de la inestabilidad cromosómica, la cual puede ser generada por defectos en la duplicación de los centrosomas, tales como centrosomas supernumerarios en respuesta a la desregulación de ciclina A y *polo-like kinase 4* (PLK4).

El objetivo fue evaluar los mecanismos asociados a aneuploidía e inestabilidad cromosómica y su participación en la respuesta a antiprogéstágenos en los carcinomas mamarios inducidos por acetato de medroxiprogesterona, tumores que son hormono dependientes (HD) o independientes (HI), y sensibles o resistentes al tratamiento.

Por citometría de flujo, uno de los tumores aneuploides HI resistentes mostró mayor dispersión de valores en fase G<sub>1</sub>, lo que se asocia con mayor inestabilidad cromosómica. Por inmunofluorescencia contra  $\gamma$ -tubulina, se observó un aumento del número de centrosomas en ciertos tumores HI aneuploides. Sin embargo, los tumores presentaron valores de cantidad de centrosomas por núcleo similares a los reportados para células epiteliales de mama normal. Además, tampoco se observaron diferencias en la expresión de PLK4. Por otro lado, los resultados sugieren que un aumento en la expresión de ciclina A podría estar asociado con la resistencia a la terapia endocrina, como fue observado en dos familias tumorales del modelo experimental.

## ABSTRACT

Most of the breast tumors display aneuploidy, a direct outcome of chromosome instability which can be achieved by defects in centrosome duplication. The deregulation of proteins such as, cyclin A and polo-like kinase 4 (PLK4), can result in supernumerary centrosomes.

The aim of this work was to evaluate the mechanisms involved in aneuploidy and chromosome instability, and their participation in the response to endocrine therapy in the MPA breast cancer model, with hormone dependent (HD) or hormone independent (HI) tumors, and different response to endocrine therapy.

By flow cytometry, one of the unresponsive HI tumors showed the greatest value dispersion in the G<sub>1</sub> phase, meaning that this tumor will exhibit an unstable karyotype. By immunofluorescence, using an antibody against  $\gamma$ -tubulin, an increased number of centrosomes was observed in some HI aneuploid tumors. However, tumors exhibited values of amount centrosomes by nucleus similar to those reported for normal breast epithelial cells. Moreover, studies revealed no significant differences in PLK4 expression levels between the different mammary tumors. On the other hand, the results suggest that an increase in cyclin A expression could be related to endocrine therapy resistance, as it was observed in two tumor families of the experimental model.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los cánceres de mama humano son aneuploides [14] y esta característica es consecuencia de la inestabilidad cromosómica (*Chromosomal instability*, CIN) [1]. La aneuploidía es un estado que describe el cariotipo celular; el número de cromosomas en una célula u organismo que se desvía del número haploide. En cambio, la CIN se define como una tasa persistente de pérdida y ganancia de cromosomas, debido a un incremento de la tasa de errores en la segregación cromosómica

[14]. Para algunos autores, la CIN es directamente proporcional al grado de aneuploidía. Por lo tanto, cuanto mayor sea la variabilidad del cariotipo respecto del modal de una célula, ya sea diploide o tetraploide, mayor es la CIN. Se ha demostrado que el grado de CIN estaría asociado con el pronóstico en cáncer de mama; tumores más inestables presentan un peor pronóstico, mientras que tumores con cariotipos aneuploides pero estables pueden tener buen pronóstico [8].

La CIN es causada por errores en la segregación de los cromosomas durante la mitosis. Uno de los procesos involucrados en la migración de los cromosomas es la duplicación de los centrosomas [13]. Los centrosomas son organelas formadas por un par de centriolos, rodeados por una matriz de material pericentriolar (PCM) y a la cual se van a anclar los microtúbulos, a partir de los complejos de  $\gamma$ -tubulina. La duplicación de los centrosomas comienza durante la fase G<sub>1</sub>/S y se completa en G<sub>2</sub>/M. Primero ocurre la síntesis de nuevos centriolos, luego se acumulan componentes de la PCM y fibras de tubulina (maduración) y finalmente se separan los centriolos para formar cada uno un polo del huso mitótico. El proceso de duplicación de los centrosomas está muy bien regulado y coordinado con la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular. Uno de los puntos de control está asociado con la actividad de los complejos Cdk/ciclina A y E, quienes participan en los tres procesos mencionados. La regulación de quinasas, como la *polo-like kinase 4* (PLK<sub>4</sub>), también participa en el control de dicho proceso.

La CIN sería consecuencia de la amplificación de los centrosomas por la desregulación en la expresión de las proteínas antes mencionadas. Se observa mayor expresión de ciclinas A y E en tumores aneuploides e inestables y con anomalías en los centrosomas. Además, la sobreexpresión de E2F y la amplificación de genes regulados por dicho factor de transcripción, como PLK<sub>4</sub>, se han asociado a CIN en cáncer de mama [4].

En el Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal se ha desarrollado el modelo experimental de inducción de carcinomas mamarios en ratones hembra BALB/c mediante la administración prolongada de acetato de medroxiprogesterona (MPA). En su mayoría son carcinomas ductales, metastásicos, y expresan elevados niveles de receptores hormonales. Los tumores en principio presentan un comportamiento hormono dependiente (HD), es decir que necesitan del aporte exógeno del MPA para crecer, pero ocasionalmente surgen variantes hormono independientes (HI). Las variantes HI pueden responder al tratamiento con antiprogéstágenos o ser resistentes a la terapia endocrina (resistencia constitutiva). Además, por presión selectiva, se obtuvieron variantes HI resistentes al antiprogéstágeno mifepristona (MFP), (resistencia adquirida) [9].

Utilizando este modelo experimental y en base a lo mencionado anteriormente se postula que la aneuploidía observada en la mayoría de los carcinomas mamarios HI del modelo murino, podría deberse a la amplificación de los centrosomas. Esto a su vez podría contribuir con la progresión tumoral, ya que el desbalance génico como consecuencia de la aneuploidía podría estar relacionado con la resistencia a la terapia endocrina. El objetivo general es evaluar los mecanismos que llevan a la aneuploidía y CIN, y su participación en la respuesta y la resistencia a la terapia con antiprogéstágenos en el modelo de cáncer de mama por MPA. El primer objetivo es determinar el nivel de ploidía y evaluar la inestabilidad en el cariotipo de carcinomas mamarios por la técnica de citometría de flujo. Luego, se plantea estudiar en los tumores mamarios la presencia de anomalías en los centrosomas, y analizar la expresión de proteínas relacionadas con el control de la división celular y la duplicación de los centrosomas: ciclina A y PLK<sub>4</sub>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales:** se utilizaron ratones hembras BALB/c vírgenes de dos meses de edad. Los animales fueron manipulados según las normas internacionales.

**Tumores:** se usaron carcinomas mamarios murinos inducidos por MPA y mantenidos por trasplantes singeneicos [9]. La familia tumoral C<sub>4</sub> incluye tres variantes sensibles al tratamiento con MFP, la variante C<sub>4</sub>-HD, la C<sub>4</sub>-3-HI, y la C<sub>4</sub>-HI. Los tumores C<sub>4</sub>-HIR presentan resistencia adquirida al tratamiento, mientras que los tumores C<sub>4</sub>-2-HI resistencia constitutiva. En la familia C<sub>7</sub>, la variante tumoral C<sub>7</sub>-2-HI regresa con la administración de MFP, mientras que los tumores C<sub>7</sub>-HI y C<sub>7</sub>-2-HIR, son resistentes constitutivos y adquiridos respectivamente. En la tercera familia tumoral, las variantes 59-HD y 59-2-HI son sensibles al tratamiento endocrino. La variante 59-2-HIR es resistente adquirido, mientras que la variante tumoral 59-HI es resistente constitutivo.

**Cultivo primario:** técnica utilizada de rutina en el laboratorio [3].

**Western blot (WB):** primero se prepararon extractos proteicos totales según como ha sido descrito [5] y las fracciones nucleares y citosólicas [16], luego se continuó como ha sido descrito esta técnica [5]. Se utilizó gel concentrador 8% y gel separador 10%. Los anticuerpos primarios de Santa Cruz Biotech se diluyeron, como se describe, y el anticuerpo de Abcam en BSA 5% (Albúmina sérica bovina en TBST 0,1%). Las placas fueron escaneadas utilizando un escáner digital, y las bandas se cuantificaron utilizando el programa *ImageJ*.

**Inmunohistoquímica (IHQ) e Inmunofluorescencia (IF):** ambas técnicas son utilizadas de rutina en el laboratorio y han sido descritas [16]. En la IHQ se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en etanol 70% y la recaptura de antígenos se realizó con una solución de citrato 10 mM pH 6 en baño térmico a 90°C durante 50 minutos, previo bloqueo con BSA 2,5% en PBS. En las IF las células se fijaron en formalina 10% (células de cultivos primarios de los tumores sembradas en vidrios redondos, en placas de 24 hoyos) o metanol 100% (improntas y cortes de crióstato de tumores). Seguido por permeabilización con Tritón 0,25% en PBS 1x y bloqueo con SFB 5% (cultivos primarios) o con BSA 2,5% (improntas y cortes de crióstato) en PBS 1X. Se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución de permeabilización y en solución de bloqueo (1:1). Con los fibroblastos en cultivo se realizó una IF doble; se utilizaron dos anticuerpos primarios incubados por separado y dos anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos diferentes incubados en conjunto, y se utilizó DAPI para teñir los núcleos.

**Citometría de flujo:** similar a los cultivos primarios, se realizó la extirpación en esterilidad de los tumores, seguida por disgregación mecánica. Esta suspensión celular se pasó por un *mesh*, filtro de malla metálica, seguido por digestión enzimática. A continuación se realizó una decantación y el *pellet* resultante se resuspendió en medio de lavado y se recuperó todo excepto los 5 ml inferiores. Luego de centrifugar, al *pellet* se lo trató con solución de lisis y luego con tripsina/EDTA. Se resuspendió con medio de cultivo 10% SFB y se distribuyó en microtubos de 1,5 ml. Éstos se centrifugaron y se lavaron los *pellet* con PBS 1X frío, se fijaron con etanol 70° frío, seguido de un *vortex* y se conservaron a -20°C. Un día antes de pasar las células por el citómetro, éstas se marcaron con Ioduro de propidio (IP), dejándose ON a 4°C. Al momento de pasarlas por el citómetro, se resuspendieron las células en 200µl de PBS 1X frío. Las células fueron examinadas con el citómetro de flujo BD FACSCANTO II, y los resultados fueron analizados con el programa FlowJo 10.0.7.

**Anticuerpos utilizados:** ciclina A (C-19) (SC-596) en dilución 1:1000 (WB) y 1:200 (IHQ),  $\gamma$ -tubulina (h-183) (SC-10732) en dilución 1:100 (IF), ERK1 (K23) (SC-94) en dilución 1:1000 (WB), y HDAC1 (H-51) (SC-7872) en dilución 1:500 (WB), de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA). PLK4 (71394) en dilución 1:1000 (WB) y 1:100 (IF) y  $\gamma$ -tubulina (Ab4) en dilución 1:100 (IF) de Abcam (Cambridge, MA) y NeoMarkers, respectivamente.

**Análisis estadístico:** cada ensayo se repitió al menos por triplicado. Las diferencias entre medias se analizaron por test ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, post test de Dunn's con el programa *GraphPad Prism* (versión 5.0 para Windows, *GraphPad Software Inc.*). En las figuras se muestra un experimento representativo.

## RESULTADOS PRELIMINARES

### 1. Determinación del nivel de ploidía y evaluación de la inestabilidad del cariotipo de los tumores de la familia C<sub>4</sub> por citometría.

Resultados previos<sup>3</sup> mostraron que el tumor C<sub>4</sub>-HD presentó un número cromosómico diploide, con un número modal de 39 y un rango de 36 a 41 cromosomas. La mayoría de las variantes HI resultaron aneuploides con una amplia distribución del número de cromosomas, en el rango de 50 a 90. Por el contrario, el tumor CC<sub>4</sub>-3-HI presentó un cariotipo similar al tumor HD. Teniendo en cuenta estos resultados, las variantes HI aneuploides presentarían una mayor CIN. Se esperaba corroborar estos datos previos de citogenética clásica por citometría de flujo, previa puesta a punto de esta última técnica.

Debido a dificultades técnicas no se pudo determinar el nivel de ploidía por citometría de flujo, ya que es necesario tener un control interno diploide, para así relativizar los valores de fluorescencia de las células tumorales a las células diploides normales. Para evaluar la inestabilidad del cariotipo se optó



por analizar únicamente el grado de dispersión de los valores en fase G<sub>1</sub> (medido por el porcentaje del coeficiente de variación, %CV) de cada uno de los tumores. Se realizó una modificación a la técnica de cultivo primario que se describe en detalle en la sección de materiales y métodos. La desventaja de esta metodología es que al disgregar el tumor con el *mesh*, la suspensión celular resultante contiene, además de las células epiteliales tumorales, otros componentes celulares como por ejemplo fibroblastos estromales, si bien se realizan varias decantaciones para enriquecer la población de células epiteliales. Sin embargo, este método resultó ser más rápido y según los resultados obtenidos, las células se encontraron en buenas condiciones y en cantidad suficiente para ser analizadas por citometría de flujo.

En la **figura 1** se muestran los gráficos representativos del ciclo celular de los tumores de la familia C<sub>4</sub> generados por citometría y se observa que el CV de G<sub>1</sub> es significativamente mayor en el tumor C<sub>4</sub>-HIR con respecto a los tumores C<sub>4</sub>-HI ( $p < 0,01$ ) y C<sub>4</sub>-2-HI ( $p < 0,05$ ). Los datos de citometría muestran que los CV de los tumores aneuploides C<sub>4</sub>-2-HI y C<sub>4</sub>-HI no difieren significativamente de los obtenidos para los tumores diploides, los cuales serían menos inestables según el histograma del número de cromosomas obtenido por citogenética clásica.

## **2. Estudio de los centrosomas en los tumores de la familia C<sub>4</sub>.**

Con el objetivo de determinar la presencia de anomalías en el número de centrosomas, se realizaron IF para detectar  $\gamma$ -tubulina, uno de los componentes del centrosoma. Se esperaba que las variantes HI aneuploides presenten una amplificación del número de centrosomas comparado con los tumores diploides. Se emplearon algunas variantes de la técnica estándar de IF, con el fin de poner a punto la misma para la detección de centrosomas.

### **2.1. IF en cultivos primarios de los tumores de la familia C<sub>4</sub>.**

Se usaron células epiteliales de dichos cultivos y también fibroblastos en cultivo (control diploide) en los cuales se realizó una IF doble, con  $\gamma$ -tubulina para detectar centrosomas y con  $\gamma$ -tubulina para marcar el citoesqueleto, así por morfología diferenciarlos de las células epiteliales. Gracias a esta metodología fue posible atribuir la cantidad de centrosomas a cada una de las células, registrándose los datos en la **tabla 1**, expresados en porcentaje (%).

El tumor C<sub>4</sub>-HIR presentó mayor porcentaje de células con tres y cuatro centrosomas (10% y 1%, respectivamente), y además fue el único tumor que mostró células con cinco centrosomas, (1% del total). Por otro lado, los tumores diploides C<sub>4</sub>-HD y CC<sub>4</sub>-3-HI mostraron un bajo porcentaje de células con tres centrosomas (2% y 1%, respectivamente). El cultivo del tumor C<sub>4</sub>-2-HI presentó células pleomórficas, núcleos dañados, y citoplasma con tinción granulosa, características que dificultaron la atribución de la cantidad de centrosomas por célula, razón por lo cual no fue considerado en el análisis.

### **2.2. IF en improntas de los tumores de la familia C<sub>4</sub>.**

Se aplicó esta variante de IF debido a que los resultados obtenidos por la metodología anterior no fueron satisfactorios para todos los tumores. Esta técnica tiene como desventaja la pérdida de la arquitectura tisular, pero se obtiene una mayor cantidad de células por campo. Con esta técnica no fue posible obtener el control diploide, ya que a pesar de experimentar con diferentes fijadores, no se ha obtenido un buen resultado; el tejido adiposo de la mama dificulta la detección de  $\gamma$ -tubulina porque contribuye a aumentar la marcación inespecífica de fondo. La cuantificación se realizó considerando el número total de centrosomas sobre el total de núcleos. El tumor C<sub>4</sub>-HI presentó mayor número de centrosomas por núcleo (1,25) comparado con el tumor C<sub>4</sub>-HD (1,08), y las otras variantes HI ( $p < 0,001$ ).

### **2.3. IF en cortes de crióstato de los tumores de la familia C<sub>4</sub>**

En la **figura 2** se puede observar la marcación para  $\gamma$ -tubulina en los tumores estudiados con esta metodología, la cual permite estudiar a los centrosomas dentro del contexto del tejido. Además fue posible obtener cortes de crióstato de glándula mamaria de ratón hembra virgen, utilizada como control diploide normal. La cuantificación se realizó considerando el total de centrosomas sobre el total de núcleos. Se observó un aumento significativo en el número de centrosomas del tumor aneuploide C<sub>4</sub>-HIR respecto al control ( $p < 0,01$ ).

### **3. Análisis de la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular y duplicación de los centrosomas**

Puesto que se ha reportado una asociación entre aumento de expresión de proteínas del ciclo celular con CIN, se esperaba observar una sobreexpresión de ciclina A en las variantes HI que presentan un cariotipo aneuploide inestable. Esta proteína se asocia con Cdk2 durante la fase S del ciclo celular y con Cdk1 para entrar en mitosis. Del mismo modo, se esperaba también observar una desregulación en la expresión de la proteína PLK4, involucrada en la duplicación de los centrosomas, ya que participa en la síntesis de los nuevos centriolos que formarán los polos del huso mitótico.

#### **3.1. Análisis de la expresión de ciclina A**

**3.1.1. Estudio por WB** Se llevó a cabo a partir de extractos proteicos totales, y de las fracciones nucleares y citosólicas de los tumores de la familia C4. Se observó que todos los tumores expresan dos formas de distinto peso molecular (**figura 3**), siendo significativamente ( $p < 0,05$ ) más intensa la banda de peso estimado de 52 kDa en el tumor resistente constitutivo C4-2-HI, y la banda de peso estimado de 48 kDa en el tumor resistente adquirido C4-HIR. Los extractos de útero analizados, como control de tejido normal proliferante, también mostró dos bandas, una a la altura de 48 kDa. Este resultado refuerza la observación de que dicha banda sería específica de ciclina A.

Según bibliografía, la localización de la ciclina A es nuclear, sin embargo la misma se detectó tanto en extractos nucleares como citosólicos. Se testeó la calidad de los mismos por WB utilizando un anticuerpo contra la histona desacetilasa 1 (HDAC1), la cual tiene localización exclusivamente nuclear. Los resultados reflejan que la expresión de la misma es aproximadamente 8 veces mayor en la fracción nuclear, en relación a la citosólica.

A continuación, con el objetivo de establecer una posible asociación entre aumento de expresión de ciclina A con resistencia a la terapia endocrina, observado en los tumores de la familia C4, se analizó por WB la expresión de ciclina A en extractos proteicos totales de tumores pertenecientes a otras dos familias del modelo. En los WB representativos de los tumores de la familia C7 y 59 (**figura 4**), se observan dos bandas para ciclina A, con el mismo peso molecular estimado que las identificadas para los tumores de la familia C4. Las bandas de 52 y 48 kDa están significativamente ( $p < 0,05$ ) más expresadas en el tumor resistente adquirido C7-2-HIR. Además, se observó una tendencia de mayor expresión de la forma de 48 kDa en el tumor C7-HI, resistente constitutivo. En la familia 59 se observó que la banda de 52 kDa es significativamente más intensa ( $p < 0,01$ ) en el tumor respondedor 59-2-HI, y no hay diferencias significativas en la expresión de la forma de 48 kDa entre los miembros de esta familia tumoral. Por otro lado, en algunos de los tumores de la familia C7 y 59 se observaron formas de menor peso molecular, por debajo de los 48 kDa, que podrían ser formas truncadas de ciclina A.

**3.1.2. Estudio por IHQ** La expresión de ciclina A para los tumores C4 y C7 pueden observarse en la **figura 5** y para los tumores 59 en la **figura 6**. El recuento de los núcleos positivos para ciclina A, en cada uno de los tumores, en glándula mamaria de ratón hembra virgen (control normal) y en glándula mamaria de ratón hembra preñada (control normal proliferante) se resumen en la **tabla 2**.

En la familia C4, los tumores C4-HIR ( $p < 0,0001$ ), C4-2-HI ( $p < 0,001$ ) y CC4-3-HI ( $p < 0,01$ ) presentaron significativamente mayor porcentaje de células positivas para ciclina A, respecto a la glándula mamaria de ratón hembra virgen. Además entre los tumores, el C4-HIR mostró diferencias significativas en relación a los tumores C4-HD ( $p < 0,0001$ ) y C4-HI ( $p < 0,001$ ). En la familia C7, la variante tumoral C7-HI presentó significativamente ( $p < 0,0001$ ) mayor porcentaje de células positivas para ciclina A, respecto al control normal, y también en relación a los tumores C7-2-HI y C7-2-HIR, ambos con  $p < 0,05$ . En la familia 59 únicamente se observaron diferencias significativas al comparar los tumores con la glándula mamaria de ratón virgen; el tumor 59-HD presentó mayor porcentaje de células positivas para ciclina A ( $p < 0,0001$ ), seguido por el 59-HI ( $p < 0,01$ ) y luego por el 59-2-HI ( $p < 0,05$ ).

En la familia C4 y C7, los resultados de IHQ fueron consistentes con lo observado por WB, es decir que las variantes resistentes expresaron mayor Ciclina A. Sin embargo, en la familia 59, los resultados obtenidos por ambas técnicas no apoyarían esta observación.

#### **3.2. Análisis de la expresión de PLK4.**

Se detectó una banda específica de 90 kDa correspondiente a esta proteína en los extractos proteicos totales, y en las fracciones nucleares y citosólicas de los tumores de la familia C4. No se han

observado diferencias significativas entre los distintos tumores en ninguna de las fracciones analizadas, sin embargo, habría una tendencia de mayor expresión en la fracción citosólica para el tumor C<sub>4</sub>-HIR. Según la bibliografía, la localización de PLK<sub>4</sub> es citoplasmática, razón por la cual también se estudió la expresión de PLK<sub>4</sub> mediante IF en cortes de crióstato de tumores C<sub>4</sub> y en glándula mamaria normal. Se observó que la marcación para PLK<sub>4</sub> es exclusivamente citoplasmática, pero con una distribución heterogénea.

## DISCUSIÓN

Mediante la técnica de citometría de flujo y según el análisis de la dispersión de los valores en G<sub>1</sub>, medido por el %CV, el tumor resistente adquirido C<sub>4</sub>-HIR muestra una mayor inestabilidad. Contrario a los datos citogenéticos previos, el tumor aneuploide resistente constitutivo C<sub>4</sub>-2-HI no presenta una mayor dispersión en G<sub>1</sub>, y su %CV es similar al observado en los tumores diploides. Las diferencias observadas con ambas técnicas, podrían deberse en parte al modo de procesamiento de la muestra. El conteo de cromosomas se realizó en células en cultivo arrestadas en metafase; mientras que para citometría se utilizaron células disgregadas del tumor entero. Si bien se enriqueció la suspensión celular con la fracción epitelial, pueden haber quedado fibroblastos estromales, con cariotipo diploide, que hayan interferido. Además, la cantidad de células analizadas por citometría es mucho mayor que por citogenética, en la cual solo se analiza una subpoblación del tumor.

La CIN está asociada con la amplificación de los centrosomas en células tumorales de varios tipos de cáncer, como el cáncer de colon, páncreas, vejiga, próstata y mama<sup>11</sup>, y con frecuencia este fenómeno se asocia con diversos índices de agresividad del tumor. Tres medidas analíticas, útiles para evaluar la amplificación de centrosomas en tumores, incluyen el tamaño y número de los centrosomas, las cuales son medidas estructurales, y la capacidad de nucleación de los microtúbulos, que es una medida de su función. Las anomalías estructurales son analizadas más frecuentemente por inmunoscopia en células o tejidos, usando anticuerpos contra proteínas del centrosoma: centrina, pericentrina o  $\gamma$ -tubulina<sup>10</sup>.

Las células epiteliales normales de mama tienen entre uno y dos centrosomas, localizados en la región apical de la célula y orientados hacia el lumen del ducto. Por el contrario, las células epiteliales de carcinomas mamarios humanos presentaron mayor cantidad de centrosomas (entre 2 y 12), de mayor volumen, y ubicados en forma caótica en el citoplasma<sup>11,10</sup>.

Es escasa la bibliografía sobre el estudio de centrosomas en modelos animales, y en particular de cáncer de mama. En nuestro modelo de carcinomas mamarios murinos inducidos por MPA se observa un aumento significativo del número de centrosomas en los cortes de crióstato del tumor aneuploide C<sub>4</sub>-HIR respecto al control normal diploide. Mientras que usando improntas de los mismos, solamente el tumor aneuploide C<sub>4</sub>-HI presenta diferencias significativas en el número de centrosomas comparado con los demás tumores. Sin embargo, independientemente de la técnica empleada, los tumores presentan en promedio entre 0,8 y 1,25 centrosomas por núcleo y estos valores observados se encuentran en el rango de valores para células epiteliales de mama normal, informado en la literatura (1,55 centrosomas/núcleo)<sup>11</sup>. Una explicación posible por la cual se esté subestimando el resultado puede ser porque en la cuantificación se consideró el total de células por campo, tanto aquellas positivas como negativas para  $\gamma$ -tubulina.

Las IF en células de cultivo primario mostraron que tanto los tumores diploides como los aneuploides presentaron células con tres centrosomas, si bien el porcentaje fue mayor en aquellos tumores aneuploides (~9%-10%). Solo el tumor resistente C<sub>4</sub>-HIR presenta células con cinco centrosomas. Si bien estos porcentajes son bajos, se condice con la bibliografía, ya que las líneas celulares establecidas de tumores presentaron células con centrosomas supernumerarios en niveles comparativamente bajos, que asciende sólo a una pequeña proporción de la población total de células (~1-15%)<sup>12</sup>.

En los tumores HI aneuploides del modelo se han observado mitosis tripolares y tetrapolares, lo cual refleja la presencia de husos multipolares. A menudo, esto último se debe al exceso de centrosomas aunque cuerpos acentriolares también pueden ocasionalmente actuar como polos del huso. Estos cuerpos pueden surgir a través de la sobreexpresión de componentes de la PCM, o a través de la fragmentación del centrosoma. Por lo tanto, y como lo advierte Nigg et al., (2002) en su trabajo, se debe tener precaución al interpretar los datos que se basan exclusivamente en el uso de anticuerpos contra componentes de la PCM; la evidencia definitiva para la amplificación de los centrosomas requiere entonces la visualización de centriolos<sup>12</sup>.

Por todo lo mencionado anteriormente, se debería realizar IF utilizando centrina, proteína que detecta centriolos. Por lo tanto podríamos conocer si aquellos carcinomas mamarios del modelo con

cariotipo aneuploide presentan un mayor número de centriolos por centrosoma. Este es el caso observado por Lingle W. y Salisbury W.L., (1999) quienes ven varios *spots* con centrina, sin el aumento de PCM por microscopía electrónica en muestras de cáncer de mama humano. Además, se debería analizar el estado de fosforilación de proteínas centriolares, como fosfo centrina, porque puede ocurrir que los tumores mamarios del modelo presenten desregulación de dichas proteínas que afecten la función normal de los centrosomas sin que ocurra un aumento en número<sup>11</sup>. Por otro lado, los tumores HI aneuploides de la familia C<sub>4</sub> podrían tener los centrosomas agrupados en *clusters*, evidencia de ello podría ser el mayor tamaño observado comparado con el tejido normal. Pudo haber ocurrido que estos tumores hayan tenido una amplificación temprana de los centrosomas que llevó a la aneuploidía, y que posteriormente estos centrosomas se agruparon. Para confirmar esta hipótesis, deberíamos analizar la funcionalidad de los centrosomas y comprobar que los mismos presentan una mayor capacidad de nucleación de microtúbulos.

La CIN está relacionada con la desregulación de proteínas involucradas en el control del ciclo celular, como son los complejos ciclina/Cdk. Por este motivo, se analizó la expresión de ciclina A en los tumores. El estudio por WB mostró dos bandas de ciclina A, una de 52 kDa y otra de 48 kDa. El anticuerpo utilizado para identificar esta proteína mapea el epítipo contra el extremo C-terminal de la ciclina A de origen murino, con peso estimado de 54 kDa. Sin embargo, en lisados de células de diferentes líneas identifican dos isoformas para ciclina A, entre 54 y 43 kDa. En la bibliografía se reportaron diferencias en isoformas y peso molecular de ciclina A, aunque la mayoría aluden a formas truncadas de la proteína. Subgrupos específicos en distintos tipos de cáncer expresan formas truncadas de ciclinas; éstas por lo general pierden secuencias reguladoras que modula su estabilidad, localización subcelular y actividad quinasa asociada a Cdk<sup>15</sup>.

La expresión de ciclina A también se estudió mediante IHQ, obteniéndose resultados similares por ambas técnicas. La ciclina A se detectó esencialmente en los núcleos de las células, aunque algunos tumores mostraron además marcación citoplasmática (por ejemplo el C<sub>4</sub>-HIR). Se ha demostrado que las ciclinas A y E unidas a Cdk2 son continuamente transportadas entre el núcleo y el citoplasma. Sin embargo, en contraste con ciclina B<sub>1</sub>/Cdk1, ambas ciclinas se exportan más lentamente de lo que se importan, razón por la cual estas ciclinas parecen ser exclusivamente nuclear, aunque pueden regular eventos en ambos compartimientos celulares<sup>6</sup>.

Los resultados obtenidos con ambas técnicas para la familia tumoral C<sub>4</sub> y C<sub>7</sub> sugieren que un aumento en la expresión de ciclina A podría estar asociado con la resistencia a la terapia endocrina en este modelo. Para corroborar esta asociación, se deberían evaluar otras familias tumorales del mismo modelo murino<sup>3</sup>. Además, se podría estudiar la expresión de ciclina A en muestras de tumores mamarios humanos, ya que efectivamente se detectó un incremento en la expresión de ciclina A en muchos tipos de cánceres y se correlacionaron con factores clínicos. Asimismo, altos niveles de ciclina A están asociados con un peor pronóstico en cáncer de mama. Los trabajos de Klintman et al., (2013) proponen el uso de ciclina A, combinado con otras proteínas de proliferación como Ki67, ciclina B o fosfohistona H<sub>3</sub>, como factor pronóstico en cáncer de mama<sup>7</sup>.

Por último, es necesario destacar que se debe tener cautela al interpretar los resultados del estudio de una proteína del ciclo celular, ya que no es fácil determinar si el aumento de ciclina A es un factor que contribuye a la tumorigénesis o es una mera consecuencia de la proliferación celular. Es por ello que nos proponemos analizar en principio su nivel de expresión en los tumores, cultivos primarios y líneas celulares, para luego indagar sobre los mecanismos causales de las diferencias observadas. Con el objetivo de comprobar la asociación observada entre la expresión de ciclina A y resistencia a la terapia endocrina se podría estudiar el efecto de la inhibición o sobreexpresión de ciclina A en cultivos de los tumores mamarios, como así también en las líneas celulares de cáncer de mama.

La CIN también está asociada con la desregulación de las proteínas involucradas directamente con la duplicación de los centrosomas. Por dicho motivo, se estudió la expresión de la proteína PLK<sub>4</sub> en los tumores de la familia C<sub>4</sub> por WB, sin embargo los resultados obtenidos no arrojaron diferencias significativas en su expresión. La PLK<sub>4</sub> es un regulador clave en la biogénesis de los centriolos, y su sobreexpresión anula el mecanismo que normalmente limita la replicación de los mismos, resultando en múltiples centriolos. Por otro lado, sus bajos niveles evitan la duplicación del centriolo, causando defectos mitóticos. Teniendo en cuenta el resultado obtenido para los centrosomas, es de esperar entonces que los niveles de PLK<sub>4</sub> no varíen. De todos modos, se deberían estudiar los centriolos para determinar efectivamente el efecto de los niveles de PLK<sub>4</sub>.

Es conocido que la localización de PLK4 es citoplasmática, ya que se encuentra en los centriolos que residen en los centrosomas. Mediante WB se detectó esta proteína en todas las fracciones analizadas, sin embargo, la IF contra PLK4 en cortes de crióstato de glándula mamaria y de los tumores, muestra localización exclusivamente citoplasmática y con una distribución heterogénea. Este patrón podría corresponder con las áreas de localización de los centrosomas, pero para confirmar esta observación se debería evaluar si PLK4 colocaliza con alguno de los componentes del centrosoma. Además, se podrían estudiar otros miembros de la familia PLKs, como PLK1 y PLK2. Esta última estaría relacionada más directamente con PLK4 debido a que ambas regulan la duplicación de los centriolos, mientras que la PLK1 participa en otros procesos del ciclo celular además de separación y maduración de los centrosomas<sup>2</sup>.

## **CONCLUSIONES**

Con los datos obtenidos por citometría se podría asociar la resistencia a la terapia endocrina con inestabilidad del cariotipo para uno de los tumores resistentes, el C4-HIR. Esto sugiere que la progresión tumoral estaría acompañada por un aumento en la CIN.

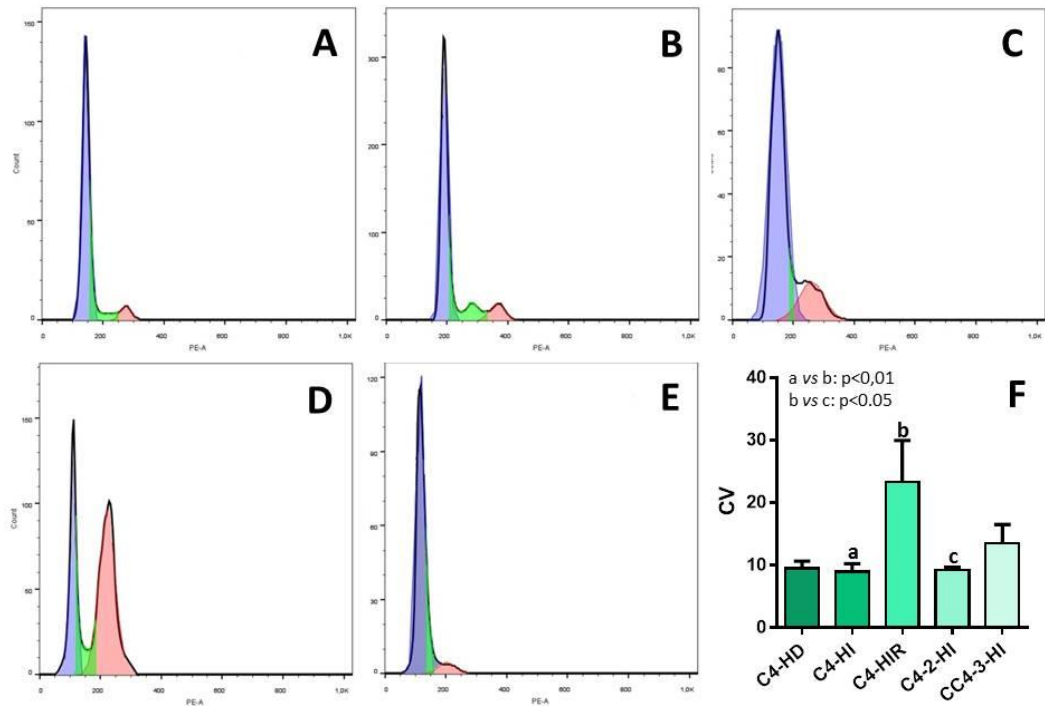
Este fenómeno puede ser causado por errores en la segregación de los cromosomas durante la mitosis, como consecuencia de anomalías en la duplicación de los centrosomas. Las técnicas empleadas para determinar el número de centrosomas en los tumores no permitieron confirmar fehacientemente pero tampoco descartar la hipótesis de que la aneuploidía observada en la mayoría de los carcinomas mamarios HI podría deberse a una amplificación de los centrosomas.

Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos, la sobreexpresión de ciclina A podría estar asociada con la resistencia a la terapia endocrina en dos familias tumorales del modelo murino de cáncer de mama inducido por MPA.

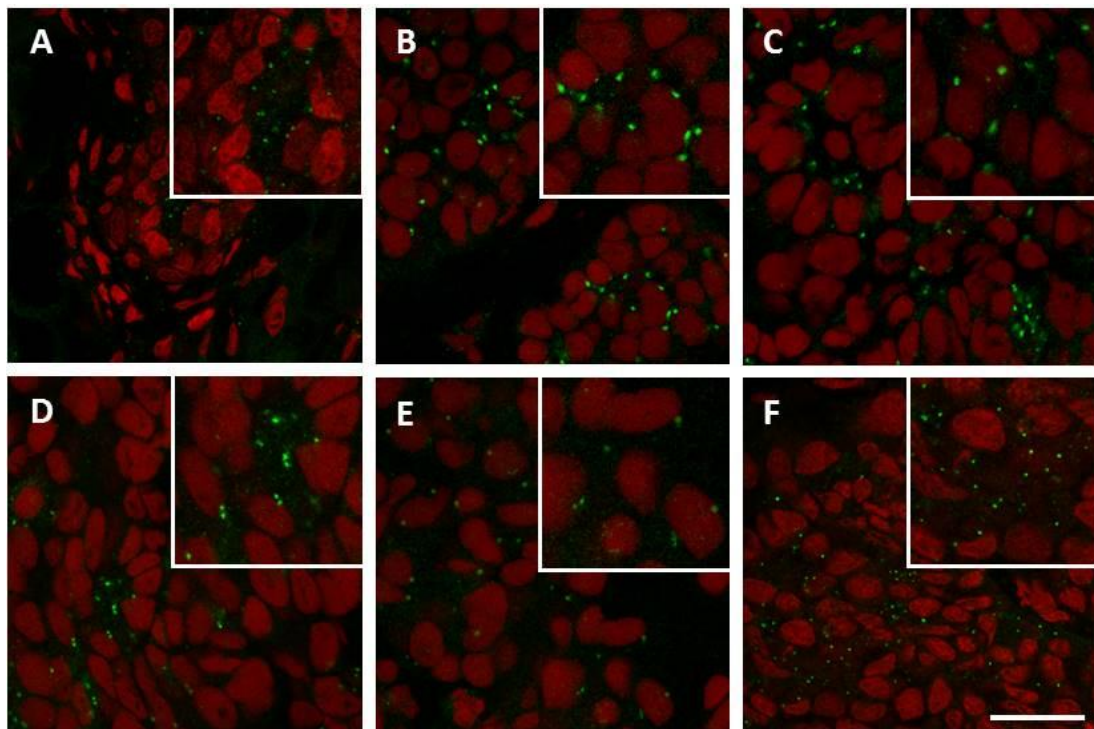
## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bakhoun SF, Compton DA. Science in medicine Chromosomal instability and cancer : a complex relationship with therapeutic potential. *J Clin Invest* 2012; 122:1138–1143.
2. de Cárcer G, Manning G, Malumbres M. From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle* 2011; 10:2255-2262.
3. Fabris VT, Benavides F, Conti C, Merani S, Lanari C. Cytogenetic findings, Trp53 mutations, and hormone responsiveness in a medroxyprogesterone acetate induced murine breast cancer model. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 161:130–139.
4. Fridlyand J, Snijders AM, Ylstra B, Li H, Olshen A, Seagraves R et al. Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 2006; 6:96-109.
5. Helguero LA, Viegas M, Asaithamby A, Shyamala G, Lanari C, Molinolo AA. Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79:379-390.
6. Jackman M, Kubota Y, den Elzen N, Hagting A, Pines J. Cyclin A- and Cyclin E-Cdk Complexes Shuttle between the Nucleus and the Cytoplasm. *Mol Biol Cell* 2002; 13:1030-1045.
7. Klintman M, Strand C, Ahlin C, Beglerbegovic S, Fjällskog ML, Grabau D, et al. The prognostic value of mitotic activity index (MAI), phosphohistone H<sub>3</sub> (PPH<sub>3</sub>), cyclin B1, cyclin A, and Ki67, alone and in combinations, in node-negative premenopausal breast cancer. *PLoS One* 2013; 12:1–12.
8. Kronenwett U, Huwendiek S, Ostring C, Portwood N, Roblick UJ, Pawitan Y, et al. Improved grading of breast adenocarcinomas based on genomic instability. *Cancer Res* 2004; 64:904–909.
9. Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MC, et al. The MPA mouse breast cancer model : evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009;16:333–350.
10. Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D'Assoro AB, Boeneman K, Liu W, et al. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 4:1978–1983.
11. Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:2950–2955.
12. Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?. *Nat Rev Cancer* 2002; 10:815–825.
13. Salisbury JL, D'Assoro AB, Lingle WL. Centrosome amplification and the origin of chromosomal instability in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 3:275–283.
14. Thompson SL, Bakhoun SF, Compton DA. Mechanisms of Chromosomal Instability. *Curr Biol* 2013; 20:285–295.
15. Van Dross R, Browning PJ, Pelling JC. Do truncated cyclins contribute to aberrant cyclin expression in cancer? *Cell Cycle* 2006; 5:472-477.
16. Wargon V. Resistencia constitutiva y adquirida al tratamiento hormonal de carcinomas mamarios murinos (tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires; 2010.

ANEXO



**Figura 1.** Gráficos representativos del ciclo celular de los tumores de la familia C4 generados a partir del análisis de citometría de flujo. **A** | Tumor C4-HD, **B** | Tumor C4-HI, **C** | Tumor C4-HIR, **D** | Tumor C4-2-HI y **E** | Tumor CC4-3-HI. Referencias: azul, corresponde a células en fase G1, verde en fase S y rojo en fase G2. **F** | Gráfico que representa los CV de los valores de fase G1.

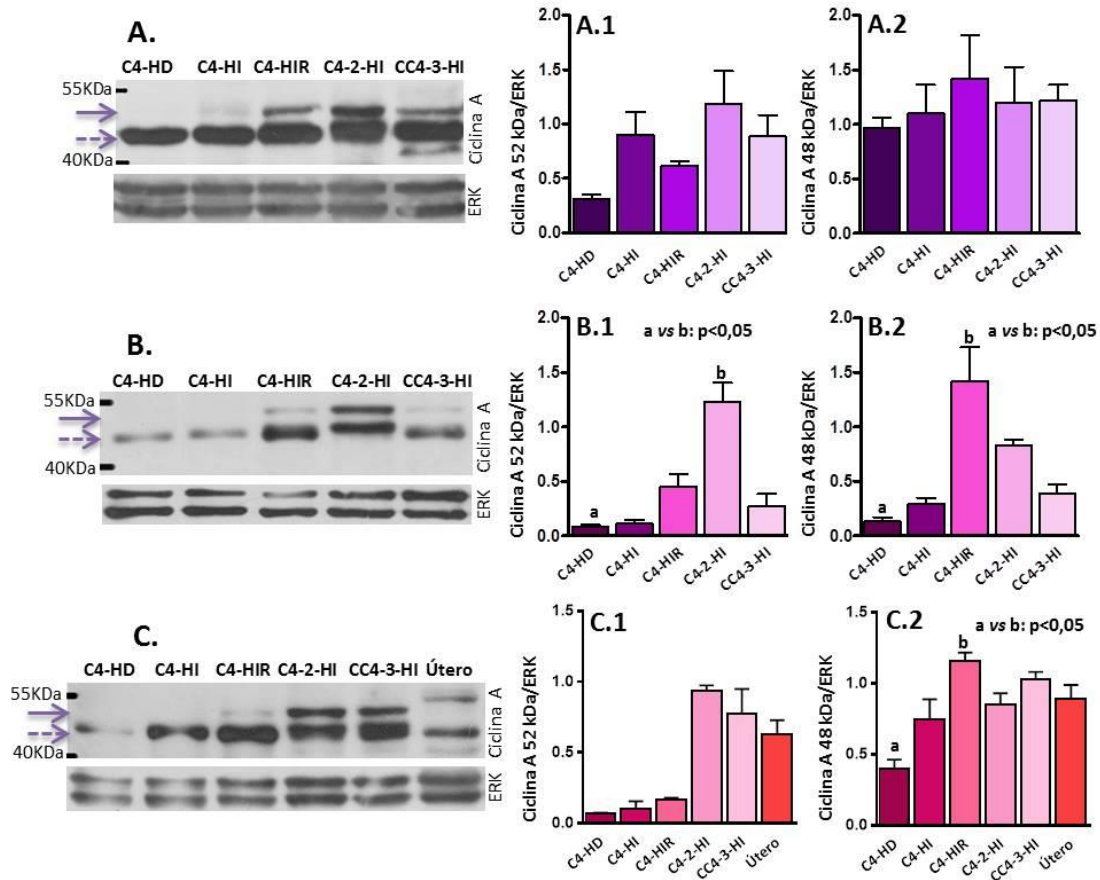


**Figura 2.** IF en cortes de crióstato. **A** | Glándula mamaria de ratón hembra virgen, **B** | Tumor C4-HD, **C** | Tumor C4-HI, **D** | Tumor C4-HIR, **E** | Tumor C4-2-HI, **F** | Tumor CC4-3-HI. En verde  $\gamma$ -tubulina (puntos verdes que representan los centrosomas) y en rojo los núcleos teñidos con IP. Aumento: 600X, barra: 18  $\mu$ m.

**Tabla 1.** Cantidad de centrosomas por célula en los tumores de la familia C<sub>4</sub> y en fibroblastos.

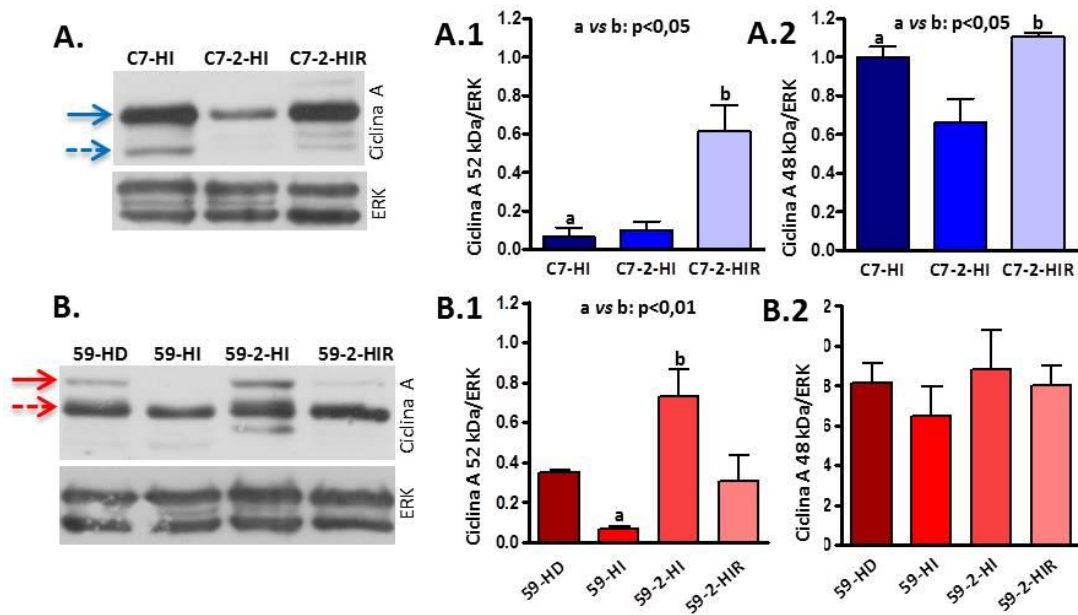
	Células con 1 centrosoma (%)	Células con 2 centrosomas (%)	Células con 3 centrosomas (%)	Células con 4 centrosomas (%)	Células con 5 centrosomas (%)
Fibroblastos	44	56	0	0	0
C <sub>4</sub> -HD	66	25	2	0	0
C <sub>4</sub> -HI	54	35	9	2	0
C <sub>4</sub> -HIR	43	36	10	1	1
CC <sub>4</sub> -3-HI	58	41	1	0	0

\* (%): Se contó el número de centrosomas por célula en 5 campos de las IF para  $\gamma$ -tubulina y se expresó el resultado en porcentaje.

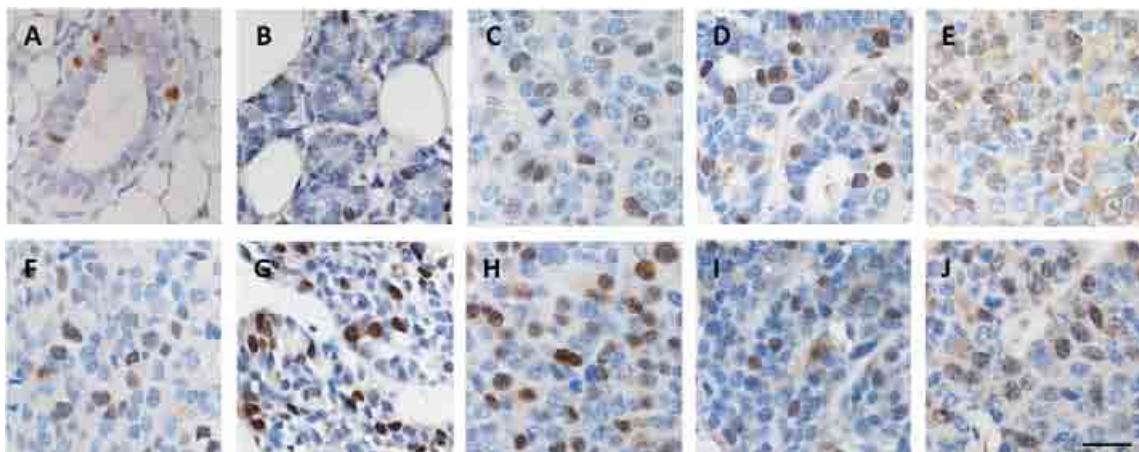


**Figura 3.** Análisis de la expresión de ciclina A. WB representativo de **A** | extractos proteicos totales, **B** | fracción nuclear y **C** | fracción citosólica de los tumores de la familia C<sub>4</sub>. **1** | Gráfico que representa la intensidad relativa de la banda ubicada a 52 kDa (flecha continua). **2** | Gráfico que representa la intensidad relativa de la banda ubicada a 48 kDa (flecha puntuada). Se utilizó como control de carga la proteína ERK total.

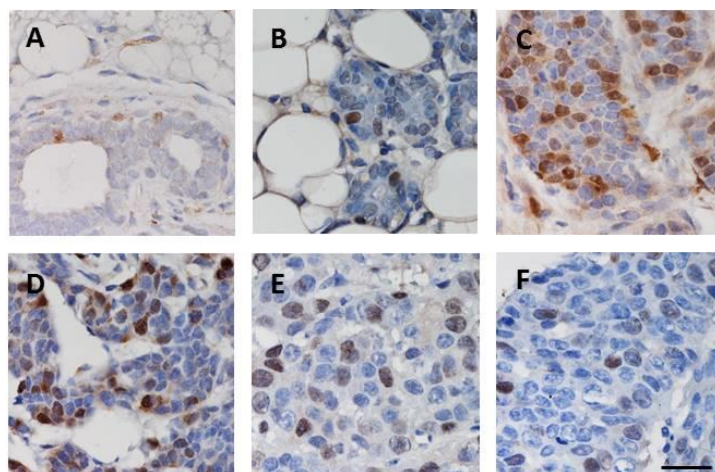




**Figura 4.** Análisis de la expresión de ciclina A. WB representativo de los extractos proteicos totales de los tumores **A** | Familia C7 y **B** | Familia 59. **1** | Gráfico que representa la intensidad relativa de la banda ubicada a 52 kDa (flecha continua). **2** | Gráfico que representa la intensidad relativa de la banda ubicada a 48 kDa (flecha puntuada). Se utilizó como control de carga la proteína ERK total.



**Figura 5.** IHO para ciclina A en cortes de parafina de los tumores de la familia C4 y C7. **A**) Glándula mamaria de ratón hembra virgen, **B**) Glándula mamaria de ratón hembra preñada, **C**) Tumor C4-HD, **D**) Tumor C4-HI, **E**) Tumor C4-HIR, **F**) Tumor C4-2-HI, **G**) Tumor CC4-3-HI, **H**) Tumor C7-HI, **I**) Tumor C7-2-HI y **J**) Tumor C7-2-HIR. Aumento: 600X, barra: 18 $\mu$ m.



**Figura 6.** IHQ para ciclina A en cortes de parafina de los tumores de la familia 59. **A)** glándula mamaria de ratón hembra virgen, **B)** glándula mamaria de ratón hembra preñada, **C)** Tumor 59-HD, **D)** Tumor 59-HI, **E)** Tumor 59-2-HI y **F)** tumor 59-2-HIR. Aumento: 600X, barra: 18 $\mu$ m.

**Tabla 2.** IHQ para ciclina A en los tumores de la familia C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub> y 59, junto con glándula mamaria de ratón hembra virgen y glándula mamaria de ratón hembra preñada.

	Mama virgen	Mama preñada	C <sub>4</sub> -HD	C <sub>4</sub> -HI	C <sub>4</sub> -HIR	C <sub>4</sub> -2-HI	CC <sub>4</sub> -3-HI
% Cels. positivas	12,17 $\pm$ 6,12	45,31 $\pm$ 3,34	23,43 $\pm$ 8,36	27,9 $\pm$ 6,44	49,97 $\pm$ 9,76	39,32 $\pm$ 5,91	38,93 $\pm$ 2,70
	C <sub>7</sub> -HI	C <sub>7</sub> -2-HI	C <sub>7</sub> -2-HIR	59-HD	59-HI	59-2-HI	59-2-HIR
% Cels. positivas	47,42 $\pm$ 5	33,05 $\pm$ 2,21	33,89 $\pm$ 4,33	36,85 $\pm$ 3,28	33,38 $\pm$ 4,44	28,9 $\pm$ 6,12	22,18 $\pm$ 2,59

\* Se contaron los núcleos marcados con ciclina A en el total de células observadas en 5 campos a 600X y se expresó el resultado como porcentaje del total de células.

# ESTUDIO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN FORKHEAD BOX (FOX) EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

**Javier Nahuel Brandani**

Depto. de Química Biológica/IQUIBICEN, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
UBA

**Director:** Javier Hernán Cotignola

## RESUMEN

Una gran cantidad de trabajos apuntan a que la desregulación de la expresión de los receptores hormonales es responsable del desarrollo y progresión del cáncer de próstata (CaP). El receptor de andrógenos (AR) y su vía de señalización es uno de los mecanismos involucrados en la progresión del CaP. Además, el receptor de glucocorticoides (GR) podría tener efectos tanto supresores tumorales como oncogénicos. Se hipotetiza que esta dualidad puede deberse, a la presencia/ausencia de un AR funcional como a la desregulación de cofactores de los receptores hormonales como los factores forkhead box (FOX). Se estudió la regulación de estos factores en las distintas situaciones en las que se encuentran las células tumorales: estrés oxidativo, presencia de andrógenos, y presencia de glucocorticoides. Se encontró que las hormonas testosterona y dexametasona reducen significativamente la expresión de la mayoría de los genes FOX estudiados. Interesantemente, en la línea celular C4-2B que expresa tanto AR como GR, la disminución de la expresión es mayor que en la línea PC3, la cual expresa solamente GR. Los resultados aquí presentados son todavía preliminares y nos encontramos realizando más experimentos para conocer mejor el rol de los factores FOX en la biología de los tumores prostáticos.

## ABSTRACT

There are several lines of evidence that consider the deregulation of hormone receptors are responsible for the development and progression of prostate cancer (PCa). The androgen receptor (AR) pathway is one of the mechanisms involved in the progression of PCa. In addition, the glucocorticoid receptor (GR) might have tumor suppressor and oncogenic activities during PCa pathogenesis. It is hypothesized that this dual function might be due to the presence/absence of a functional AR as well as the deregulation of cofactors for the hormone receptors such as the forkhead box factors (FOX). We studied the regulation of these factors in different situations to which prostate tumor cells are exposed: oxidative stress, presence of androgens, and presence of glucocorticoids. It was found that testosterone and dexamethasone significantly reduce the expression of most FOX genes studied. Interestingly, the reduction of gene expression is higher in C4-2B cells, which expresses AR and GR. The results presented here are preliminary and we are currently conducting more experiments to unveil the role of FOXs in the biology of PCa.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado en hombres y la sexta causa de muerte por cáncer a nivel mundial; sin embargo las tasas de incidencia y mortalidad varían entre países<sup>8</sup>. En nuestro país, según el proyecto GLOBOCAN 2012, la tasa estimada de incidencia del cáncer de próstata es de 44,1 por cada 100.000 habitantes, haciendo que este tipo de tumor sea el de mayor incidencia entre los hombres argentinos [18]. El mismo estudio estimó que el cáncer de próstata es la tercera causa de muerte por cáncer en los hombres argentinos con una tasa estandarizada de mortalidad del 13,04 por cada 100.000 habitantes [19].

En la clínica, el diagnóstico presuntivo del cáncer de próstata se realiza mediante la cuantificación de los niveles séricos del Antígeno Prostático Específico (PSA), cuyo aumento sostenido por sobre los valores normales ( $\geq 4$  ng/ml) sugiere la presencia de un tumor prostático. Desde que se comenzó a utilizar el PSA como biomarcador presuntivo de cáncer de próstata, se ha mejorado el diagnóstico de estos tumores, resultando en un mayor número de pacientes diagnosticados con tumores en estadios tempranos y sin

invasión a los tejidos circundantes. La remoción quirúrgica de la próstata (prostatectomía radical) y la braquiterapia (radioterapia localizada) son las principales opciones terapéuticas para estos tumores. Sin embargo, alrededor de un 15% de todos los pacientes siguen siendo diagnosticados con cáncer de próstata metastásico [4]. En las primeras etapas, el crecimiento de estos tumores es dependiente de los andrógenos testosterona y dihidrotestosterona, y se manifiesta por la regresión del tumor frente a la falta de las hormonas. Por lo tanto, la terapia está dirigida a disminuir los niveles de andrógenos mediante la castración química (hormonoterapia). No obstante, con el tiempo, el tumor se vuelve resistente a la hormonoterapia en, aproximadamente, un 20% de estos pacientes [4]. Debido a que las terapias actualmente disponibles para tratar a los pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) son sólo paliativas, los individuos con este tipo de tumores tienen un desenlace fatal. Entre las varias opciones terapéuticas para los pacientes con CRPC, está el tratamiento con glucocorticoides (GC) porque tienen un efecto inhibitorio sobre la producción de andrógenos por la glándula adrenal y porque la vía del receptor de glucocorticoides (GR) muestra actividad supresora de tumores en células derivadas de tumores prostáticos [21, 22]. Por otro lado, un trabajo reciente muestra que los sitios de unión al ADN y que un gran grupo de los genes regulados por GR se solapan significativamente con los sitios y genes regulados por el AR [17]. En base a estos resultados y los antecedentes antes mencionados, surge la duda sobre la respuesta de las células de próstata al tratamiento con GC durante la progresión de la enfermedad y si el GR es capaz de mantener activa la vía de señalización del AR en CRPC durante la hormonoterapia [3, 7, 10, 17]. La hipótesis que se plantea el campo de la oncología prostática es que el GR podría actuar como supresor tumoral u oncogén dependiendo de la presencia de un AR funcional y de los cofactores presentes en las células.

Se identificó a los factores de transcripción FOX como co-reguladores de los receptores hormonales AR y ER (receptor de estrógenos), y se reportó que el mismo factor puede tener una función de supresor tumoral u oncogén dependiendo del entorno hormonal en el que se encuentre [12]. En la próstata, se ha reportado que FOXF1 y FOXF2 tienen un rol central en la transición epitelio-mesenquimal, mientras que la expresión de FOXA1 y FOXC1 está asociada al crecimiento dependiente de andrógenos de los tumores. También se han encontrado mutaciones puntuales en FOXA1 en el cáncer de próstata que resultan en la represión de la transcripción génica dependiente del AR con la consecuente inhibición de la proliferación celular<sup>6</sup>, y la sobre-expresión de este gen fue asociada con un peor pronóstico de los pacientes con cáncer de próstata [16].

Además, se ha estado investigando a los factores FOX como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento antineoplásico. Algunas publicaciones han demostrado que los compuestos *Siomycin A* y *Thiostrepton* inhiben el crecimiento tumoral de células con activación de FOXM1 a través de la represión de la transcripción de este factor y de sus genes blancos [15, 20]. Por último, otros factores FOX que se han reportado involucrados en el cáncer de próstata son los factores FOXO. Experimentos demostraron que el AR activo se une a FOXO y bloquea su unión al ADN, suprimiendo la actividad transcripcional llevada a cabo por FOXO y su capacidad de inducir apoptosis y arresto del ciclo celular en células de cáncer de próstata [14].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Líneas celulares de cáncer de próstata y cultivos*

Se utilizaron las líneas celulares humanas C4-2B (expresa GR, AR y son insensibles al tratamiento con andrógenos) y PC3 (no expresa AR, expresa GR, y son insensibles al tratamiento con andrógenos).

Las células se cultivaron en medio RPMI1640 con 10% de suero fetal bovino (SFB) libre de hormonas por tratamiento con carbón activado. Los cultivos se expusieron al andrógeno testosterona (Testo) 10  $\mu$ M por 24 h, al glucocorticoide dexametasona (Dexa) 10<sup>-8</sup> M por 6 h, hemina 80  $\mu$ M por 24 h (inductor farmacológico de la Hemo oxigenasa-1) y agua oxigenada 100  $\mu$ M por 3 h. Los cultivos controles se realizaron en presencia de los respectivos vehículos.

Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y se hicieron al menos tres ensayos independientes.

### *RT-qPCR*

Se extrajo el ARN total de los cultivos celulares control y tratados con las drogas utilizando la técnica de TriReagent® (Genbiotech). Brevemente, luego de los tratamientos, se retiró el medio de cultivo y se agregó TriReagent® para lisar las células, se agregó cloroformo y se separaron las fases

acuosa y orgánica por centrifugación. El ARN se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua libre de RNAsas. La cuantificación se realizó por absorbancia utilizando un NanoDrop 2000 (ThermoScientific).

Se analizaron los niveles del ARNm de *FOXA1*, *FOXM1*, *FOXO1* y *FOXO3* por retrotranscripción-PCR cuantitativa (RT-qPCR) utilizando *primers* específicos para cada gen. La síntesis del ADNc se realizó a partir de 2 µg de ARN total con el kit comercial RevertAidFirstStrand (Fermentas). Una dilución 1/30 de la reacción de retrotranscripción se utilizó para la reacción de PCR en tiempo real con SYBR Green. La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó por normalización a la expresión del gen de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y el nivel de expresión se calculó utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct^{13}}$ . Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado.

### **Western-blot**

Se realizó la separación de las fracciones núcleo y citoplasma para analizar la presencia de los factores FOX en ambos compartimentos subcelulares. Luego de los tratamientos, los cultivos se pusieron en hielo durante 20 min, se centrifugaron a 12.000 rpm a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Las proteínas se cuantificaron por el método del ácido bicinónico (BCA). Se separaron 60 µg de proteínas por peso molecular en un gel de poliacrilamida con SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1 h en TBS-T (0,1% Tween-20, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) con 5% de leche descremada y se incubaron con anticuerpos primarios comerciales específicos para FOXA1 (Abcam 5089), ACTB (cell signaling 4967S), y H3 (Santa Cruz Biotechnology SC-8654-R). El revelado de la membrana se realizó con los anticuerpos secundarios correspondientes y el reactivo ECL (Amersham). La detección de las bandas se realizó mediante un equipo G-Box y el análisis de las fotografías de las membranas con el programa Image J v1.41. Los resultados se expresaron como la expresión relativa del gen en estudio respecto de los genes de referencia para ambos compartimentos subcelulares.

### **Clonado y silenciamiento génico por shRNA**

Con el fin de silenciar los genes de FOXM1 y FOXA1, se diseñaron oligonucleótidos utilizando la página web de Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/>). Esta herramienta bioinformática, da una lista de secuencias probables para silenciar el gen de interés.

El clonado de los shRNA se realizó según el protocolo de Addgene (<http://www.addgene.org/tools/protocols/plko/>). Brevemente, los oligonucleótidos fueron clonados en vector pLKO.1, el cual está diseñado para la expresión de shRNA. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5α y se las creció en LB ampicilina (100 µg/ml). Se realizó *colony PCR* para cada una de las colonias con el objetivo de determinar los clones positivos (vector con el oligonucleótido). Las colonias transformadas con el shRNA se secuenciaron para verificar la secuencia de los insertos. De contener los shRNA correctos, estos vectores se utilizarán para transfectar cultivos celulares de PC3 y C4-2B. El silenciamiento de los genes blanco se corroborará por RT-qPCR y Western Blot.

### **Análisis estadísticos**

Los experimentos se realizaron por triplicado, salvo otra indicación. Todos los datos se expresan como media ± error estándar (ES). Se utilizó el test de Student y se consideró que las diferencias fueron estadísticamente significativas si  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión de FOXO1, FOXO3, FOXA1 y FOXM1 en células PC3**

Se cuantificaron los niveles de ARNm en células PC3 luego de los diferentes tratamientos. El tratamiento con dexametasona disminuye significativamente los niveles de ARNm de FOXA1, no altera la expresión de FOXM1 y FOXO3, y produce un aumento leve de los niveles de FOXO1 (Fig. 1). La Testosterona produjo una disminución significativa de los niveles de FOXA1, FOXM1 y FOXO3. En cambio, los niveles de ARNm de FOXO1 aumentaron con el mismo tratamiento (Fig. 1).

Al exponer a las células a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de ARNm de los genes FOXO1 y FOXO3. Mientras que la expresión de FOXM1 y FOXA1 no se vio afectada por este tratamiento.

Finalmente, se trataron las células con Hemina, observándose un aumento significativo de los niveles de FOXA1 y FOXM1. No se observan cambios para FOXO1 y FOXO3 (Fig.1). Debido a que los genes FOXO1 y FOXO3 responden al estrés oxidativo, se esperaba encontrar un aumento en su expresión al exponer a las células a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Con el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM no se observaba aumento en los niveles de ARNm para ninguno de los dos genes; por lo tanto, se decidió realizar un tratamiento que produjera mayor estrés oxidativo a las células (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM por 6h). En estas nuevas condiciones se vio un aumento en la expresión de los genes FOXO1 y FOXO3 (Fig. 2).

Debido a que se contaba con un anticuerpo para FOXA1, también se estudió la expresión de esta proteína utilizando la técnica de western-blot. Se observó que ninguno de los tratamientos alteró significativamente los niveles de proteína (Fig. 3).

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la Hemo oxigenasa-1 (HO-1) puede interactuar con distintas proteínas (STAT3 y GR) en el citoplasma, con la consecuente menor translocación de estas proteínas al núcleo<sup>5,11</sup>. Por lo tanto, con el objetivo de estudiar si HO-1 puede también retener a FOXA1 en el citoplasma, se analizó el efecto del tratamiento combinado de hemina y dexametasona. Para ello, las células PC3 se trataron durante 24h con hemina, y posteriormente con dexametasona durante 6h. Finalizados los tratamientos, se separaron las fracciones citoplasmática y nuclear para estudiar la expresión de FOXA1 en ambos compartimentos. Como era de esperar, no se encontró expresión citoplasmática de FOXA1. En núcleo se observó una disminución no significativa en el tratamiento combinado de hemina y dexametasona (Fig. 4). La falta de significancia estadística probablemente se debió a que, hasta el momento, se ha realizado sólo un experimento.

#### ***Efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión de FOXO1, FOXO3, FOXA1 y FOXM1 en células C4-2B***

Se analizaron los niveles de los ARNm de los genes FOXA1, FOXM1, FOXO1 y FOXO3 luego de los tratamientos con Hemina, Testosterona, Dexametasona y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La dexametasona redujo significativamente la expresión de FOXO3, mientras que no observaron diferencias para los otros genes (Fig. 5). El tratamiento con testosterona resultó en una reducción significativa en los niveles de expresión de los cuatro factores (Fig. 5). Finalmente, los tratamientos con hemina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultan en una menor expresión de FOXA1, FOXO1 y FOXO3 (Fig. 5).

Se analizó también la expresión de la proteína de FOXA1 en las fracciones de núcleo y citoplasma por western-blot. Se encontró una leve disminución de FOXA1 nuclear en las células tratadas con dexametasona (Fig.6).

#### ***Clonado de los shRNA para FOXA1 y FOXM1***

Para estudiar el rol de FOXA1 y FOXM1 en la progresión de los tumores prostáticos, se planteó silenciar la expresión de los factores. Para ello, se eligió la estrategia de shRNA. Los shRNA se diseñaron utilizando la herramienta bioinformática del Broad Institute. Se eligieron 3 secuencias de oligonucleótidos diferentes para cada gen. Se lograron clonar 1 shRNA para FOXA1 y 2 shRNA para FOXM1 (Fig. 7). Se secuenciaron todos los clones positivos para corroborar la secuencia de los shRNA. Al término de esta beca, no se han realizado experimentos de silenciamiento de FOXA1 y FOXM1.

#### **DISCUSIÓN**

Se encontró que las hormonas testosterona y dexametasona reducen significativamente la expresión de las mayoría de los genes FOX estudiados en ambas líneas celulares. Interesantemente, en la línea celular C4-2B que expresa tanto AR como GR, la disminución de la expresión es mayor que en la línea PC3, la cual expresa solamente GR.

Hay muchos estudios en los que se analiza la expresión, actividad y localización génica de los receptores hormonales en distintos tipos de tumores; y el cáncer de próstata no es una excepción. Los resultados publicados son variados, y en ciertos puntos contradictorios. Por ejemplo, se ha demostrado que FOXA1 está involucrado en la vía del AR, siendo un factor pionero para la unión del AR al ADN. Sin embargo, otros estudios reportan que la sobre-expresión de FOXA1 inhibe el efecto agonista de la

dihidrotestosterona sobre el AR<sup>1, 2</sup>. Recientemente, se ha publicado que FOXA1 podría tener un efecto dual regulando dos procesos oncogénicos distintos mediante distintos mecanismos de acción. Por un lado, FOXA1 puede inducir el crecimiento celular regulado por el AR; pero por otro lado, puede inhibir la movilidad celular y la transición epitelio-mesenquimal por una vía AR independiente<sup>9</sup>.

Sin embargo, no hay trabajos que estudien la regulación de estos factores en las distintas situaciones en las que se encuentran las células prostáticas tumorales: i) estrés oxidativo, ii) presencia de andrógenos, y iii) presencia de glucocorticoides.

En este trabajo nos propusimos estudiar cómo se regula la expresión de FOXA1, FOXM1, FOXO1 y FOXO3 en las condiciones mencionadas. Encontramos que los estímulos hormonales y el estrés oxidativo modulan la expresión de los genes estudiados.

A nivel de proteína, no se encontraron cambios para FOXA1. Sin embargo el tratamiento combinado de hemina y dexametasona reduce la expresión nuclear de este factor.

Los resultados aquí presentados son todavía preliminares y nos encontramos realizando más experimentos para conocer mejor el rol de los factores FOX en la biología de los tumores prostáticos. Los resultados que se desprendan de este proyecto darán nuevos aportes a la biología del cáncer de próstata.

### ***Planes futuros***

Los planes futuros involucran continuar con los experimentos de silenciamiento de FOXA1 y FOXM1 para poder estudiar los cambios fenotípicos que esto induce en las líneas celulares. Estudiaremos la viabilidad, proliferación, apoptosis, migración e invasión en las distintas condiciones.

Planeamos también estudiar la expresión de estos factores mediante inmunohistoquímica en muestras de pacientes con el objetivo de evaluar la asociación entre la expresión y las distintas características clínico patológicas de la enfermedad (grado de Gleason, recaída, progresión a CRPC, etc).



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Augello MA, Hickey TE, Knudsen KE. FOXA1: master of steroid receptor function in cancer. *The EMBO Journal* (2011) 30, 3885–3894.
2. Bernardo GM, Keri RA. FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. [Biosci Rep.](#) 2012 Apr 1;32(2):113-30.
3. Buchanan, G, Greenberg, NM, Scher, HI, Harris, JM, Marshall, VR, et al. (2001). "Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer." *Clin Cancer Res*,7(5): 1273-1281.
4. Cooperberg, MR, Broering, JM, Litwin, MS, Lubeck, DP, Mehta, SS, et al. (2004). "The contemporary management of prostate cancer in the United States: lessons from the cancer of the prostate strategic urologic research endeavor (CapSURE), a national disease registry." *J Urol*,171(4): 1393-1401.
5. Elguero B, Gueron G, Giudice G, Toscani MA, De Luca P, Zalazar F, et al. Unveiling the Association of STAT3 and HO-1 in Prostate Cancer: Role beyond Heme Degradation. *Neoplasia* 2012, 14 (11): 1043–1056.
6. Grasso, CS, Wu, YM, Robinson, DR, Cao, X, Dhanasekaran, SM, et al. (2012). "The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer." *Nature*,487(7406): 239-243.
7. Isaacs, JT, Coffey, DS (1981). "Adaptation versus selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma." *Cancer Res*,41(12 Pt 1): 5070-5075.
8. Jemal, A, Bray, F, Center, MM, Ferlay, J, Ward, E, et al. (2011). "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin*,61(2): 69-90.
9. [Jin HJ, Zhao JC, Ogden I, Bergan RC, Yu J.](#) Androgen receptor-independent function of FoxA1 in prostate cancer metastasis. [Cancer Res.](#) 2013 Jun 15;73(12):3725-36.
10. Koutsilieris, M, Mitsiades, CS, Bogdanos, J, Dimopoulos, T, Karamanolakis, D, et al. (2004). "Combination of somatostatin analog, dexamethasone, and standard androgen ablation therapy in stage D3 prostate cancer patients with bone metastases." *Clin Cancer Res*,10(13): 4398-4405.
11. Leonardi DB, Paez A, Schuster F, Cotignola J, Vazquez E. Efecto del tratamiento con hemina sobre el receptor de glucocorticoides sobre la línea celular de cáncer de próstata PC3. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC); 2014 Nov 19-22; Mar del Plata, Argentina. SAIC.
12. Li, Z, Tuteja, G, Schug, J and Kaestner, KH (2012). "Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer." *Cell*,148(1-2): 72-83.
13. Livak, KJ, Schmittgen, TD (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods*,25(4): 402-408.
14. Pengfei L, Heehyoung L, Shaodong G, Terry GU, Guido J, Wenlong B. AKT-Independent Protection of Prostate Cancer Cells from Apoptosis Mediated through Complex Formation between the Androgen Receptor and FKHR. *Mol Cell Biol.* 2003 January; 23(1): 104–118.
15. Radhakrishnan, SK, Bhat, UG, Hughes, DE, Wang, IC, Costa, RH, et al. (2006). "Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box M1." *Cancer Res*,66(19): 9731-9735.
16. Sahu, B, Laakso, M, Ovaska, K, Mirtti, T, Lundin, J, et al. (2011). "Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin, androgen signalling and prostate cancer." *EMBO J*,30(19): 3962-3976.
17. Sahu, B, Laakso, M, Pihlajamaa, P, Ovaska, K, Sinielnikov, I, et al. (2013). "FoxA1 specifies unique androgen and glucocorticoid receptor binding events in prostate cancer cells." *Cancer Res*,73 (5): 1570-1580.
18. SIVER/INC. En base a los datos de GLOBOCAN 2012. Argentina, Enero 2014.
19. SIVER/INC. Ministerio de Salud de la Nación, en base a registros de mortalidad de la DEIS. Argentina, 2014
20. Wang, M y Gartel, AL (2011). "Micelle-encapsulated thioestron as an effective nanomedicine for inhibiting tumor growth and for suppressing FOXM1 in human xenografts." *Mol Cancer Ther*,10(12): 2287-2297.
21. Yano, A, Fujii, Y, Iwai, A, Kageyama, Y, Kihara, K (2006). "Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells." *Clin Cancer Res*,12(10): 3003-3009.
22. Yemelyanov, A, Czornog, J, Chebotaev, D, Karseladze, A, Kulevitch, E, et al. (2007). "Tumor suppressor activity of glucocorticoid receptor in the prostate." *Oncogene*,26(13): 1885-1896.



ANEXO

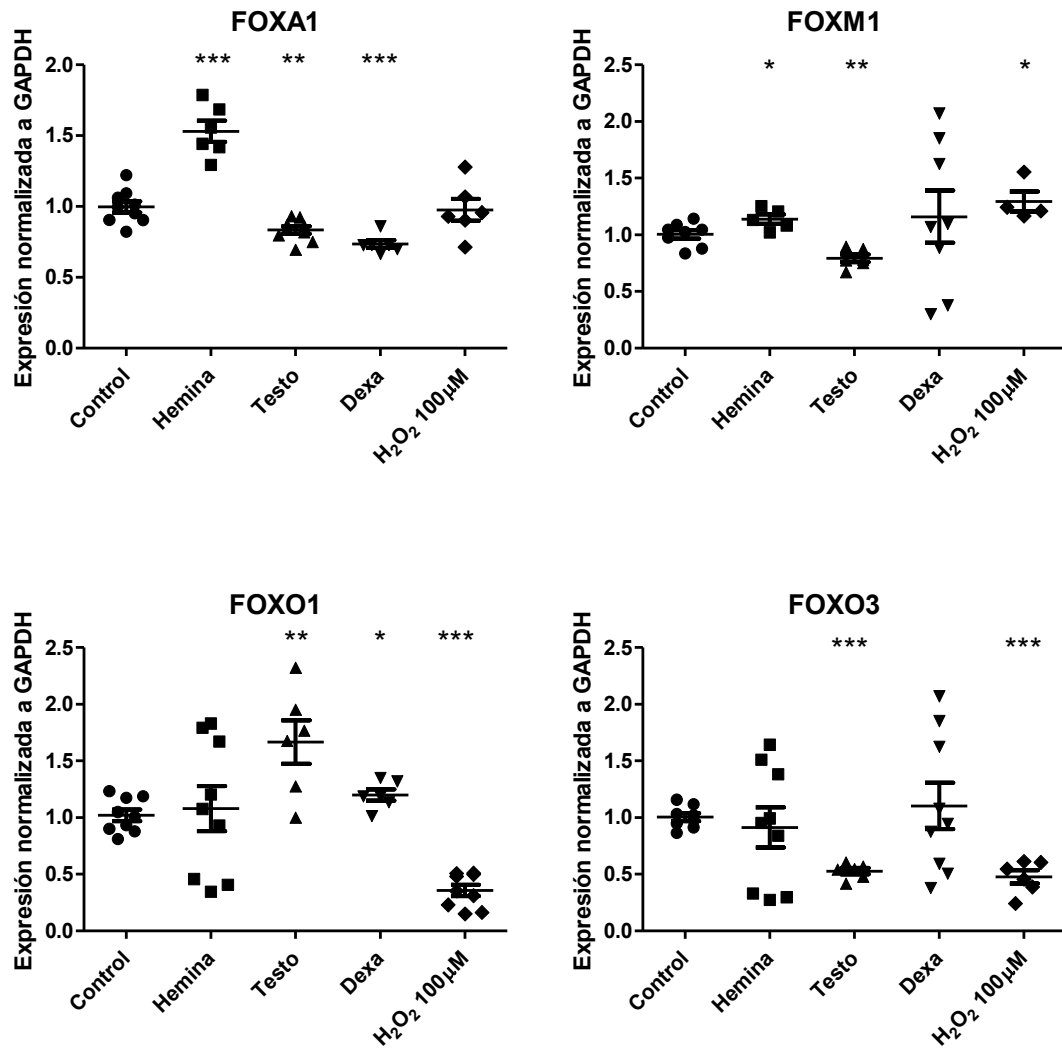
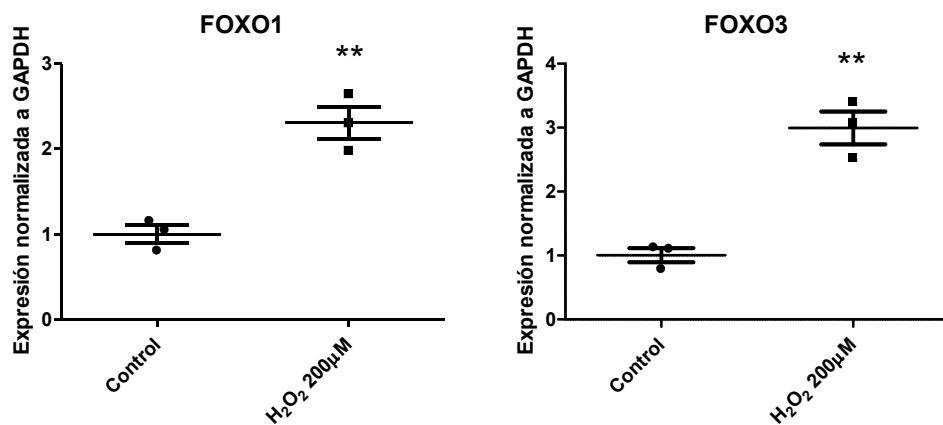


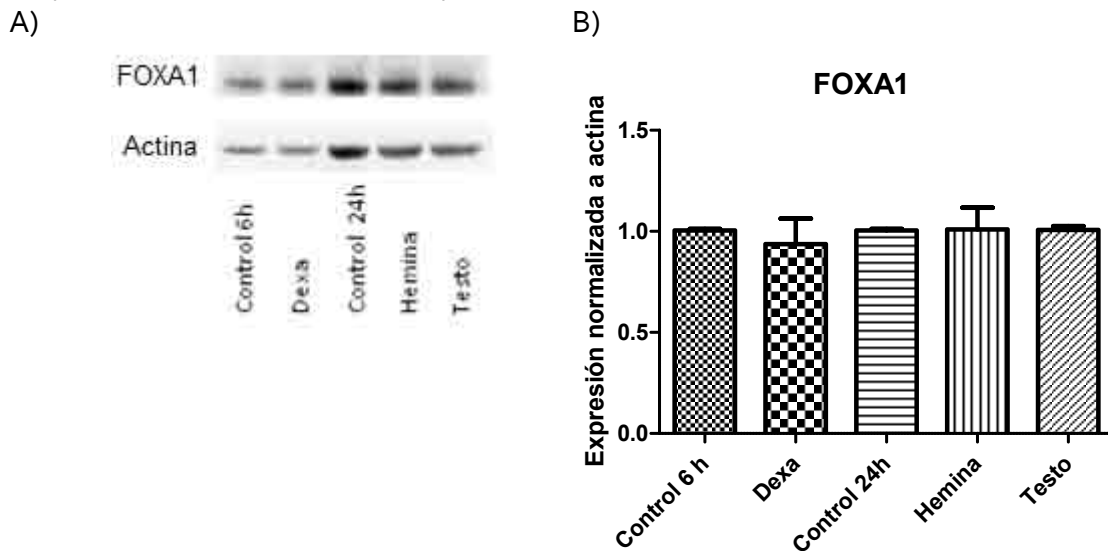
Fig.1. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de FOXA<sub>1</sub>, FOXM<sub>1</sub>, FOXO<sub>1</sub> y FOXO<sub>3</sub> en células PC<sub>3</sub>.

La figura muestra la expresión génica analizada por RT-qPCR, normalizada al gen de referencia (GAPDH) y relativizada al control sin tratar. Se encontraron alteraciones significativas en la expresión de los distintos factores FOX luego de los distintos tratamientos. Se grafica media ± ES de un experimento. \* p < 0.05, \*\*p < 0,01 y \*\*\*p < 0,001 (t-test) entre tratamientos y control.



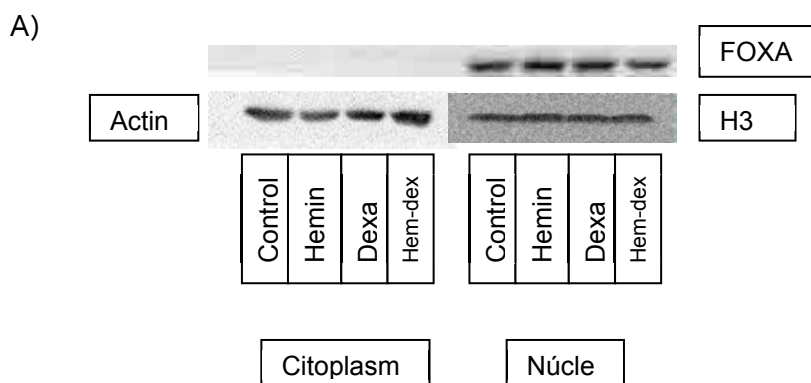
**Fig.2. Efecto del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM por 6h sobre la expresión de FOXO1 y FOXO3 en células PC<sub>3</sub>.**

La figura muestra la expresión génica analizada por RT-qPCR normalizada al gen de referencia (GAPDH) y relativizada al control sin tratar. Se observa un aumento significativo de la expresión de ambos genes. Se grafica media ± ES de tres experimentos independientes. \* p < 0.05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 (t-test) entre tratamientos y control.

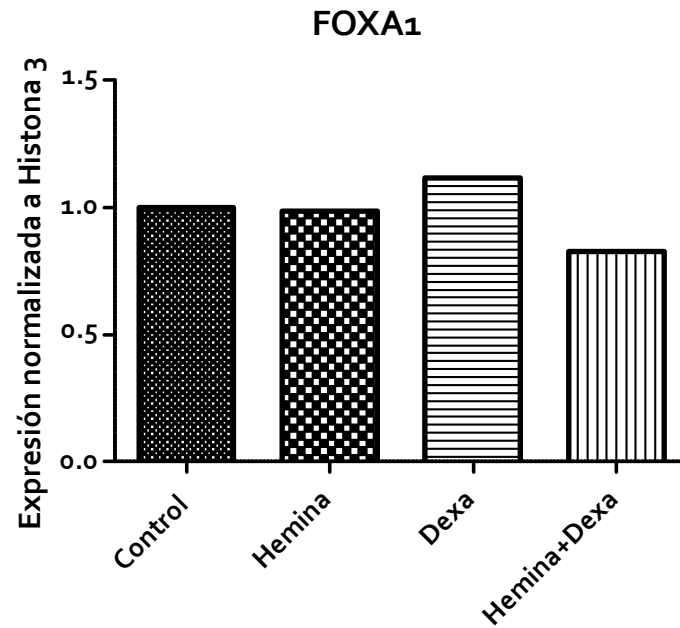


**Fig.3. Niveles proteicos de FOXA1 en células PC<sub>3</sub> analizado por western-blot.**

Las células PC<sub>3</sub> se trataron con dexametasona por 6h (dexa), y con hemina y testosterona (testo) por 24h. Se realizó el western-blot con anticuerpos específicos para FOXA1 y Actina (control de carga). A) Imagen de un experimento representativo de western-blot. B) Cuantificación de los niveles de FOXA1 normalizado a la proteína de referencia (Actina) y relativizado al control sin tratar. Se grafica la media ± ES de dos experimentos independientes. No se observan diferencias significativas para ninguno de los tratamientos.



B)



**Fig.4. Estudio de FOXA1 en células PC3 analizado por western-blot.**

Las células PC<sub>3</sub> se trataron con dexametasona por 6h (dexa) o hemina por 24h. El tratamiento combinado se realizó tratando las células con hemina 24hs y luego dexametasona por 6h. A) Imagen del western-blot. B) Cuantificación relativa de FOXA1 relativizada al control sin tratar. Para el co-tratamiento se observó una disminución no significativa de la expresión de FOXA1 nuclear. No se observaron cambios en la expresión de FOXA1 con los otros tratamientos.

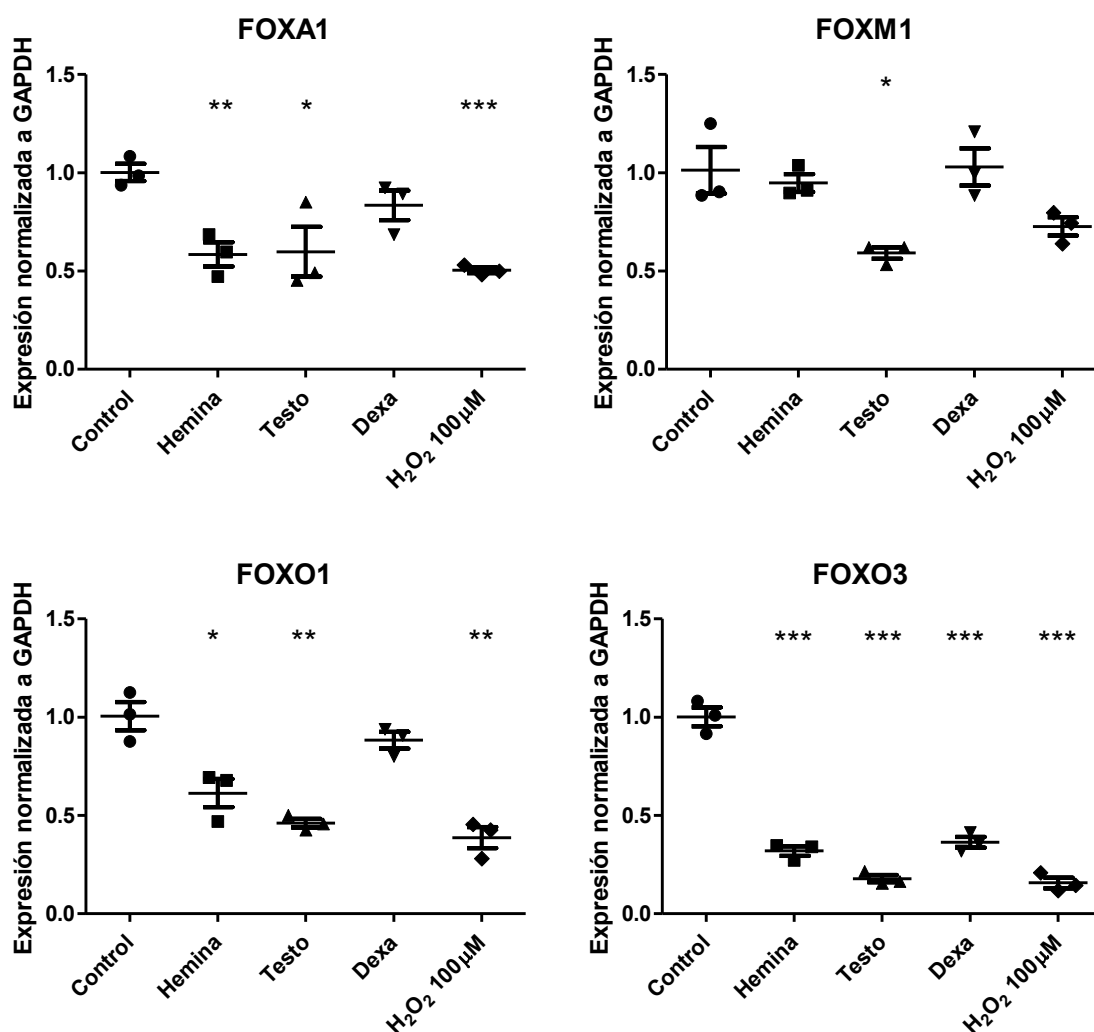
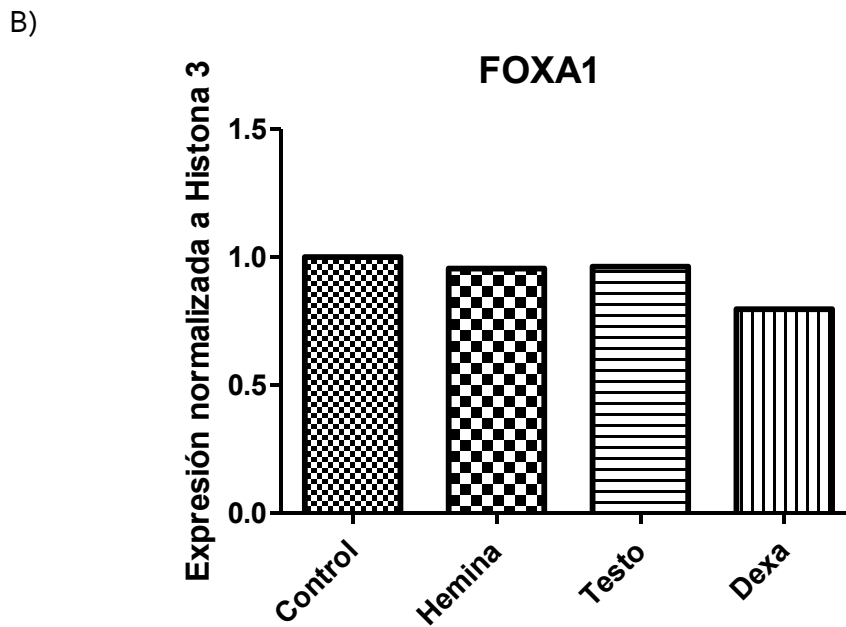
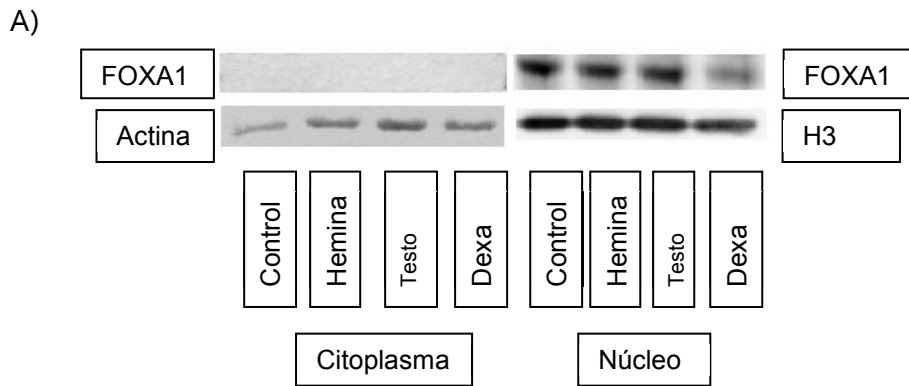
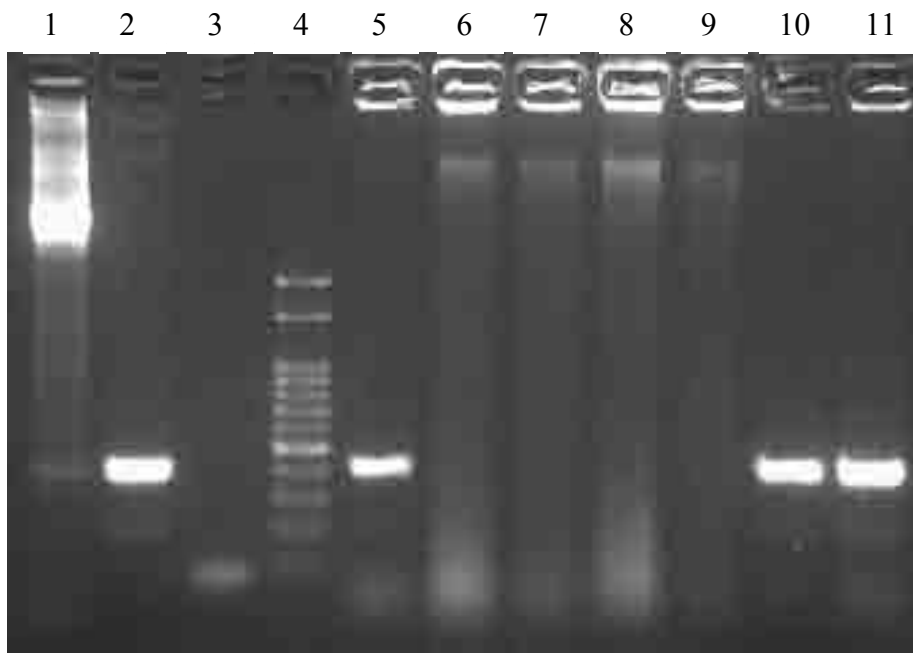


Fig.5. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de FOXA1, FOXM1, FOXO1 y FOXO3 en células C4-2B.

La figura muestra la expresión génica normalizada al gen de referencia (GAPDH) y relativizada al control sin tratar. Se encontraron alteraciones significativas en la expresión de los distintos factores FOX luego de los distintos tratamientos. Se grafica media  $\pm$  ES de un experimento. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  (t-test) entre tratamientos y control.



**Fig.6. Niveles proteicos de FOXA1 en células C4-2B analizado por western-blot.**  
 Se realizó la separación de las fracciones núcleo y citoplasma y se corrió el western-blot con anticuerpos específicos para FOXA1 y Actina (control de carga). En la figura se muestra un experimento representativo. A) Imagen del western-blot. B) Grafico mostrando la cuantificación de las bandas del gel, donde se ven los niveles de FOXA1 normalizado al gen de referencia (Actina) y relativizada al control sin tratar.



**Fig.7. Gel de agarosa del producto de la *colony PCR*.**

La figura muestra la electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR de las colonias obtenidas luego del clonado de los shRNAs. Calle 1: vector pLKO.1 vacío; 2: control positivo (vector recombinante); 3: control negativo de PCR, 4: Marker de 50 pb, 5: shRNA<sub>1</sub> FOXA<sub>1</sub>, 6: shRNA<sub>2</sub> FOXA<sub>1</sub>, 7: shRNA<sub>3</sub> FOXA<sub>1</sub>, 8: shRNA<sub>1</sub> FOXM<sub>1</sub> (colonia 1), 9: shRNA<sub>1</sub> FOXM<sub>1</sub> (colonia 2), 10: shRNA<sub>1</sub> FOXM<sub>1</sub> (colonia 3), 11: shRNA<sub>3</sub> FOXM<sub>1</sub>.

Se observan tres colonias recombinantes: shRNA<sub>1</sub> FOXA<sub>1</sub>, shRNA<sub>1</sub> FOXM<sub>1</sub> y shRNA<sub>3</sub> FOXM<sub>1</sub>.

# GENOMA MITOCONDRIAL Y METILACIÓN GÉNICA NUCLEAR EN TUMORES MAMARIOS HUMANOS

Lucía Cané

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

Director: Dr. Walter H. Pavicic

## RESUMEN

La metilación de genes nucleares juega un papel importante en la tumorigénesis humana. Varios genes TSG (*tumor suppressor gene*) y microARN poseen en sus promotores islas CpG asociadas a la regulación epigenética de su expresión. La variación del número de copias (NC) de ADNmt induciría cambios de metilación en genes nucleares. Mediante los métodos qPCR y MS-MLPA, respectivamente, analizamos ambos eventos en 39 muestras pareadas T/N (Tumoral/No-tumoral adyacente) de pacientes con carcinoma mamario. Se encontró una disminución significativa de NC para ADNmt ( $\cong 30\%$ ,  $p < 0,01$ ;  $N > T$ ) en el 74% de los casos. Los TSGs APC, CDH13 y RASSF1 presentaron hipermetilación ( $p < 0,001$ ). El gen mir-200a dio como resultado una correlación significativa ( $p: 0,03$ ) entre NC de ADNmt y niveles de metilación. El gen RASSF1 ( $p: 0,03$ ;  $r: -0,36$ ) presentó una correlación inversa entre metilación y copias de ADNmt en tejido tumoral. Podemos decir que la reducción de ADNmt y la variación en metilación de microARNs y TSG son eventos frecuentes en tejido canceroso mamario. Proponemos a la disfuncionalidad mitocondrial, determinada como cambios en su contenido genómico, como un mecanismo celular asociado a los cambios en niveles de metilación, hallados frecuentemente durante el desarrollo tumoral del tejido mamario, para el promotor de los genes mir-200a y RASSF1.

## ABSTRACT

Nuclear genes methylation plays an important role in human tumorigenesis. Many TSGs (*tumor suppressor gene*) and miRNA genes have associated CpG islands in their promoters, suggesting epigenetic regulation of their expression. Mitochondrial genome copy number (mtDNA-CN) variation would induce methylation changes in nuclear genes. Using qPCR and MS-MLPA methods, respectively, we investigated both events in 39 paired samples T/N (tumor/non-tumor adjacent) from breast cancer patients. Mitochondrial analysis revealed a significant decrease in their mtDNA-CN in 74% of the cases ( $\cong 30\%$ ,  $p < 0,01$ ;  $N > T$ ). TSGs APC, CDH13 and RASSF1 showed hypermethylation ( $p < 0,001$ ). A significant correlation ( $p: 0,03$ ) between mtDNA-CN variation and methylation levels was found for mir-200a gene. An inverse correlation between methylation and mtDNA copies was found for RASSF1 gene in tumor tissue ( $p: 0,03$ ;  $r: -0,36$ ). Our results highlight the importance of mtDNA depletion and promoter methylation changes in microRNAs and TSGs as common events found in breast cancer. Moreover, our study provides evidence to support that mitochondrial dysfunction, evaluated as changes in genomic content, is a cellular mechanism associated with methylation level changes, frequently reported in breast cancer tissues, for mir-200a and RASSF1 genes promoters.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la forma tumoral maligna más común y la primera causa de muerte por carcinoma en mujeres [14]. En Argentina, según datos actuales del Ministerio de Salud de la Nación, se diagnostican cerca de 19.000 nuevos casos de este tipo tumoral, representando cerca del 18% de la incidencia anual total en el país, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres [5]. Las mitocondrias están presentes en casi todas las células eucariotas y poseen su propio genoma (ADNmt). Se conoce que existe una estrecha integración de señales núcleo-mitocondria y mitocondria-núcleo [22]. Las células humanas contienen alrededor de  $10^3$ – $10^4$  mitocondrias, conteniendo de 2 a 10 moléculas de ADNmt por mitocondria [15]. El número de copias de ADN mitocondrial es una medida relativa de la masa mitocondrial de la célula; variaciones del mismo dan lugar a la condición celular conocida como disfunción mitocondrial [1, 7, 9, 19]. Así, su control es muy importante para la biogénesis

mitocondrial y el funcionamiento celular normal. Haciendo particular referencia a tumores mamarios, estudios epidemiológicos demuestran una asociación significativa entre un incremento del número de copias de ADNmt en sangre periférica y el aumento del riesgo al desarrollo de la enfermedad [17].

Junto a las modificaciones covalentes del ADN y las proteínas histonas, los miRNAs (o microARNs) son importantes reguladores epigenéticos que controlan la expresión génica sin modificar la secuencia misma del ADN. Distintos tipos de cáncer presentan patrones de alteración de miRNAs e inestabilidad epigenética característicos. Un gen supresor tumoral (TSG) es aquel que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en cancerígena. Dichos genes impiden la proliferación celular excesiva y, por lo tanto, su silenciamiento (inhibición de la expresión) aumenta la posibilidad del desarrollo tumoral. Se sabe que varios miRNA y TSG tienen asociadas islas CpG, sugiriendo una regulación epigenética de su expresión [8, 12, 16, 20].

En resumen, a pesar de los avances realizados en las últimas décadas sobre genética molecular, que permitieron la identificación de mutaciones específicas y de factores de susceptibilidad que subyacen a una fracción significativa de casos con cáncer de mama, aún sigue sin abordarse en profundidad la posible asociación entre disfunción mitocondrial, medida por alteraciones del número de copias de su genoma, y el desarrollo tumoral de carcinomas mamarios. Lo mismo ocurre con la asociación entre dicha disfunción y los cambios en patrones de metilación a nivel nuclear. En consecuencia, el abordaje del estudio de tales tópicos resulta un área importante sobre la cual aportar nuevos conocimientos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Muestras analizadas**

Todas las muestras biológicas de pacientes con cáncer de mama, analizadas en el presente trabajo, fueron obtenidas por medio de la Clínica IPENSA de la ciudad de La Plata, Bs. As. Actualmente, el material genómico forma parte del banco de ADN del IMBICE. Cada paciente firmó el respectivo consentimiento informado, el cual se encuentra aprobado por el comité de ética de la clínica.

Se analizaron un total de 39 muestras pareadas de tejido tumoral y no tumoral adyacente (T/N), provenientes de pacientes femeninas con carcinoma mamario de un centro médico de la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina). Todas las muestras de tejido mamario se obtuvieron de biopsias o en el acto quirúrgico. Ninguna de las pacientes donantes había recibido tratamiento de radio- y/o quimioterapia previo a la toma de la muestra. La extracción de ADN total se realizó mediante kits comerciales Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

### **Determinación del número de copias de ADNmt**

El número de copias relativo de ADNmt se determinó mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real, qPCR. El método consistió en amplificar el gen mitocondrial ND1 (gen específico o secuencia *target* a ser cuantificada) y, simultáneamente, el gen nuclear de copia única  $\beta$ -globina empleado para la normalización de la reacción de qPCR. Los valores de Ct (del inglés, *threshold cycle number*) obtenidos para cada gen, mediante la reacción de qPCR y su respectiva curva de amplificación, fueron utilizados para calcular el número de copias de ADNmt relativo, mediante la siguiente ecuación: Número de copias relativo =  $2^{\Delta Ct}$  ( $\Delta Ct = Ct^{\beta\text{-globin}} - Ct^{ND1}$ ). Las condiciones de reacción empleadas para el diseño y puesta a punto del método qPCR de cuantificación relativa, son una modificación del procedimiento publicado en el trabajo de Kim Jung y col. [6]. La amplificación de cada gen se llevó a cabo en tubos de reacción independientes utilizando la plataforma de detección en tiempo real MiniOpticon Real-Time PCR System de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Para ambos genes, la mezcla de reacción contenía 1X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Master Mix de Solis Biodyne (Riiu, Tartu, Estonia) y 0,25  $\mu$ M de cada *primer* del par correspondiente; se emplearon 25ng de ADN por muestra y se completó con H<sub>2</sub>O para alcanzar un volumen final de 20  $\mu$ l. Ciclo de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C durante 15 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 58°C durante 20 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos. Para cada muestra, ambos genes se amplificaron y estudiaron por duplicado y en paralelo en una misma placa de corrida. Las secuencias de los *primers* utilizados fueron: para  $\beta$ -globina: *Forward* 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3', *Reverse* 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'; y para el gen ND1: *Forward* 5'-AAC ATA CCC ATG GCC AAC CT-3', *Reverse* 5'-AGC GAA GGG TTG TAG CCC-3'.



### **Eficiencia de la qPCR**

Con el fin de determinar la eficiencia de reacción para cada gen amplificado, se realizó una curva de amplificación utilizando diluciones seriadas de una muestra control de ADN. Se construyó una curva estándar de reacción con cuatro concentraciones distintas de ADN, empleando las condiciones de amplificación antes mencionadas; se corrió cada punto por triplicado. Se partió de la concentración estándar utilizada en la amplificación, siendo esta de 25ng (punto 1) y se procedió a generar los 3 puntos restantes mediante diluciones seriadas con el factor 1/10. Con los datos de Ct determinados se procedió a graficar la correspondiente curva estándar de reacción; la misma se empleó posteriormente para determinar la eficiencia de reacción mediante la pendiente de la recta, para cada uno de los genes. Una pendiente de la recta de  $-3.3 \pm 10\%$  refleja una eficiencia de la reacción de un 100%. El cálculo de eficiencia se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \times 100$ , donde E = 100 se corresponde con el 100% de eficiencia [3].

### **Estudio de Metilación**

Vale aclarar que los datos de metilación utilizados (sobre el mismo set de muestras) fueron obtenidos previamente en el laboratorio [13]. En el presente trabajo, solo se emplearon los datos para el análisis estadístico de correlación entre número de copias mitocondriales y niveles de metilación. Se empleó el método denominado MS-MLPA, del inglés *Methylation Specific - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* [11]. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

Se estudió la metilación en un total de 10 promotores para miRNAs (mir-124-1, 124-2 y 124-3, 1-1, 148a, 18bl, 200a, 208a, 373 y 152), todos ellos candidatos a estar epigenéticamente regulados mediante islas CpG asociadas. Se analizó el nivel de metilación de islas CpG presentes dentro de la secuencia promotora o en regiones próximas a la misma [12]. Conjuntamente, se analizó la metilación en los promotores de un grupo de genes codificantes para Genes Supresores de Tumores mediante el kit comercial ME001 Tumour Suppressor Mix 1 Kit (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). El mismo contiene sondas para 24 TSGs que se encuentran frecuentemente silenciados por causa de la metilación en cáncer (TIMP3, APC, CDKN2A, MLH1, ATM, RARB, CDKN2B, HIC1, CHFR, BRCA1, CASP8, CDKN1B, PTEN, BRCA2, CD44, RASSF1, DAPK1, VHL, ESR1, TP73, FHIT, IGSF4, CDH13 y GSTP1).

### **Análisis Estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el programa SPSS *Statistics software* v18 (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL). Excepto para los cálculos pertinentes al Test Exacto de Fisher, para el cual se recurrió al programa de análisis epidemiológico Epi Info 7.1.5 (distribuido por el *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA, USA).

La determinación de la frecuencia de distribución se realizó mediante el test de Shapiro-Wilk. Para evaluar la significancia estadística de las posibles diferencias a ser halladas entre frecuencias o distribuciones (por ejemplo, número de copias de ADNmt, etc.), se empleó el test de probabilidad de Fisher o el test t-student (para aquellas series que no presenten una distribución normal, se utilizó el test de Wilcoxon), respectivamente.

El análisis de correlaciones, del tipo cuantitativas, se efectuó mediante el test de correlación de coeficiente de Pearson ( $r$ ) para evaluar correlación lineal o el test de coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ , rho), para el caso de una serie de datos con distribución asimétrica. Para el caso de las correlaciones del tipo categóricas, el análisis estadístico se llevó a cabo empleando tablas de contingencia y Test Exacto de Fisher con la variante Mid-P.

Para todos los casos, se consideró significativo aquellos valores de  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### **Eficiencia de reacción**

Un punto importante dentro del método de qPCR es su eficiencia de reacción. Para evaluar la eficiencia del método en ambos genes amplificados se procedió a construir una curva de amplificación de 4 puntos para cada gen,  $\beta$ -globina y ND1, como se observa en las figuras 1a y 1b, respectivamente (figura 1: Rectas de eficiencia de la reacción de qPCR). Se graficó el Ct en función del logaritmo de la

concentración inicial de ADN. En el caso del gen de  $\beta$ -globina se obtuvo un valor de pendiente de -3,5837 (figura 1a) reflejando una eficiencia de reacción del 90,1%. Para la reacción de amplificación del gen mitocondrial ND1 (figura 1b) se obtuvo una eficiencia de reacción del 93,3%, siendo el valor de la pendiente de recta de -3,4945. Otro factor estadístico que debe considerarse para evaluar la eficiencia de una reacción es el valor  $R^2$ , siendo el valor para ambas rectas mayor a 0,99 ( $R^2$  igual a 0,996 para ND1 y  $\beta$ -globina). Por lo tanto, la eficiencia de reacción y el valor de  $R^2$ , determinados para ambos genes amplificados, presentan valores que se encuentran dentro del rango óptimo.

### **Cuantificación del número de copias de ADNmt**

Utilizando la técnica desarrollada de real time cuantitativo qPCR, se determinó el número de copias relativo de ADNmt en 39 muestras pareadas de tejido tumoral/no-tumoral adyacente obtenidas de casos de mujeres con carcinoma mamario. Se amplificó cada una de las muestras por duplicado y luego se determinó el valor final de Ct como el valor promedio calculado a partir del dato obtenido para cada reacción de amplificación individual para ambos genes [ $Ct \text{ final} = (Ct_1 + Ct_2) / 2$ ].

Luego de realizar la cuantificación del número de copias de ADNmt en 34 muestras pareadas (de las 39 totales, 5 fueron excluidas por fallas en su amplificación), se determinó que el valor de media para el tejido no-tumoral fue de 4392 copias genómicas, con un intervalo de confianza dado por los valores [3599 – 5185; CI 95%], mínimo y máximo, respectivamente; por otra parte, el tejido tumoral presentó un valor de 3091 copias de ADNmt como media y un CI 95% de [2491 – 3690] (tabla 1: Media, CI 95% y mediana del NC de ADNmt de las muestras N y T; y figura 2: Diagrama del número de copias relativo de ADNmt). Esta diferencia representa una disminución de casi el 30% en el número promedio de copias genómicas para la totalidad de muestras, hacia el tejido canceroso respecto de su contraparte no afectada, siendo la misma estadísticamente significativa con  $p < 0,01$  (figura 2).

Posteriormente, se estudió la diferencia del número de copias (NC) relativo de ADNmt entre cada par de muestras de tejido no-tumoral (N) y tumoral (T), mediante la fórmula:  $\Delta^{N-T} = NC^N - NC^T$ . Valores positivos para delta N-T, representan una disminución del número de copias en el tejido tumoral respecto de su contraparte no-tumoral. Tal como se observa en el gráfico de barras derivado de los resultados adquiridos para cada caso (figura 3: Variación de ADNmt entre tejidos), un 74% de las muestras presentó barras con valor positivo; es decir, hubo una reducción del número de copias relativo de ADNmt entre cada muestra de tejido no-tumoral y su contraparte tumoral en 26 de los 34 casos analizados.

### **Estudio de correlación ADNmt – Metilación**

#### **Análisis de los niveles de metilación**

El nivel de metilación se determinó mediante el método de MS-MLPA, su valor puede variar entre 0 y 1,0 (representando desde 0 – 100 % del ADN metilado, respectivamente) [12]. En resumen, haciendo un análisis comparativo (mediante test de Wilcoxon) del grado de metilación hallado entre ambos tejidos se obtuvieron los siguientes resultados. Comparado con su contraparte no-tumoral adyacente, las alteraciones predominantes en tejido tumoral fueron aumento de metilación (hipermetilación) en los miRNAs 124a-1\*,124a-2\*,124a-3\*,148a\*\* y 152\*\*; disminución de metilación (hipometilación) para 208a\* y 373\*, siendo estas diferencias significativas \* $p < 0,0001$  y \*\* $p < 0,001$ , respectivamente; y ningún cambio relevante para 18bl, 1-1 y 200a. Por otra parte, respecto a los genes TSG analizados mediante el uso del segundo kit, se obtuvieron diferencias de metilación estadísticamente significativas para APC, CDH13 y RASSF1 ( $p < 0,0001$ ); mientras que para el resto de genes evaluados no se encontró diferencias entre tejido tumoral y no-tumoral. En la tabla 2 (Análisis de metilación en miRNA y TSG) se presentan los valores de media  $\pm$  desviación estándar (SD) y el resultado de significancia obtenido de la comparación entre ambos tejidos.

#### **Análisis de correlación entre ADNmt y niveles de metilación**

Se examinó si la alteración en los niveles de metilación hallada al comparar el tejido tumoral y no-tumoral adyacente, para un mismo gen, podría estar asociada a la variación encontrada para el número de copias del genoma mitocondrial en los mismos tejidos. Para llevar a cabo el análisis, se procedió a calcular el valor de relación entre el tejido tumoral y el no-tumoral, es decir el valor de ratio T/N para ambas variables (se empleó la transformación Raíz Cuadrada).

Se realizaron dos tipos de análisis estadísticos, uno cuantitativo (correlación de Pearson) y otro categórico (tablas de contingencia y Test Exacto de Fisher).

En primer lugar se evaluó la existencia de correlación mediante el test de Pearson y su coeficiente  $r$ . De la totalidad de genes estudiados, 6 miRNA y 3 TSG, ninguno dio resultado de significancia para la correlación evaluada (tabla 3: Análisis comparativo entre número de genomas mitocondriales y grado de metilación, columnas correspondientes a Ratio T/N ADNmt vs. Ratio T/N Met). Sin embargo, puede resaltarse que para el gen RASSF1 se obtuvo como resultado un valor de  $\rho$ : -0,30 y un valor de  $p$ : 0,09; no obstante, este último no es significativo, pudiendo indicar que a futuro se necesita aumentar el  $n$  muestral para arribar a un resultado concluyente. Dado que se observó una tendencia de interdependencia, al evaluar la variación del ratio T/N para los cambios de metilación respecto de cómo varía el ratio T/N para el número de copias de ADNmt, se procedió a evaluar la correlación mediante tablas de contingencia de 2x2 y el test exacto de Fisher con  $Mid-P$  (ver cuadrantes en figura 4 a-b). Se obtuvieron resultados relevantes para los genes descritos a continuación (tabla 3, columna de la derecha, Test Exacto de Fisher).

El gen mir-200a dio correlación significativa entre número de copias para ADNmt y niveles de metilación (figura 4a), valor de  $p$ : 0,03 y un OR=0,25 (0,05<OR<1,11, CI 95%). Para el gen RASSF1, aunque no dio significativo ( $p$ : 0,09), el valor determinado de OR=2,54 (0,63<OR<11, CI 95%) indicaría una correlación inversa entre ambas variables (figura 4b). Si bien estos valores no permiten ser concluyentes, ambos siguen demostrando una tendencia de correlación; esto nuevamente indicaría que un aumento del número de casos, en futuros estudios, permitiría aportar claridad al respecto. Para los demás genes analizados, tanto los miRNA como los 2 TSG restantes, ninguno dio un resultado de correlación significativo (valores de  $p$  en tabla 3, figuras no presentadas en el informe).

Por último, debido a la significancia de los resultados obtenidos al evaluar la variación del ratio de metilación versus ratio de ADNmt entre ambos tejidos (con los dos métodos estadísticos), se procedió a analizar la posible asociación pero evaluando cada tejido de manera independiente. Se consideró únicamente el número de copias relativo de ADNmt determinado en cada tejido por separado versus el ratio T/N de metilación transformado. La correlación se evaluó mediante test de Pearson y se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 3 y figura 5: Gráficos de dispersión del número de copias de ADNmt versus el ratio de metilación T/N). Considerando el número de copias en el tejido tumoral, varios de los genes presentaron una correlación inversa entre número de genomas y nivel de metilación en tejido tumoral respecto al no-tumoral adyacente. Esto se observó para mir-124 (1, 2 y 3) y 373 y para los tres TSG (APC, RASSF1 y CDH13); siendo para el caso del gen RASSF1 una correlación significativa,  $p$ : 0,03 y  $\rho$ : -0,36 (figura 5c). Al considerar el número de copias determinado en la muestra no-tumoral, nuevamente dio como resultado que a bajo número de genomas el nivel de metilación mostraba un aumento. Esto se observó para los genes mir-124-1 y 2, mir-200a, mir-208a y mir-373. Dicha tendencia dio significativa para los genes mir-208a ( $p$ : 0,02 y  $\rho$ : -0,40) y mir-373 ( $p$ : 0,01 y  $\rho$ : -0,43), (figuras 5 a y b respectivamente).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo abordamos el análisis del número de copias de genomas mitocondriales en 39 muestras pareadas de tejido tumoral y no-tumoral adyacente. Los resultados se encuentran en concordancia con otros trabajos que analizaron el mismo evento. En la revisión hecha por Man Yu [24], donde analiza la variación del número de copias entre tejido maligno y no-maligno en diferentes tipos de cánceres, se indica que la cantidad de genomas mitocondriales se reduce significativamente en tejido tumoral respecto de la contraparte no-tumoral en un 63 al 82 % de los casos evaluados. Por lo tanto, la proporción hallada en nuestro set de muestras (26/34, 74%) se correlaciona con tales trabajos. Por otra parte, en otro trabajo de Man Yu y col. del año 2007 [25], analizando un set de 59 casos de tumores mamarios, determinan que el grado de disminución de la cantidad de copias es de aproximadamente un 40% en el tejido tumoral. Esto concuerda con el resultado de un 30% de reducción presente en nuestro grupo de casos. Por lo tanto, esto nos permite concluir que nuestros resultados no solo coinciden con los detallados en la literatura, sino que además confirman que el fenómeno de reducción de ADNmt en tejido canceroso mamario es un evento frecuente. Respecto del análisis de niveles de metilación, los resultados se encuentran en concordancia con los hallados actualmente en la literatura, los cuales demuestran que la presencia del evento de metilación en miRNA sucede con gran frecuencia en muestras tumorales [2, 4, 21, 23]. Para los genes TSG analizados se obtuvieron diferencias de metilación estadísticamente significativas para APC, CDH13 y RASSF1. Al respecto, el grupo de Murria R y col., en un trabajo del año 2015 [10], estudiaron un total de 98 muestras de pacientes con carcinoma mamario (utilizaron idéntico método de análisis -MS-MLPA- y el mismo kit de metilación para analizar los 24 TSG) y determinaron que en el tejido

tumoral, al considerar el porcentaje de metilación hallado en el promotor, los genes RASSF1, APC, CDH13 y GSTP1 se encontraban dentro del grupo que clasificaron como muestras con alto grado de metilación. Nuestros resultados fueron similares, ya que también determinamos un elevado nivel de metilación en 3 de los 4 genes hallados por Murria y col. [10]. Particularmente, además del trabajo citado, la presencia de hipermetilación para el gen RASSF1 también había sido informada por varios trabajos previos [18].

En la siguiente parte de la discusión, sobre metilación y su asociación con la cuantificación de genomas mitocondriales, sólo se analizarán aquellos resultados que presentan significancia funcional.

En los últimos años varios investigadores centraron sus estudios en analizar la relación entre el malfuncionamiento mitocondrial y la presencia de cambios a nivel del genoma nuclear. Con dichos trabajos en mente, formulamos la presunción de que la variación significativa de los niveles de metilación determinada entre tejido tumoral y no-tumoral, podría estar asociada o ser causada por los cambios hallados en el número de copias de genomas mitocondriales. Para evaluar dicha presunción, se analizó la posible asociación de ambos eventos mediante dos tipos de pruebas estadísticas de correlación.

El estudio de tipo categórico da como resultado la existencia de asociación significativa para mir-200a, indicando que un bajo número de genomas de ADNmt estaría asociado con una reducción del grado de metilación para su promotor. Nuestro resultado es similar al publicado por el grupo de Castilla y col. [2]. En dicho trabajo, analizando modelos de cultivo celular in vitro de carcinomas mamarios, encontraron que se producía una transición celular espontánea desde tejido epitelial hacia mesenquimal (EMT), acompañada por una baja expresión de los miembros de la familia mir-200, causada por la metilación aberrante de su promotor. Esto estaría asociado al rol de los mir-200 en la regulación de la expresión de ARNm para genes asociados al evento de EMT, tales como SNAIL1/2 y ZEB1/2. Esto significa que el probable papel de la organela citoplasmática en la regulación del grado de metilación del mir-200a y, en consecuencia, de su nivel de expresión, podría tener un rol relevante dentro del proceso tumoral; específicamente, evitando la transición o invasión de células tumorales hacia tejido circundante. Nuevos estudios serían necesarios para dar una conclusión definitiva sobre los resultados preliminares encontrados para mir-200a en muestras de cáncer de mama.

Por otra parte, en relación a los genes TSG estudiados, el estudio estadístico categórico dio un resultado relevante para RASSF1. En este caso el análisis señala que el bajo contenido de ADNmt estaría asociado con un aumento del nivel de metilación para su promotor; es decir, una disminución en la cantidad de genomas mitocondriales actuaría como un factor de riesgo. El silenciamiento epigenético del gen RASSF1 en tumores mamarios está ampliamente documentado en la literatura [10]. Además, se sabe que un elevado nivel de metilación en el promotor del gen RASSF1 se asocia con una probabilidad alta de desarrollar aberraciones en el número de copias génicas en tumores mamarios [10]. En resumen, nuestros resultados para el gen RASSF1 concuerdan con los hallados en la literatura y nos permiten confirmar que la presencia de alteraciones en el grado de metilación sobre el promotor es un evento frecuente en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama. Finalmente, dichos resultados en conjunto nos permiten proponer a la disfuncionalidad de la mitocondria -cambios en su contenido genómico- como el evento celular que estaría asociado con la ocurrencia del silenciamiento por metilación del gen RASSF1 hallado frecuentemente en el desarrollo tumoral del tejido mamario. Este podría ser una causa única y directa de interrelación o formar parte de un conjunto de variables celulares que derivarían en dicha modificación epigenética. Futuras investigaciones dirigidas a profundizar los estudios presentados en el presente trabajo, como por ejemplo estudiar en paralelo la presencia de disfuncionalidad mitocondrial y alteración de la expresión para RASSF1 a nivel de ARN, permitirían arribar a un resultado definitivo y concluyente sobre la asociación propuesta.

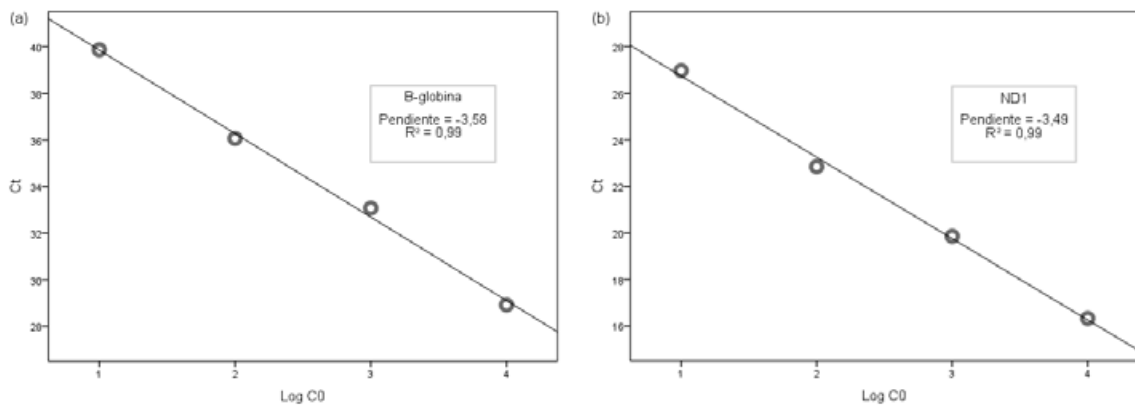
En resumen, estudiando muestras de pacientes argentinas con carcinoma mamario, se determinó el número relativo de copias de genomas mitocondriales y la presencia de alteraciones en los niveles de metilación en promotores génicos para un grupo de miRNA y TSG; logrando establecer por primera vez la posible asociación entre ambos eventos celulares. Futuras investigaciones que permitan ampliar los conocimientos en esta área de estudio permitirían arrojar mayor claridad a las asociaciones propuestas para ambos eventos hallados frecuentemente en el proceso tumoral humano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1276-87.
2. Castilla MA, Diaz-Martin J, Sarrio D, Romero-Perez L, López-García MA, Vieites B, et al. MicroRNA-200 family modulation in distinct breast cancer phenotypes. *PLoS ONE* 2012; 7:e47709.
3. Ferreira ID, Rosário VE, Cravo PV. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2006; 5: 1.
4. Hsu PY, Deatherage DE, Rodriguez BA, Liyanarachchi S, Weng YI, Zuo T, et al. Xenoestrogen-induced epigenetic repression of microRNA-9-3 in breast epithelial cells. *Cancer Res* 2009; 69(14):5936-45.
5. Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer (sitio en internet). Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>. Acceso el 10 de febrero de 2015.
6. Kim J-H, Kim HK, Ko J-H, Bang H, Lee DC. The Relationship between Leukocyte Mitochondrial DNA Copy Number and Telomere Length in Community-Dwelling Elderly Women. *PLoS ONE* 2013; 8(6): e67227.
7. Lee SH, Chung DJ, Lee HS, Kim TJ, Kim MH, Jeong HJ, et al. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood in polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 2011; 60(12):1677-82.
8. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:3927-37.
9. Modica-Napolitano JS, Kulawiec M, Singh KK. Mitochondria and Human Cancer. *Current Molecular Medicine* 2007; 7:121-131.
10. Murria R, Palanca S, de Juan I, Egoavil C, Alenda C, García-Casado Z, et al. Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer. *American journal of cancer research* 2015; 5(1):375-85.
11. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences *Nucleic Acids Res* 2005;33 (14): e128.
12. Pavicic W, Perkio E, Kaur S, Peltomaki P. Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol Med* 2011; 17:726-35.
13. Pavicic WH, Cané L, Besada L, Richard SM, Peltomäki P, Bolzán AD. Alteración en Niveles de Metilación de Genes Nucleares Asociados a la Carcinogénesis: su correlación con la Inestabilidad Genómica Mitocondrial en Tumores Mamarios Humanos. XV Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, Dic 2013, Argentina.
14. Pavicic, WH. Inestabilidad del genoma mitocondrial y correlación con genotipos de genes xenobióticos en cáncer de mama (tesis doctoral). Argentina: Universidad Nacional de Quilmes; 2011.
15. Radpour R, Fan AX, Kohler C, Holzgreve W, Zhong XY. Current understanding of mitochondrial DNA in breast cancer. *Breast J.* 2009; 15:505-9.
16. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31:27-36.
17. Shen J, Platek M, Mahasneh A, Ambrosone CB, Zhao H. Mitochondrial copy number and risk of breast cancer: a pilot study. *Mitochondrion* 2009; 10:62-8.
18. Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:2156-2162.
19. Singh KK. *Mitochondrial DNA Mutations in Aging, Disease and Cancer*. Springer 1998, New York, NY.
20. Smiraglia DJ, Kulawiec M, Bistulfi GL, Gupta SG, Singh KK. A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus. *Cancer Biol Ther.* 2008; 7:1182-90.
21. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Molecular Oncology* 2012; 6(6):567e578.
22. Wang D, Su LY, Zhang AM, Li YY, Li XA, Chen LL, et al. Mitochondrial DNA Copy Number, but Not Haplogroup, Confers a Genetic Susceptibility to Leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Plos One* 2012; 7(6):e38848.
23. Xu Q, Jiang Y, Yin Y, Li Q, He J, Jing Y, et al. A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1. *J Mol Cell Biol* 2013; 5:3-13.
24. Yu M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sciences* 2011; 89:65-71.
25. Yu M, Zhou Y, Shi Y, Ning L, Yang Y, Wei X, et al. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life* 2007; 59: 450-457.

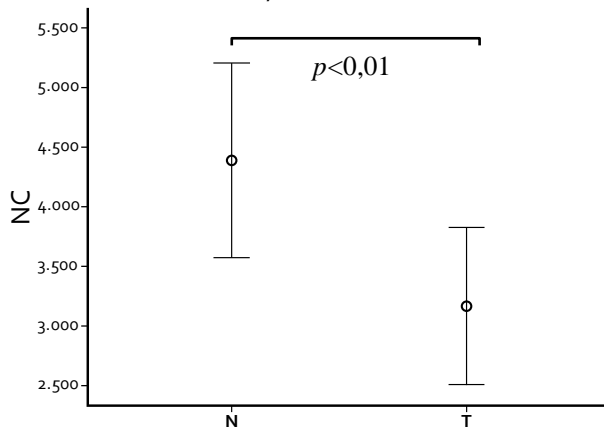
**ANEXO**

**Figura 1:** Rectas de eficiencia de la reacción de qPCR.



Relación lineal entre el *threshold cycle number* (Ct) y el logaritmo de la concentración de ADN inicial. (a) se amplificó el gen  $\beta$ -globina, ecuación de la recta  $y = -3,5837x + 47,025$ ,  $R^2 = 0,996$ . (b) curva para el gen ND1, la ecuación de la recta es  $y = -3,4945x + 33,735$ ,  $R^2 = 0,996$ .

**Figura 2:** Diagrama del número de copias relativo de ADNmt (NC sobre el eje Y) en el grupo de muestras tumorales (T) y no-tumorales (N).



Se indica el valor de la media (círculo en negro) y las barras de error corresponden a los valores para el intervalo de confianza (CI, 95%), ver tabla 1. El valor de  $p$  denota la diferencia significativa de la comparación del valor de media entre cada tejido, calculado con test de Wilcoxon.

**Figura 3:** Variación de ADNmt entre tejidos.

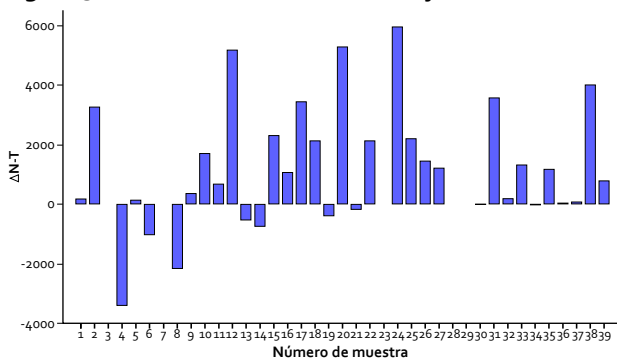
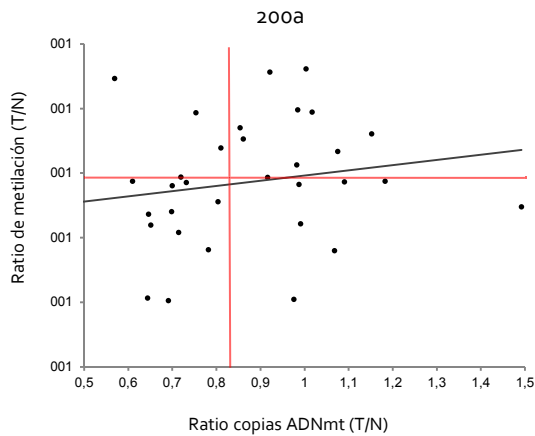


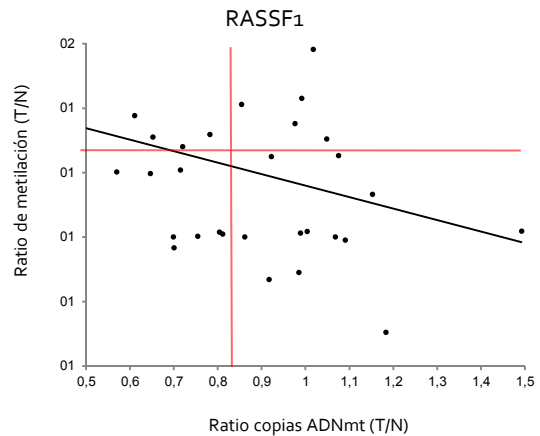
Gráfico de barras que muestra la diferencia del número de copias relativo de ADNmt entre cada muestra de tejido no-tumoral (N) y su contraparte tumoral (T).

**Figura 4:** Gráficos de dispersión del ratio T/N transformado.

(a)



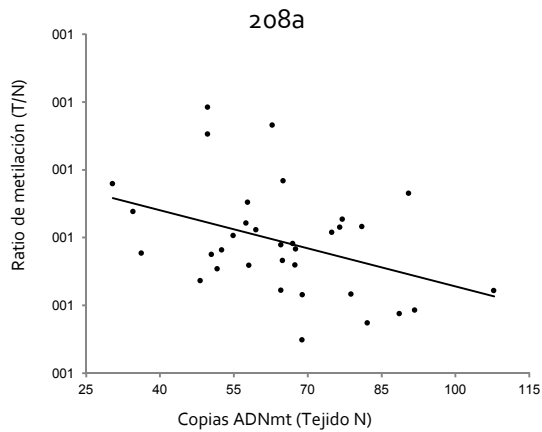
(b)



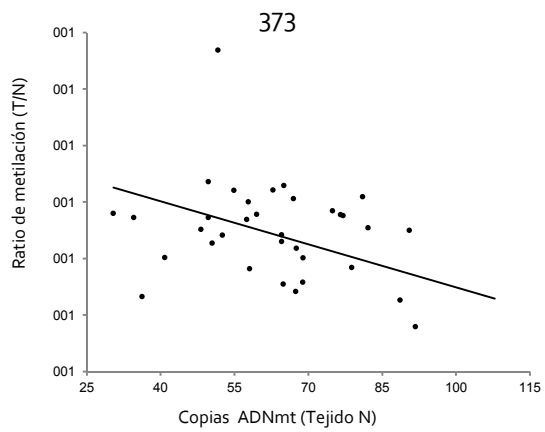
1- correlación entre la variable de ratio para número de copias de ADNmt (eje x) y el ratio para el grado de metilación (eje y). Datos para los genes miR-200a (a) y RASSF1 (b). La línea gris representa la línea de tendencia de correlación o asociación entre los puntos de ambos eje. 2- También se grafican los cuadrantes categóricos. Utilizando los valores de ratio T/N transformados, ambas variables se clasificaron según el valor de mediana (tabla 4: Valores de mediana del ratio T/N transformado correspondiente a metilación y NC de ADNmt). Esto dividió a las variables en ratio T/N bajo o alto, determinando las cuatro fracciones para la tabla de contingencia. La línea roja horizontal y vertical representa el valor de la mediana para cada eje y delimitan las cuatro secciones, estableciendo la cantidad de casos que caen en cada una de ellas.

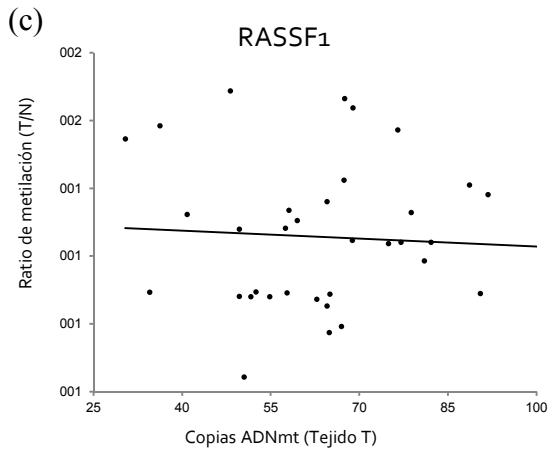
Figura 5: Gráficos de dispersión del número de copias de ADNmt versus el ratio de metilación (T/N).

(a)



(b)





**Figuras a y b:** el eje horizontal (x) representa el número de copias de ADNmt en tejido no-tumoral únicamente (tejido N), y el eje vertical (y) el ratio de metilación (T/N). En cada figura, se muestra la línea de tendencia para la asociación entre ambos datos. **Figura c:** el eje horizontal (x) representa el número de copias de ADNmt en tejido tumoral únicamente (tejido T).

**Tabla 1:** Media, intervalo de confianza del 95% (CI 95%) y mediana del número de copias relativo de ADNmt de las muestras tumorales y no-tumorales.

Tejido	Media	CI 95%		Mediana
		mín	Máx	
No-tumoral	4392	3599	5185	4168
Tumoral	3091	2491	3690	2452

**Tabla 2:** Análisis de metilación en miRNA y TSG

		Media $\pm$ SD <sup>a</sup>		N vs. T
		N	T	$p^b$
miRNA	124-1	0,05 $\pm$ 0,12	0,20 $\pm$ 0,2	<b>&lt; 0,0001</b>
	124-2	0,20 $\pm$ 0,15	0,40 $\pm$ 0,18	<b>&lt; 0,0001</b>
	124-3	0,06 $\pm$ 0,12	0,22 $\pm$ 0,24	<b>&lt; 0,0001</b>
	1-1	0,03 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,21	0,21
	148 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,07	0,09 $\pm$ 0,14	<b>&lt; 0,001</b>
	152	0,01 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,13	<b>&lt; 0,001</b>
	18bl	0,5 $\pm$ 0,08	0,52 $\pm$ 0,13	0,14
	200 <sup>a</sup>	0,72 $\pm$ 0,09	0,70 $\pm$ 0,13	0,42
	208 <sup>a</sup>	0,86 $\pm$ 0,14	0,79 $\pm$ 0,13	<b>&lt; 0,0001</b>
	373	0,74 $\pm$ 0,17	0,63 $\pm$ 0,25	<b>&lt; 0,0001</b>
TSG	RASSF1	0,26 $\pm$ 0,14	0,51 $\pm$ 0,10	<b>&lt; 0,0001</b>
	APC	0,12 $\pm$ 0,08	0,27 $\pm$ 0,12	<b>&lt; 0,0001</b>
	CDH13	0,09 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,04	<b>&lt; 0,0001</b>

<sup>a</sup>, SD: Desviación estándar; <sup>b</sup>, valor calculado con Test de Wilcoxon, resultados N vs. T significativos en negrita.

**Tabla 3:** Análisis comparativo entre número de genomas mitocondriales y grado de metilación.



		Correlación de Spearman <sup>a</sup>						Test Exacto de Fisher <sup>b</sup>			
		Ratio T/N ADNmt vs. Ratio T/N Met <sup>c</sup>		Ratio T/N Met vs. ADNmt <sup>d</sup>				Ratio T/N ADNmt vs. Ratio T/N Met <sup>e</sup>			
		rho <sup>f</sup>	<i>p</i> <sup>g</sup>	N		T		Mid- <i>P</i> <sup>h</sup>	OR <sup>i</sup>		
				rho	P	rho	p				
miRNA	124	1	-0,6	0,75	-0,18	0,30	-0,20	0,23	0,44	0,90 [0,22-3,63]	
		2	-0,03	0,87	-0,29	0,09	-0,33	0,05	0,21	0,56 [0,13-2,26]	
		3	-0,21	0,23	0,04	0,84	-0,26	0,17	0,31	0,70 [0,17-2,83]	
		200a		0,18	0,32	-0,21	0,23	-0,01	0,95	<b>0,03</b>	0,25 [0,05-1,11]
		208a		0,28	0,12	-0,40	<b>0,02</b>	-0,03	0,87	0,31	0,70 [0,17-2,84]
		373		0,23	0,20	-0,43	<b>0,01</b>	-0,17	0,31	0,46	1,05 [0,25-4,55]
TSG	APC		0,13	0,48	-0,05	0,76	-0,04	0,80	0,12	0,41 [0,09-1,76]	
	RASSF1		-0,30	0,09	-0,06	0,72	-0,36	<b>0,03</b>	0,09	2,54 [0,63-11]	
	CDH13		-0,10	0,56	-0,09	0,59	-0,20	0,24	0,50	1,00 [0,25-4]	

*a*, calculado con SPSS; *b*, calculado con Epi Info 7; *c*, análisis comparativo para el ratio T/N de, ADNmt: nro. de copias genoma mitocondrial y Met: metilación; *d*, análisis comparativo para Ratio T/N de metilación versus nro. de copias genómicas (ADNmt) en tejido no-tumoral adyacente (N) y tumoral (T); *e*, se categorizaron los datos y se analizaron mediante tablas de contingencia 2 x 2; *f*, coeficiente rho para el test de Spearman; *g*, el valor de *p* se indica en negrita y cursiva para los valores significativos menores o iguales a *p*:0,05 (únicamente en cursiva aquellos valores cercanos al límite de significancia); *h*, Mid-*P*, corresponde al valor de significancia (se usa la misma denotación que en el indicador *g*); *i*, se indica el valor de OR o Odd Ratio y entre corchetes se muestran los valores extremos del intervalo de confianza.

**Tabla 4:** Valores de mediana del ratio T/N transformado correspondiente a metilación (Genes) y nro. copias genoma mitocondrial (ADNmt).

Variable	Mediana <sup>a</sup>
124-1	1,042
124-2	1,148
124-3	1,044
200 <sup>a</sup>	0,992
Genes 208 <sup>a</sup>	0,974
373	0,953
APC	1,000
RASSF1	1,204
CDH13	1,023
ADNmt nro. copias	0,858

# LOS EFECTOS PROLIFERATIVOS DE LOS PROGESTÁGENOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA REQUIEREN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE LA METIL-TRANSFERASA DE HISTONAS EZH2

**Mauro Ezequiel Cenciarini**

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

**Director:** Cecilia Jazmín Proietti

## RESUMEN

Las funciones biológicas del receptor de progesterona (RP) y de EZH2 están asociadas al desarrollo del cáncer de mama. Recientemente se demostró en el laboratorio una relación funcional entre ambas proteínas para regular negativamente al supresor tumoral GATA3 e inducir la proliferación de células de cáncer de mama hormono-dependientes. En este trabajo demostramos que la proliferación de las células de cáncer de mama T47D inducida por el progestágeno acetato de medroxiprogesterona (MPA) es prevenida por el silenciamiento de EZH2, y que el efecto proliferativo de las células parecería depender de un aumento en la actividad de EZH2 y no simplemente de la sobre-expresión de la misma. Además, observamos que el tratamiento de las células con MPA induce cambios en la expresión de EZH2, en su fosforilación en el residuo de treonina 487, y en su actividad catalítica de tri-metilar la lisina 27 de la histona H3. Este estudio sugiere que los efectos proliferativos inducidos por la activación del RP por MPA en células tumorales mamarias son mediados por la represión génica en una manera dependiente de EZH2, y propone que el bloqueo de la actividad de EZH2 podría ser una terapia novedosa contra el cáncer de mama hormono-dependiente.

## ABSTRACT

The biological functions of the progesterone receptor (PR) and EZH2 are associated to breast cancer development. Our laboratory has recently demonstrated a functional relationship between these proteins to downregulate the tumor suppressor GATA3 and induce hormone-dependent breast cancer cell proliferation. In this study, we demonstrated that medroxiprogesterone acetate (MPA)-induced breast cancer cell proliferation is prevented by EZH2 silencing, and that this cell proliferative effect depends on activation of EZH2 instead of on its simple over-expression. Moreover, we observed that MPA treatment on these cells triggers changes in EZH2 expression, in the phosphorylation levels of its 487 threonine residue, and in the tri-methylation of lysine 27 of histone H3. This study suggests that the proliferative effects of MPA-induced PR activation are regulated by EZH2-mediated gene repression, and gives insight into a novel therapy based on inhibition of EZH2 activity in hormone dependent breast cancer.

## INTRODUCCIÓN

Según la última estimación de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud en 2012, el cáncer de mama (CM) es el tipo de cáncer de mayor incidencia a nivel mundial. Según el Ministerio de Salud, el cáncer de mama representa en Argentina el tipo de cáncer de mayor incidencia, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres, y la primera causa de muerte por cáncer, con una tasa estandarizada de mortalidad (TEM) de 18.0 por cada 10000 mujeres.

Existe una gran cantidad de evidencia experimental y clínica que apunta hacia el receptor de progesterona (RP) como un importante promotor de la carcinogénesis y la progresión tumoral mamaria. La exposición acumulativa y mantenida a hormonas esteroides ováricas está asociada a un incremento en el riesgo del desarrollo del CM [1]. En efecto, se ha demostrado que los progestágenos inducen la proliferación de líneas celulares de CM *in vitro* [2, 3], y promueven el crecimiento tumoral *in vivo* inducido por el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) en el modelo de

carcinogénesis mamaria C<sub>4</sub>HD que expresa el receptor de estrógenos (RE) y el RP [4]. Observaciones clínicas, como también el ensayo extensivo, aleatorio y controlado de *Women's Health Initiative*, revelaron que las mujeres posmenopáusicas que llevan a cabo una terapia de reemplazo hormonal de estrógenos y progestágenos combinados sufren una mayor incidencia de CM que las mujeres que reciben únicamente estrógenos [5, 6]. Al momento del diagnóstico, más del 70% de los cánceres de mama pertenecen al subtipo luminal, es decir que expresan tanto el RE como el RP. Sobre la base de la presencia del RE, las pacientes son tratadas con terapias endócrinas que involucran moduladores selectivos del RE, como el tamoxifeno, o la privación hormonal. Sin embargo, aproximadamente un tercio de las pacientes tratadas son resistentes a la terapia endócrina. Estos descubrimientos apuntan hacia la existencia de un participante hormonal adicional en el escenario del CM, el RP, quien podría tomar control del crecimiento y progresión tumoral. Es indispensable, por lo tanto, determinar los mecanismos moleculares y los procesos biológicos que son mediados por el RP en el CM, de modo de desarrollar terapias novedosas y más personalizadas que impidan el crecimiento y la progresión de tumores mamarios, que superen la resistencia a las terapias hormonales actuales, y que disminuyan así la mortalidad asociada al CM.

La alteración de la expresión génica es una característica común en el desarrollo del cáncer, adjudicada normalmente a mutaciones de genes supresores tumorales claves, como las del gen BRCA [7]. Sin embargo, avances recientes en el campo de la epigenética sugieren que alteraciones en la actividad de modificadores epigenéticos (metiltransferasas de histonas, acetilasas, metilasas de ADN, etc.) dan como resultado una desregulación global de la expresión de los genes blanco, incluyendo oncogenes y supresores tumorales [8]. En particular, la participación de la metiltransferasa de histonas *Enhancer of Zeste Homolog 2* (EZH2) ha sido implicada en una variedad de cánceres, incluyendo los de mama [9, 10]. EZH2 es la subunidad catalítica del *Polycomb Repressor Complex 2* (PRC2), que promueve la trimetilación de la lisina 27 de la histona H<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>K27me<sub>3</sub>), una modificación de histonas asociada a la compactación de la cromatina y a la represión transcripcional [11, 12].

Los receptores nucleares, como el RP, pueden unirse al ADN y funcionar como factores de transcripción reclutando un grupo específico de coreguladores dependiendo del contexto celular. La mayoría de la investigación actual se enfoca en la habilidad del RP para inducir la transcripción génica. Sin embargo, nuestro laboratorio diseccionó recientemente los mecanismos por los cuales el supresor de tumores GATA<sub>3</sub> es reprimido tras el tratamiento con progestágenos en células de CM, en una manera dependiente del RP [13]. En efecto, se describe el requerimiento del dominio de unión al ADN del RP para reclutar a EZH2 a un elemento respondedor a progesterona (PRE) río arriba del gen de GATA<sub>3</sub> tras el tratamiento con MPA, promoviendo la compactación de la cromatina y la represión transcripcional a través del aumento de H<sub>3</sub>K27me<sub>3</sub>. Además, se demuestra que tras el tratamiento con MPA, el RP y el EZH2 co-inmunoprecipitan [13], sugiriendo una interacción funcional entre ambas proteínas. Se observa también que la regulación negativa de GATA<sub>3</sub> es requerida para la proliferación celular *in vitro* y para el crecimiento tumoral *in vivo* inducido por progestágenos [13]. Por lo tanto, la represión de la expresión génica es una característica clave en los efectos mediados por el RP en el CM.

En efecto, una relación funcional entre EZH2 y el RP en el desarrollo de la glándula mamaria fue sugerida por un estudio que demuestra que durante la preñez en ratones, los niveles de EZH2 aumentan en la glándula mamaria normal y se correlacionan con un incremento en los niveles séricos de progesterona [14]. Adicionalmente, ratones *knock-out* condicionales para EZH2 no presentan un desarrollo normal de las glándulas mamarias [14]. Sin embargo, es necesario un mecanismo más detallado de las acciones concertadas entre el RP y EZH2 para entender el requerimiento de tal interacción, y su requerimiento para los efectos biológicos mediados por el RP en el CM.

Dadas las evidencias antes descritas, suponemos que los efectos pro-tumorigénicos de los progestágenos en el cáncer de mama luminal son mediados a través de la represión génica en una manera dependiente de EZH2. Se propone que tras el tratamiento con progestágenos, el RP actúa a través de EZH2, reclutando a la metiltransferasa a diferentes *loci* específicos de modo de lograr el crecimiento de los tumores mamarios. En este trabajo se demuestra que, en efecto, la proliferación de las células de cáncer de mama T<sub>47</sub>D inducida por el MPA es prevenida por el silenciamiento de EZH2, y que el efecto proliferativo de estas células parecería depender de un aumento en la actividad de EZH2 y no simplemente de la sobre-expresión de la misma. Además, se observa que el tratamiento de las células con MPA induce cambios en la expresión de EZH2, en su fosforilación en el residuo de treonina 487, y en su actividad catalítica de tri-metilar la lisina 27 de la histona H<sub>3</sub>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Reactivos.** El MPA, RU486 (mifepristona) y el “*Dulbecco’s Modified Eagle medium*” (DMEM) fueron adquiridos de Sigma Aldrich (Saint Luis, MO, USA). El reactivo de transfección XtremeGENE HP fue adquirido de Roche Biochemicals y fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para utilizar el MPA en los ensayos, se preparó una solución madre 10 mM (1000X de la solución de uso: 10 nM) en etanol absoluto, para su posterior dilución en medio de cultivo. La concentración final de etanol no excedió el 0,1 % v/v y no afectó ni el crecimiento ni la morfología celular [15]. El antagonista del receptor de progesterona, RU486 (mifepristona), fue comprado a Sigma y se utilizó en una concentración de 10 nM disuelto en etanol.

**Líneas celulares y tratamiento.** Todos los ensayos realizados en este trabajo se realizaron con la línea celular de cáncer de mama humano T47D, adquirida de la *American Type Culture Collection* y mantenida en DMEM-F12 + suero fetal bovino (SFB) 10% v/v. La línea celular T47D expresa el RP y GATA3. La línea celular se ayunó durante 24 h y los experimentos se llevaron a cabo en DMEM-F12 sin rojo fenol. En los casos en los que se utilizó el inhibidor RU486, el mismo fue preincubado 30 minutos antes del tratamiento con MPA y luego se mantuvieron en el medio de cultivo junto con el mitógeno. El SFB fue adquirido a Gen S.A. (Buenos Aires, AR) y se deconplementó calentándolo a 56°C durante 30 minutos.

**Ensayos de Western Blot.** Se prepararon extractos proteicos de células tratadas como se indica en cada experimento y 25 µg fueron resueltos por SDS-PAGE como se describió anteriormente [13]. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y fueron incubadas con los anticuerpos descriptos en cada experimento. El revelado se realizó con el reactivo de luminiscencia Enhanced Chemiluminescence Prime (GE Healthcare) y las imágenes se obtuvieron con el equipo G-Box (Syngene). Se realizó la cuantificación con el programa ImageJ.

**Anticuerpos utilizados.** Los siguientes anticuerpos fueron utilizados: GATA3 (5852S, Cell Signaling), GAPDH (D16H11, Cell Signaling), β-tubulina (Sigma Aldrich), H3K27me3 (ab6002, Abcam), H3 (Abcam), EZH2 (#39933, Active Motif), pT487-EZH2 (Abcam).

**Transfecciones con ARN corto de interferencia (siRNA).** El ARN cortos de interferencia específico para EZH2 (siRNA-EZH2) se compró a Dharmacon (Lafayette, CO, USA) y sus secuencias se detallan a continuación: 5'-UAACGGUGAUCACAGGAUA-3'. Como siRNA control (siRNA-Mock) se utilizó un siRNA que no corresponde a ninguna secuencia conocida de genes de mamíferos, también adquirido en Dharmacon. Las células fueron transfectadas durante 48 h con la concentración de siRNA indicada, utilizando el reactivo de transfección DharmaFECT (Dharmacon) siguiendo las indicaciones del fabricante.

**Plásmidos.** Los vectores de expresión que codifican para EZH2 y para EZH2-Y641N como proteínas de fusión a FLAG en el vector pRetroX-IRES-ZsGreen1 fueron donados generosamente por el Laboratorio del Dr. Ari Melnik, de Weill Cornell Medical College.

**Ensayos de proliferación.** Para realizar los ensayos de proliferación, se sembraron  $1 \times 10^4$  células por hoyo en placas de 96 hoyos y se las dejaron adherir durante 24 h en DMEM-F12 + SFB 10% v/v. Las células fueron transfectadas con los diferentes vectores de expresión o siRNAs y tratadas, según se describe en cada experimento. Todos los ensayos se realizaron por octuplicado. La proliferación celular fue evaluada por incorporación de 1 µCi de [3H]-timidina (New England Nuclear, actividad específica: 20 Ci/mmol) como se describió anteriormente [13].

## RESULTADOS

### ***La expresión de EZH2 es necesaria para la proliferación celular inducida por progestágenos.***

En el presente trabajo utilizamos la línea celular de cáncer de mama humano T47D que responde a progestágenos [13]. Como se comentó anteriormente, el aumento de la proliferación celular

inducida por MPA en las células T<sub>47</sub>D depende de la regulación negativa de GATA<sub>3</sub>, y esto es acompañado por el reclutamiento de EZH<sub>2</sub> y un aumento de H<sub>3</sub>K<sub>27</sub>me<sub>3</sub> en el promotor del gen [13]. El primer objetivo fue analizar el requerimiento de la expresión de EZH<sub>2</sub> para este aumento de la proliferación celular. Para este fin, se transfectaron células T<sub>47</sub>D transitoriamente con un RNA corto de interferencia (siRNA) específico contra el mRNA de EZH<sub>2</sub> (siRNA-EZH<sub>2</sub>) durante 48 h en medio DMEM 10% SFB, de modo de inhibir la expresión de la proteína. Las células fueron luego hambreadas en medio DMEM por 24 h y tratadas posteriormente con MPA 10 nM durante 24 h (Figura 1). Como control negativo del silenciamiento se utilizó un siRNA inespecífico que no se une a ningún mRNA humano (siRNA-Mock). La proliferación celular se analizó por conteo de emisión de radioactividad, adicionando [<sup>3</sup>H]-timidina durante las últimas 18 h del tratamiento con MPA. En efecto, encontramos que el silenciamiento de EZH<sub>2</sub> previene el aumento de la proliferación celular inducido por MPA (Fig. 1A), sugiriendo un rol clave de EZH<sub>2</sub> en los efectos proliferativos del MPA en las células de cáncer de mama. Comprobamos, por un ensayo de Western Blot (WB) de extractos proteicos de células T<sub>47</sub>D tratadas con MPA como se explicó antes, que la transfección del siRNA-EZH<sub>2</sub> reduce los niveles de expresión de EZH<sub>2</sub> y los niveles globales de H<sub>3</sub>K<sub>27</sub>ME<sub>3</sub> (Fig. 1B).

#### ***La activación del RP por MPA modula los niveles proteicos de EZH<sub>2</sub> y su fosforilación en Thr<sub>487</sub>.***

La sobre-expresión de EZH<sub>2</sub> se evidenció en una variedad de tipos de cáncer de mama en humanos [16]. Por otro lado, se han descrito diversos residuos de EZH<sub>2</sub> que son modificados por fosforilación [17]. En particular, un trabajo muestra una relación positiva entre los niveles globales de H<sub>3</sub>K<sub>27</sub>me<sub>3</sub> y los niveles de fosforilación de EZH<sub>2</sub> en el residuo de treonina 487 (pT<sub>487</sub>-EZH<sub>2</sub>) durante el desarrollo de la glándula mamaria normal en ratones [14], sugiriendo que EZH<sub>2</sub> podría estar siendo activada por fosforilación en este tejido. Decidimos entonces explorar la regulación transcripcional y postraduccional de EZH<sub>2</sub> por MPA en células de cáncer de mama. Con este objetivo, células T<sub>47</sub>D fueron hambreadas por 24 h y luego tratadas con MPA 10 nM durante distintos tiempos (Figura 2). Luego del tratamiento, se levantaron las células y se aisló la fracción proteica para realizar WB contra EZH<sub>2</sub> (Fig. 2A) y pT<sub>487</sub>-EZH<sub>2</sub> (Fig. 2B). Observamos que la activación del RP por MPA induce un aumento en la expresión de EZH<sub>2</sub> durante las primeras horas de tratamiento, manteniéndose hasta las 12 h, luego de lo cual los valores disminuyen (Fig. 2A). Los niveles de pT<sub>487</sub>-EZH<sub>2</sub> aumentan a la hora y luego disminuyen a niveles menores que los de la fosforilación basal (Fig. 2B). Estos resultados sugieren que los progestágenos podrían regular la expresión y la fosforilación de EZH<sub>2</sub> en las células de cáncer de mama. Los efectos observados fueron prevenidos por el pre-tratamiento con el antiprogestágeno mifepristona (RU<sub>486</sub>), demostrando el requerimiento de la activación del RP clásico.

Para explorar si los efectos en la expresión y fosforilación de EZH<sub>2</sub> inducidos por MPA tuvieron algún efecto en la actividad del PRC<sub>2</sub>, se analizaron los niveles globales de H<sub>3</sub>K<sub>27</sub>me<sub>3</sub> por WB tras el tratamiento de células T<sub>47</sub>D con MPA, como fue descrito anteriormente (Figura 3). Se halló que la activación del RP por MPA produjo cambios en los niveles globales de H<sub>3</sub>K<sub>27</sub>me<sub>3</sub> a diferentes tiempos (Fig. 3A), aunque no en un patrón similar a las variaciones de EZH<sub>2</sub> o pT<sub>487</sub>-EZH<sub>2</sub>; parecerían oscilar entre el nivel basal y niveles mayores, con un máximo encontrado luego de 2 h de tratamiento con el progestágeno. La Fig. 3B muestra los valores de H<sub>3</sub>K<sub>27</sub>me<sub>3</sub> relativos a la histona H<sub>3</sub> total y al control. El RU<sub>486</sub> fue utilizado en los tiempos en donde el MPA no reguló la trimetilación (se observaron aumentos pequeños), y para demostrar que el aumento de la trimetilación a las 2 h fue por MPA, se debería haber probado el antiprogestágeno a ese tiempo. Estos resultados sugieren que los progestágenos regulan la actividad del PRC<sub>2</sub> en células de cáncer de mama, aunque será necesario analizar en mayor detalle qué mecanismos están involucrados en este proceso.

#### ***La expresión de una isoforma constitutivamente activa de EZH<sub>2</sub> (EZH<sub>2</sub>-Y641N) indujo un aumento en la proliferación celular.***

Para analizar si la activación de EZH<sub>2</sub> era suficiente para inducir un aumento de la proliferación celular en ausencia de MPA, se transfectaron células T<sub>47</sub>D transitoriamente con un vector (pRetroX-IRES-ZsGreen1) que expresa una isoforma mutante de EZH<sub>2</sub> que presenta actividad constitutiva. Esta variante, denominada EZH<sub>2</sub>-Y641N, posee una mutación puntual que produce el cambio del residuo de tirosina (Y) 641 a asparagina (N) [18, 19]. También fue transfectado un vector que expresa la forma salvaje de EZH<sub>2</sub>, EZH<sub>2</sub>-wt. Ambas proteínas se expresaron como proteínas de fusión al polipéptido

FLAG que puede ser reconocido por un anticuerpo específico. Las transfecciones se realizaron en medio DMEM durante 48 h, luego del cual las células se trataron con [<sup>3</sup>H]-timidina durante 18 h (Figura 4). Notablemente, se halló que si bien la sobre-expresión de EZH2-wt no indujo un aumento de la proliferación celular, sí lo hizo la sobre-expresión de la isoforma constitutivamente activa (Fig. 4A). Esto sugiere que no es la sobre-expresión per se de EZH2, sino el aumento de su actividad, lo que promovería el aumento de la proliferación en la línea celular T47D. La Fig. 4B evidencia la expresión de EZH2-wt y EZH2-Y641N mediante un ensayo de WB, utilizando un anticuerpo específico contra el péptido FLAG fusionado a ellas.

## DISCUSIÓN

La participación del receptor de progesterona en la progresión del cáncer de mama ha sido bien demostrada [1-6]. Sin embargo, queda mucho por elucidar sobre los mecanismos a través de los cuales actúa para promover esta enfermedad. En particular, se ha observado que la incubación de células de cáncer de mama humano T47D con MPA induce un aumento en la proliferación celular, de manera dependiente del RP [20]. En este trabajo se demuestra que esta inducción en la proliferación celular por MPA depende de la expresión de EZH2 (Fig. 1), sugiriendo que la participación de esta proteína es clave en los mecanismos por los cuales el MPA promueve el crecimiento tumoral. Notablemente, estos resultados demuestran una función poco estudiada del RP, la de reprimir la expresión génica. Estos resultados concuerdan con la regulación negativa de GATA3 por MPA en células T47D, evento necesario para inducir la proliferación celular [13]. GATA3 está involucrado en el desarrollo de la glándula mamaria y es crucial para el mantenimiento del estado diferenciado de las células epiteliales luminales [21, 22], y su rol como un supresor tumoral en cáncer de mama ha sido establecido, en donde un incremento en la expresión de GATA3 se correlaciona con un buen pronóstico en pacientes con cáncer de mama [23-29]. Creemos entonces que la activación del RP por progestágenos promueve la represión transcripcional de genes claves que mantienen el estado no proliferativo de las células de cáncer de mama a través del direccionamiento del complejo PRC2 a PREs ubicados en los promotores de estos genes. En relación con lo descrito, ha sido demostrado que EZH2 posee un rol clave en la progresión tumoral mamaria al reprimir la expresión de E-cadherina [30], proceso esencial para la transición epitelio-mesenchimal.

Los mecanismos por los cuales las proteínas de la familia *Polycomb Group* (PcG, entre las que se encuentra EZH2) son reguladas para silenciar genes específicos dependiendo del tejido y del estadio del desarrollo aún permanecen poco claros. Entre los mecanismos por los cuales las proteínas PcG podrían ser reclutadas a los sitios blanco, se han encontrado la interacción con otras proteínas, RNA no codificantes (ncRNA), secuencias específicas de ADN (elementos respondedores al Polycomb), o variantes de histonas que regulan su asociación a la cromatina [31]. En particular, un trabajo previo de nuestro laboratorio demostró que el RP y EZH2 interactúan físicamente en células T47D tras el tratamiento con MPA [13], sugiriendo que EZH2 podría estar siendo reclutada a los genes blanco por asociación con el RP.

En el presente trabajo se intenta explorar si el MPA regula la expresión o la fosforilación de EZH2 para modificar su actividad. Se demuestra que la incubación de células T47D con MPA produce cambios en los niveles de expresión de la proteína EZH2 y en los de su fosforilación en el residuo Thr487 (Fig. 2). En particular, al compararla con células no tratadas, la cantidad de EZH2 aumenta durante las primeras horas de tratamiento y desciende luego de 48 h (Fig. 2A). Este resultado concuerda con hallazgos previos que muestran que la expresión de dos miembros del PRC2, EZH2 y EED, es controlada por los factores de transcripción E2F [32], y que la expresión de E2F es a su vez regulada por el RP en células T47D [33, 34]. Los factores de transcripción E2F están involucrados en la progresión del ciclo celular y en la síntesis de ADN. En el caso de la regulación de pT487-EZH2, el tratamiento con MPA provoca un aumento de esta fosforilación a la hora, pero luego sus niveles descienden constantemente (Fig. 2B). Notablemente, si bien los niveles descienden a tiempos más largos, el pico de aumento de pT487-EZH2 coincide con la interacción física entre el RP y EZH2 descrita previamente [13]. Fue demostrado que la fosforilación en treonina 487 de EZH2 es realizada por el complejo ciclina-Cdk1 [35], regulador del ciclo celular. Será interesante estudiar también los efectos de los progestágenos en los demás posibles sitios de fosforilación de EZH2. Por ejemplo, la fosforilación en treonina 350 (p350-EZH2) es blanco del complejo ciclina-Cdk1 y del complejo ciclina-Cdk2, y está relacionada a un aumento en la actividad

represora del PRC2 [35, 36]. La serina 21 de EZH2 (pS21-EZH2) es blanco de fosforilación por la vía PI-3K/Akt [37] (vía activada por progestágenos [3]), y esto está relacionado a una disminución de la actividad represora por el PRC2. Resta aún determinar cuáles serían los efectos de la regulación de la expresión y fosforilación de EZH2 en la actividad de la misma y en los efectos biológicos inducidos por el MPA. En este trabajo encontramos que el tratamiento de células T47D con MPA produce un aumento en los niveles globales de H3K27me3, especialmente luego de las 2 h de tratamiento (Fig. 3), sugiriendo que, en efecto, la activación del RP induce un aumento de la actividad del PRC2. Será necesario evaluar en detalle cómo se regulan estos cambios; si son los mayores niveles de pT487-EZH2 o la interacción física con el RP los que influyen en esta actividad, o si depende también del aumento de su expresión.

Se han encontrado mutaciones de EZH2 que modifican su actividad en varios tipos de cáncer [38-40], entre ellas EZH2-Y641N que presenta una actividad constitutiva [18, 19]. Notablemente, el aumento de la proliferación celular en células T47D transfectadas con EZH2-Y641N (Fig. 4) sugiere que no es la sobre-expresión *per se* de EZH2 lo que induce un aumento en la proliferación celular, sino la activación de la misma.

En conjunto, los resultados encontrados en este trabajo prueban una relación funcional entre el RP y EZH2 en el desarrollo del cáncer de mama. Otros estudios son necesarios para encontrar las vías de señalización a través de la cual esto ocurre, y qué genes pueden ser regulados negativamente por EZH2 a través del RP para modular la proliferación de los tumores. Esta información podría ser útil para el diseño de terapias novedosas contra el cáncer de mama hormono-dependiente, especialmente para las pacientes que presentan resistencia a la terapia endócrina, y sentar las bases para el uso racional de inhibidores de EZH2. Es de particular interés para la presente propuesta el hecho de que ya existen inhibidores de EZH2 que están siendo usados en ensayos clínicos [41].

Entre las perspectivas futuras en este tema, se pretende estudiar en detalle la regulación transcripcional y postraducciona de EZH2 por progestágenos, la interacción entre el RP y EZH2 —utilizando mutantes del RP en los dominios de transactivación—, así como analizar la actividad de los otros constituyentes del PRC2, como SUZ12 y EDD. Además, si es posible, se pretende realizar un estudio genómico de los posibles genes regulados tanto por el RP como por EZH2, mediante la realización de una inmunoprecipitación de la cromatina seguido de secuenciación masiva (ChIP-seq).

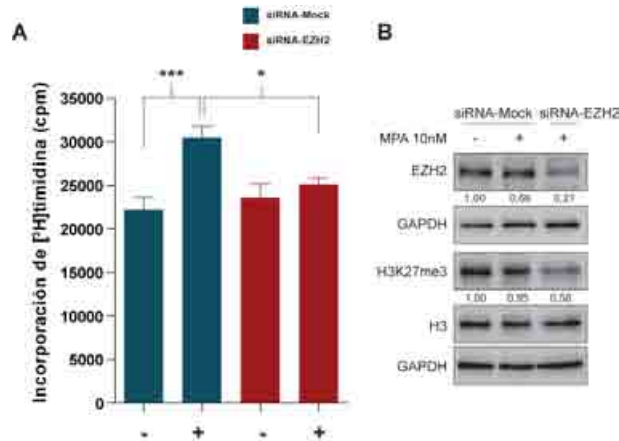
## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Henderson, B.E. y H.S. Feigelson, *Hormonal carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2000. 21(3): p. 427-33.
2. Moore, M.R., J.L. Conover, y K.M. Franks, *Progesterone effects on long-term growth, death, and Bcl-xL in breast cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 277(3): p. 650-4.
3. Carnevale, R.P., et al., *Progesterone effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways*. *Mol Endocrinol*, 2007. 21(6): p. 1335-58.
4. Kordon, E., et al., *Hormone dependence of a mouse mammary tumor line induced in vivo by medroxyprogesterone acetate*. *Breast Cancer Res Treat*, 1990. 17(1): p. 33-43.
5. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. *JAMA*, 2002. 288(3): p. 321-33.
6. Chlebowski, R.T., et al., *Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial*. *JAMA*, 2003. 289(24): p. 3243-53.
7. Chen, S. y G. Parmigiani, *Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance*. *J Clin Oncol*, 2007. 25(11): p. 1329-33.
8. Sandoval, J. and M. Esteller, *Cancer epigenomics: beyond genomics*. *Curr Opin Genet Dev*, 2012. 22(1): p. 50-5.
9. Kleer, C.G., et al., *EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(20): p. 11606-11.
10. Bachmann, I.M., et al., *EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast*. *J Clin Oncol*, 2006. 24(2): p. 268-73.
11. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. *Science*, 2002. 298(5595): p. 1039-43.
12. Cao, R. y Y. Zhang, *The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3*. *Curr Opin Genet Dev*, 2004. 14(2): p. 155-64.
13. Izzo, F., et al., *Progesterone receptor activation downregulates GATA3 by transcriptional repression and increased protein turnover promoting breast tumor growth*. *Breast Cancer Res*, 2014. 16(6): p. 491.
14. Pal, B., et al., *Global changes in the mammary epigenome are induced by hormonal cues and coordinated by Ezh2*. *Cell Rep*, 2013. 3(2): p. 411-26.
15. Dran, G., et al., *Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma*. *Breast Cancer Res Treat*, 1995. 35(2): p. 173-86.
16. Sauvageau, M. y G. Sauvageau, *Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer*. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(3): p. 299-313.
17. Caretti, G., et al., *Phosphoryl-EZH-ion*. *Cell Stem Cell*, 2011. 8(3): p. 262-5.
18. Sneeringer, C.J., et al., *Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(49): p. 20980-5.
19. Yap, D.B., et al., *Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation*. *Blood*, 2011. 117(8): p. 2451-9.
20. Saitoh, M., et al., *Medroxyprogesterone acetate induces cell proliferation through up-regulation of cyclin D1 expression via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor-kappaB cascade in human breast cancer cells*. *Endocrinology*, 2005. 146(11): p. 4917-25.
21. Kouros-Mehr, H., et al., *GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland*. *Cell*, 2006. 127(5): p. 1041-55.
22. Asselin-Labat, M.L., et al., *Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation*. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(2): p. 201-9.
23. Kouros-Mehr, H., et al., *GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model*. *Cancer Cell*, 2008. 13(2): p. 141-52.
24. Asselin-Labat, M.L., et al., *Gata-3 negatively regulates the tumor-initiating capacity of mammary luminal progenitor cells and targets the putative tumor suppressor caspase-14*. *Mol Cell Biol*, 2011. 31(22): p. 4609-22.
25. Yoon, N.K., et al., *Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer*. *Hum Pathol*, 2010. 41(12): p. 1794-801.
26. Jenssen, T.K., et al., *Associations between gene expressions in breast cancer and patient survival*. *Hum Genet*, 2002. 111(4-5): p. 411-20.
27. Mehra, R., et al., *Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis*. *Cancer Res*, 2005. 65(24): p. 11259-64.
28. Albergaria, A., et al., *Expression of FOXA1 and GATA-3 in breast cancer: the prognostic significance in hormone receptor-negative tumours*. *Breast Cancer Res*, 2009. 11(3): p. R40.



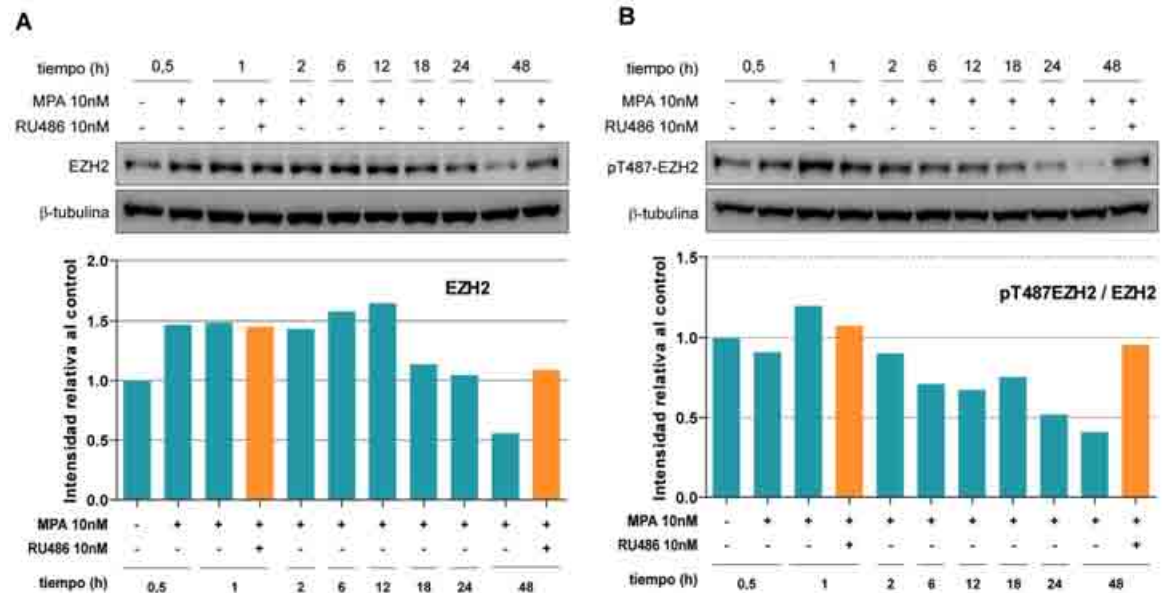
29. Ciocca, V., et al., *The significance of GATA3 expression in breast cancer: a 10-year follow-up study*. Hum Pathol, 2009. 40(4): p. 489-95.
30. Cao, Q., et al., *Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer*. Oncogene, 2008. 27(58): p. 7274-84.
31. Morey, L. and K. Helin, *Polycomb group protein-mediated repression of transcription*. Trends Biochem Sci, 2010. 35(6): p. 323-32.
32. Bracken, A.P., et al., *EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer*. EMBO J, 2003. 22(20): p. 5323-35.
33. Yin, P., et al., *Genome-wide progesterone receptor binding: cell type-specific and shared mechanisms in T47D breast cancer cells and primary leiomyoma cells*. PLoS One, 2012. 7(1): p. e29021.
34. Wade, H.E., et al., *Multimodal regulation of E2F1 gene expression by progestins*. Mol Cell Biol, 2010. 30(8): p. 1866-77.
35. Kaneko, S., et al., *Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA*. Genes Dev, 2010. 24(23): p. 2615-20.
36. Chen, S., et al., *Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2*. Nat Cell Biol, 2010. 12(11): p. 1108-14.
37. Cha, T.L., et al., *Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3*. Science, 2005. 310(5746): p. 306-10.
38. Morin, R.D., et al., *Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin*. Nat Genet, 2010. 42(2): p. 181-5.
39. Ernst, T., et al., *Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders*. Nat Genet, 2010. 42(8): p. 722-6.
40. Nikoloski, G., et al., *Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes*. Nat Genet, 2010. 42(8): p. 665-7.
41. Keilhack, H. and J.J. Smith, *Small molecule inhibitors of EZH2: the emerging translational landscape*. Epigenomics, 2015. 7(3): p. 337-41.

## ANEXO



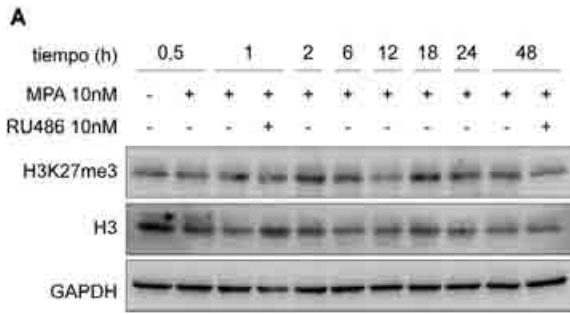
**Figura 1. La expresión de EZH2 es necesaria para la proliferación inducida por MPA de células T47D.**

**A)** Ensayo de proliferación por incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en células T47D transfectadas con los siRNA indicados (25 nM) por 48 h y luego tratados o no con MPA 10 nM por 24 h. **B)** Western blot contra EZH2, H3K27me3 y H3 de células T47D transfectadas con los siRNA indicados por 48 h y luego tratados o no con MPA 10 nM por 24 h. GAPDH fue utilizado como control de carga. (\*: p<0,05; \*\*\*: p<0,001) cpm: cuentas por minuto.



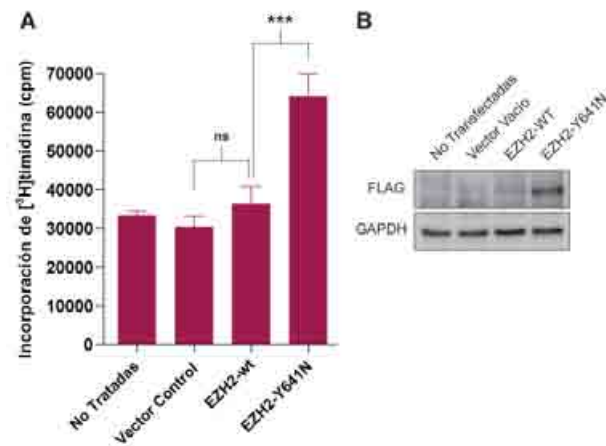
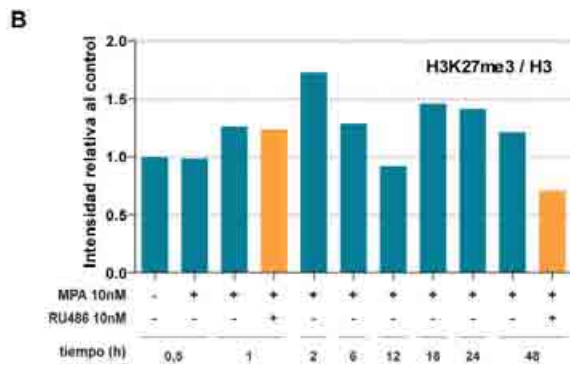
**Figura 2. La incubación de células T47D con MPA induce cambios en los niveles de expresión y de fosforilación en Thr487 de EZH2.**

**A)** Arriba: Western blot contra pT487-EZH2 y EZH2 (tras el *stripping*) de células T47D sin tratar, tratadas con MPA 10 nM o con MPA 10 nM y RU486 10 nM durante los tiempos indicados. Abajo: gráfica de intensidad relativa de cada banda comparada con el control. **B)** Arriba: Western blot contra EZH2 de células T47D sin tratar, tratadas con MPA 10 nM o con MPA 10 nM y RU486 10 nM durante los tiempos indicados. Abajo: gráfica de intensidad relativa de cada banda comparada con el control. La β-tubulina fue utilizada como control de carga en A y B.



**Figura 3. La incubación de células T47D con MPA induce cambios en los niveles globales de H3K27me3.**

**A)** Western blot contra H3K27me3 y H3 de células T47D sin tratar, tratadas con MPA 10 nM o con MPA 10 nM y RU486 10 nM durante los tiempos indicados. GAPDH fue utilizado como control de carga. **B)** Gráfica de intensidad relativa de las bandas comparadas con H3 total (H3K27me3/H3) y con el control.



**Figura 4. La transfección transiente de una isoforma constitutivamente activa de EZH2 (EZH2-Y641N) produce un aumento de la proliferación en células T47D.**

**A)** Ensayo de proliferación por incorporación [3H]-timidina durante 18 h luego de la transfección de un vector vacío (Vector Control), el que expresa EZH2-wt y el que expresa EZH2-Y641N. (ns: no significativo; \*\*\*:  $p < 0,001$ ). **B)** Western blot contra FLAG de células T47D transfectadas con los vectores indicados por 48 h. GAPDH fue utilizado como control de carga.

# EFFECTO MODULADOR DEL CONSUMO DE YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) SOBRE EL COMPROMISO NEUROLÓGICO PRODUCIDO POR CÁNCER DE PULMÓN EN RATONES

María Cecilia Cittadini

INICSA UNC CONICET

Director: Gastón Repossini Márquez

## RESUMEN

El cáncer de pulmón se encuentra en cuarto lugar en Argentina si se tiene en cuenta su incidencia (9,8%), siendo el proceso neoplásico maligno con mayor tasa de mortalidad. Puede comprometer al SNC en forma primaria (tumores nerviosos) o secundaria (metástasis), siendo los estados oxidativos proinflamatorios (neuroinflamación) factores promotores. Los polifenoles presentes en extractos vegetales tendrían un efecto modulador sobre dichos procesos. 4 grupos experimentales de ratones Balb/c machos inoculados con LAC-1 (cáncer de pulmón), recibieron durante 22 días extractos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (*Aquifoliaceae*) (IP) y ácido gálico disuelto en agua (AG) en dosis de 100 mg/Kg/día y 50 mg/Kg/día más un grupo control (C). Cerebro (telencéfalo y diencefalo), mesencéfalo, tallo encefálico, cerebelo y sangre fueron estudiados (ANOVA;  $p < 0,05$ ). No se halló metástasis en telencéfalo, pero pudo observarse un proceso inflamatorio incipiente. La cantidad de fenoles totales observados fue mayor en telencéfalo, diencefalo y cerebelo con respecto a sus controles, principalmente en ratones que recibieron dosis mayores de IP. A su vez, la concentración de lipoperóxidos fue menor en estas regiones, lo que podría dar cuenta de la capacidad antioxidante de los fenoles presentes en fitoextractos. Dados los resultados preliminares, se requiere profundizar el efecto de dichos extractos en el SNC.

## ABSTRACT

Lung cancer is the fourth in Argentina taking into account its impact (9.8%), being the malignant neoplastic process with higher mortality rate. It may involve the CNS primary (nerve tumors) or secondary form (metastases), with proinflammatory oxidative states (neuroinflammation) promoting factors. Polyphenols present in plant extracts have a modulating effect on these processes. 4 experimental groups of Balb/c mice inoculated with LAC-1 (lung cancer), received for 22 days extracts of *Ilex paraguariensis* St. Hil A. (*Aquifoliaceae*) (IP) and gallic acid (GA) dissolved in water, in doses of 100 mg/kg/day and 50 mg/kg/day and a control group (C). Brain (telencephalon and diencephalon), midbrain, brainstem, cerebellum and blood were studied (ANOVA,  $P < 0.05$ ). No metastasis was found in telencephalon, but it was observed an incipient inflammatory process. The amount of total phenols was observed more in telencephalon, diencephalon and cerebellum with respect to control, mainly in mice receiving doses greater than IP (100 mg/Kg/day). In turn, the concentration of lipid peroxides was lower in these regions, which could account for the antioxidant capacity of the phenols present in phytoextracts. Given the preliminary results, it is necessary to deepen the effect of these extracts on the CNS.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una patología crónica que constituye uno de los problemas más relevantes y de mayor impacto sanitario a nivel mundial. Es la segunda causa de muertes producidas por Enfermedades No transmisibles (ENT) y, a nivel nacional, muestra una tasa de Incidencia media-alta estimada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC-OMS) en el año 2012 (Instituto Nacional del Cáncer, 2014). Dentro de éstos, el cáncer de pulmón es uno de los más frecuentes, ocupando el cuarto lugar en Argentina si se tiene en cuenta su incidencia (9,8%), siendo el proceso neoplásico maligno con mayor tasa de mortalidad (Instituto Nacional del Cáncer, 2014). Sus principales complicaciones pueden presentarse en forma directa a través de procesos metastásicos (Instituto

Nacional del Cáncer, 2014), siendo el cerebro una de las localizaciones de estos tumores secundarios (Medline, 2014); o de forma indirecta induciendo un estado pro-inflamatorio denominado síndrome paraneoplásico (Ekiz et al 2013; Koike et al 2013; Erro et al 2004; Jurado Gámez et al 2001). A nivel neurológico, este síndrome puede afectar una parte del sistema nervioso en forma aislada o en forma generalizada (Erro et al 2004; Jurado Gámez et al 2001). Suele ser el primer síntoma (Heinemann et al 2008; Jurado Gámez 2001) y el que desencadena el deterioro progresivo e irreversible en las personas que presentan adenocarcinomas de pulmón (Jurado Gámez et al 2001).

Si bien este tipo de cáncer ha sido asociado directamente con el hábito de fumar, se lo ha relacionado, en menor medida, con el consumo de otras sustancias presentes en alimentos o bebidas que podrían aumentar el riesgo de desarrollarlo, lo que justificaría la presencia de tumores pulmonares en personas no fumadoras, pero que sí manifiestan hábitos de consumo ligados a estas sustancias protumorales.

En este sentido, el consumo de determinados alimentos de origen vegetal (fitonutrientes) genera una inacabada discusión acerca de sus posibles efectos promotores o protectores en el desarrollo y evolución de esta patología. De acuerdo a esto, se conoce que ciertos principios activos como los polifenoles presentes en extractos vegetales han sido asociados con un bajo riesgo de desarrollar distintas enfermedades crónicas, entre ellas el cáncer, debido a sus efectos antioxidantes o antiinflamatorios (Latruffe et al 2013; Ramirez-Mares et al 2004). Sin embargo, la evidencia científica no es concluyente en relación a la cantidad o tipo de fitonutriente necesario para dicha acción preventiva. De este modo, el consumo de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (*Aquifoliaceae*), comercialmente denominada Mate o Yerba Mate, adquiere relevancia debido a ser fuente de los mencionados fitoquímicos y al elevado consumo en Argentina y otros países de Latinoamérica como Uruguay, Brasil y Paraguay (Organización Panamericana de la Salud 2008). Generalmente es consumida en forma de bebida (mate cocido) o infusiones (mate con bombilla) (Bates et al 2007).

Existen numerosas investigaciones donde se han hallado resultados controversiales en cuanto al efecto de dicho extracto en la salud. Por un lado se ha estudiado su composición y se han distinguido entre sus principales principios activos el ácido clorogénico (42%), galocatequina (21%), ácido 4,5-dicafeoilquínico (11%), ácido gálico (11%), cafeína (8%), epicatequina (5%) y teobromina (2%) (Bracesco et al 2011), varios de estos compuestos siendo de gran interés por su acción quimiopreventiva (Borges et al 2013; Carmo et al 2013; Tsao 2010; Heck et al 2007). Sin embargo, existen numerosos trabajos donde se ha asociado el consumo de Yerba Mate con cáncer de vías digestivas altas, vejiga, pulmón y otros (Stefani et al 2011; Loria et al 2009; Bates et al 2007) y con incremento en la incidencia de diferentes tipos de cáncer dependiendo de su contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Kamangar et al 2007).

A partir de lo expuesto hasta aquí se ha decidido profundizar el estudio de los efectos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (*Aquifoliaceae*) sobre el cáncer de pulmón en un modelo murino experimental, considerando relevante conocer los efectos de la Yerba Mate sobre el desarrollo tumoral y la modulación de parámetros ligados a la evolución primaria (metástasis) o secundaria (síndrome paraneoplásico) del mismo, teniendo como referencia numerosos estudios que muestran sus efectos antioxidante; antiinflamatorio y antitumoral *in vitro* (Carmo et al 2013; González de Mejía et al 2010; Bravo et al 2007), sin dejar de mencionar que este extracto presenta un masivo y frecuente consumo por parte de la población argentina.

## MATERIALES Y METODOLOGÍA

**Extractos vegetales:** Tras la revisión de aspectos etnobotánicos, se obtuvo el extracto de *I. paraguariensis*, de adquisición comercial por extracción acuosa (10/50 p/v) a temperatura de pre-ebullición en cámara fotoprottegida y bajo movimiento constante, con punto final isotérmico con el ambiente a una hora (extracción acuosa termoasistida). Tras centrifugación (5 min, 5000 rpm), se recuperó y filtró (0,2  $\mu$ m) el sobrenadante, para ser liofilizado y conservado (criopreservación al vacío). El extracto obtenido se utilizó como suplemento en el agua de bebida. Se identificó el perfil de principios activos constituyentes teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos, por técnicas cuantitativas.

El contenido total de polifenoles se cuantificó con una adaptación de la técnica de Folin-Ciocalteu (Canalis et al 2012), mientras que los flavonoides se determinaron por colorimetría (Salamanca Grosso et al 2007).

El perfil fenólico de IP obtenido fue:

Extracto	Fenoles totales (mg de Eq de ácido gálico/ g de extracto seco)	Flavonoides totales (mg de Eq de quercetina/ g de extracto seco)	Flavonoides totales (% de flavonoides totales)
Ilex paraguariensis A. St. Hil.	21.77±1.37	5.33±0.13	24.48

**Modelo animal:** Se inocularon ratones BALB/C machos con células LAC-1 (Cáncer de pulmón) según técnicas de rutina de nuestro laboratorio (Piegarì et al 2011), se mantuvieron bajo condiciones estándares de bioterio con agua y comida (chow) *ad libitum*. Luego de ser inoculados, fueron asignados aleatoriamente en cuatro grupos experimentales ( $\geq n_3$ ) que recibieron durante 22 días: 1) IP100: 100 mg/Kg/día extracto seco de *Ilex paraguariensis* diluido en agua; 2) IP50: 50 mg/Kg/día extracto seco de *Ilex paraguariensis* diluido en agua; 3) Gal100 (ácido gálico): 100 mg/Kg/día de ácido gálico diluido en agua; 4) Gal50: 50 mg/Kg/día de ácido gálico diluido en agua y, un grupo control que recibió agua sin tratamiento (C).

Durante el período experimental se realizó el seguimiento ponderal, control del estado general, evolución del tumor y la sobrevivencia, comparando los animales tratados respecto del grupo control. Luego de este período los ratones se sacrificaron y se realizaron las autopsias siguiendo las normas éticas para el manejo de animales experimentales. Se obtuvo una muestra de sangre por punción cardíaca y su masa encefálica, la cual fue pesada y separada en sus regiones/órganos constituyentes: cerebro (telencéfalo y diencefalo), tallo encefálico (mesencéfalo y rombencéfalo -puente y bulbo-) y cerebelo. La mitad de cada región fue fijada en formol 10% para análisis histopatológicos de metástasis. La otra mitad se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se utilizó en determinaciones bioquímicas.

**Presencia de metástasis:** se realizó análisis histopatológicos de telencéfalo para determinar la presencia de células metastásicas o tumores secundarios. Se estudiaron las características morfológicas y la organización estructural de las neuronas con técnica de HE en campos seleccionados con el método de la cuadrícula de 4x y 40x utilizando un video microscopio Leica. Se realizó la búsqueda de tejido con características anómalas para cada grupo experimental y se compararon sus estructuras morfológicas con las del grupo control.

**Fitoquímicos redox-activos:** Los compuestos fenólicos totales (antioxidantes) obtenidos del SNC de los animales experimentales se determinaron con la técnica de Folin-Ciocalteu para muestras biológicas (Canalis et al, 2012).

**Peroxidación:** se determinó la concentración de peróxidos lipídicos en cada región encefálica por colorimetría de acuerdo a lo realizado anteriormente, en consideración de ser éstos, productos genéricos de la oxidación tisular (Soria et al, 2008).

**Respuesta inflamatoria:** Se determinaron los valores de Interleuquina 6 (IL6) séricos y tisulares mediante inmunoELISA (Strassmann et al 1993).

**Análisis estadístico:** Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de  $\geq$  tres experimentos separados realizados en triplicado. Para su análisis, se ajustaron los correspondientes modelos de ANOVA, seguidos por la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando el programa estadístico InfoStat 2012. Además, se desarrolló un abordaje que permitió realizar mayores inferencias sobre los procesos estudiados con técnicas apropiadas para estudiar respuestas biológicas complejas (Genser et al, 2007).

## RESULTADOS

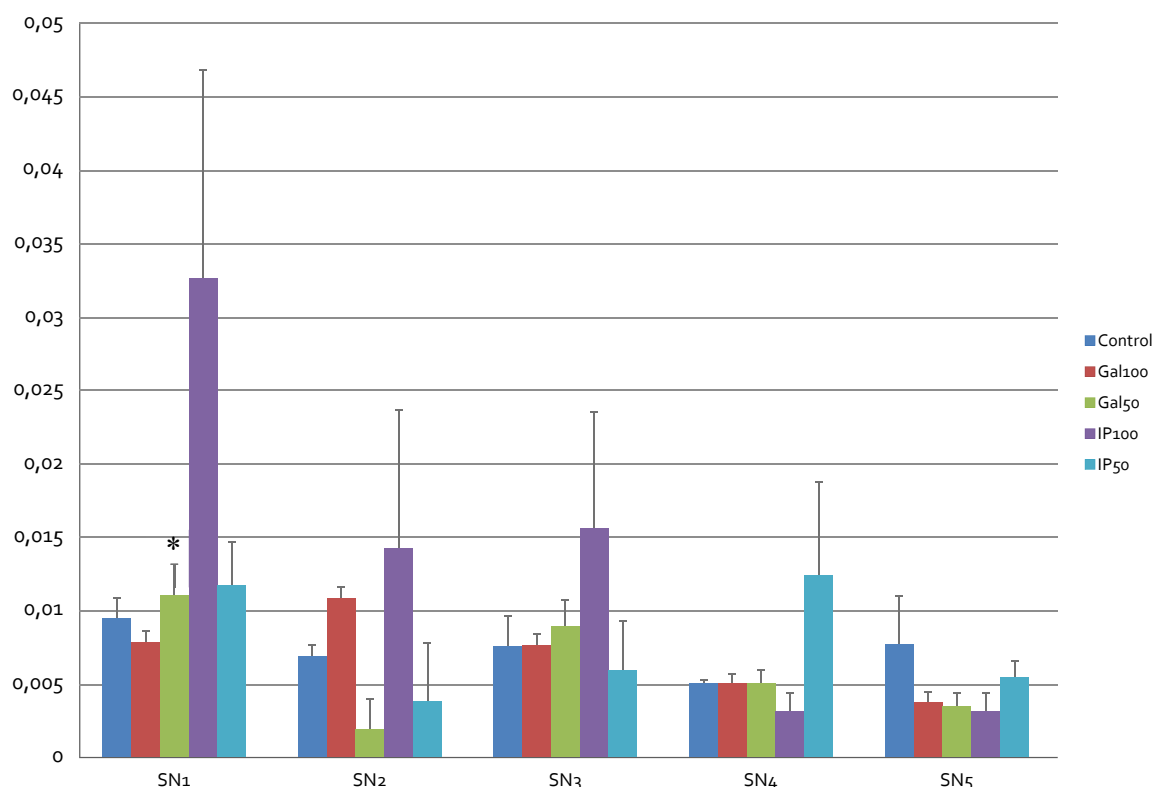
### Presencia de Metástasis

No se observó tejido con características anómalas en telencéfalo de ninguna de las muestras analizadas. La morfología neuronal fue normal, al igual que la distribución de sustancia blanca y gris. La estructura, cantidad y distribución de vasos sanguíneos fue similar al control en todos los tratamientos. No se observó metástasis en esta región del SNC. Por otro lado, si bien los valores de IL6 registrados en telencéfalo no mostraron diferencias significativas, en algunos campos de los ratones que recibieron los distintos tratamientos se registraron aumentos de la microglia y algunas figuras neuronales alteradas lo que podría dar cuenta de un proceso inflamatorio incipiente (Figura 1, 2, 3).

### Fenoles totales

Al analizar la concentración de fenoles totales se hallaron diferencias estadísticamente significativas en telencéfalo (SN1) de los ratones que recibieron 50 mg/Kg/día de ácido gálico (Gal50) con respecto al grupo control. El resto de los análisis no arrojó resultados estadísticamente significativos. Sin embargo, puede observarse un incremento notable en las concentraciones de fenoles de los ratones que recibieron 100 mg/Kg/día de yerba mate (IP100) en telencéfalo (SN1), cerebelo (SN2) y diencéfalo (SN3) con respecto a sus controles. También se observan concentraciones bajas de fenoles en el tallo encefálico en todos los tratamientos si tenemos en cuenta los valores registrados en el control.

### Concentración de fenoles totales



Fenoles totales expresados en mg de EAG/g de tejido

SN1: telencéfalo; SN2: cerebelo; SN3: diencéfalo; SN4: mesencéfalo; SN5: tallo encefálico

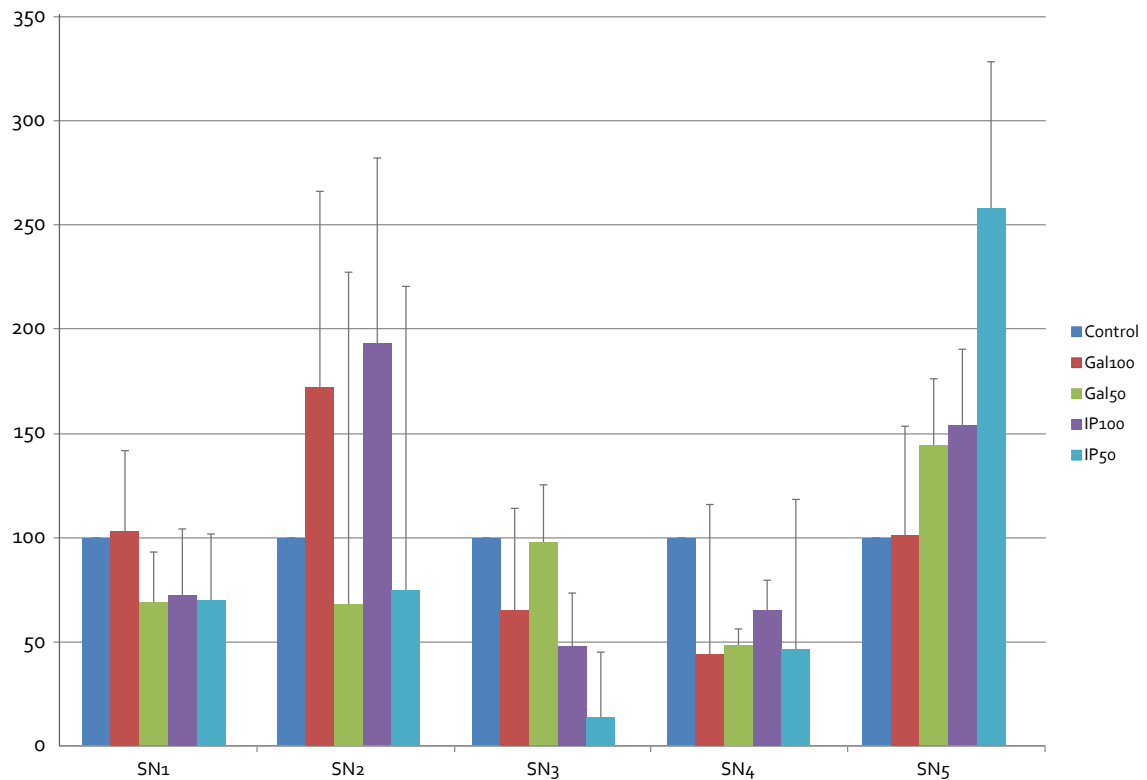
\* $p < 0,05$

### Peroxidación

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y los controles en ninguna de las regiones encefálicas estudiadas. Se hallaron valores de peróxidos inferiores al grupo control en telencéfalo (SN1), diencéfalo (SN3) y mesencéfalo (SN4), mientras que los valores de

peróxidos que se registraron en tallo encefálico (SN5) son mayores al grupo control en los distintos tratamientos.

### Peróxidos lipídicos en distintas regiones encefálicas



Peróxidos lipídicos expresados en porcentaje (%) en relación al control

SN1: telencéfalo; SN2: cerebelo; SN3: diencéfalo; SN4: mesencéfalo; SN5: tallo encefálico

### Respuesta inflamatoria

Se realizó determinaciones de IL 6 en dos regiones encefálicas: telencéfalo (SN1), diencéfalo (SN3) y sangre.

	Tratamiento	Variable	n	Media	E.E.
Sangre	Control	IL 6	3	0,152	0,0019
Sangre	Gal 100	IL 6	6	0,101	0,0119
Sangre	Gal 50	IL 6	6	0,124	0,0108
Sangre	IP 100	IL 6	6	0,136	0,0062
Sangre	IP 50	IL 6	3	0,136	0,0014
SN1	Control	IL 6	9	0,146	0,0045
SN1	Gal 100	IL 6	9	0,133	0,005
SN1	Gal 50	IL 6	9	0,145	0,0047
SN1	IP 100	IL 6	9	0,148	0,0043
SN1	IP 50	IL 6	9	0,14	0,0036
SN3	Control	IL 6	9	0,143	0,002
SN3	Gal 100	IL 6	9	0,199	0,0023
SN3	Gal 50	IL 6	9	0,185	0,003
SN3	IP 100	IL 6	9	0,194	0,0048
SN3	IP 50	IL 6	9	0,141	0,0008



## PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS

Región	Variable	Tratamiento	N	Media	DE	p-valor
Sangre	IL6	Control	3	0,15	5 E-0,03	<b>0,0534</b>
Sangre	IL6	Gal 100	6	0,10	0,03	
Sangre	IL6	Gal 50	6	0,12	0,03	
Sangre	IL6	IP100	6	0,14	0,02	
Sangre	IL6	IP50	3	0,14	4 E-0,03	

Región	Variable	Tratamiento	N	Media	DE	p-valor
SN1	IL6	Control	9	0,15	0,01	<b>0,2718</b>
SN1	IL6	Gal 100	9	0,13	0,02	
SN1	IL6	Gal 50	9	0,15	0,01	
SN1	IL6	IP100	9	0,15	0,01	
SN1	IL6	IP50	9	0,14	0,01	

Región	Variable	Tratamiento	N	Media	DE	p-valor
SN3	IL6	Control	9	0,14	0,01	<b>&lt;0,0001</b>
SN3	IL6	Gal 100	9	0,20	0,01	
SN3	IL6	Gal 50	9	0,19	0,01	
SN3	IL6	IP100	9	0,19	0,01	
SN3	IL6	IP50	9	0,14	6 E-0,3	

### Coefficiente de correlación de Pearson

#### Tratamiento: Control

	SN1	SN3	SANGRE
SN1	1,00	0,49	0,86
SN3	0,27	1,00	0,72
SANGRE	-0,09	0,19	1,00

#### Tratamiento: Gal100

	SN1	SN3	SANGRE
SN1	1,00	0,49	0,15
SN3	-0,27	1,00	0,47
SANGRE	-0,67	0,37	1,00

#### Tratamiento: Gal50

	SN1	SN3	SANGRE
SN1	1,00	0,32	0,24
SN3	-0,37	1,00	0,32
SANGRE	0,57	-0,50	1,00

#### Tratamiento: IP100

	SN1	SN3	SANGRE
SN1	1,00	0,08	0,33
SN3	0,61	1,00	0,15
SANGRE	0,48	0,67	1,00

#### Tratamiento: IP50

	SN1	SN3	SANGRE
SN1	1,00	0,87	0,91
SN3	-0,06	1,00	0,35
SANGRE	-0,06	-0,47	1,00

## DISCUSIÓN

Los resultados alcanzados muestran las variaciones de parámetros oxidativos e inflamatorios en las regiones encefálicas de los ratones inoculados que han sido tratados durante 22 días con yerba mate y ácido gálico y de los ratones que no recibieron tratamiento (grupo control).

Vale aclarar que las dosis administradas de IP (*Ilex paraguariensis*), conocida como yerba mate, son representativas del consumo diario de infusión por parte de la población, siendo 100 mg/Kg/día aproximadamente equivalente a una ingesta de 2 L diarios de mate o té (Canalis et al 2014). A su vez, la dosis de ácido gálico se realizó en proporción a la cantidad presente en la planta, que representa cerca de un 11% de su composición fenólica (Bracesco et al 2011).

Los valores de fenoles totales aumentados en telencéfalo (SN1) de todos los ratones tratados se debe a su biodisponibilidad sistémica (Canalis et al 2014), lo cual contribuye a su reconocida capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Vauzour et al, 2010; Vasilopoulou et al, 2013). Estos valores se observan también en diéncéfalo (SN3) y en menor medida en cerebelo (SN2), principalmente con las dosis mayores de tratamiento administradas. Esto es avalado por otros estudios que demuestran la capacidad de los fenoles derivados de infusiones de alojarse en el SNC luego de su ingesta oral (Andrade et al, 2012). Por el contrario, la concentración de fenoles observada en tallo encefálico ha sido muy baja en todos los tratamientos.

Por otra parte, se observa una baja concentración de peróxidos lipídicos en telencéfalo (SN1) y diéncéfalo (SN3) y alta peroxidación en tallo encefálico. Estos resultados, asociados a la concentración de fenoles observadas en las regiones encefálicas, dan lugar a su acción preventiva de procesos oxidativos a nivel subcortical, respondiendo a la función antioxidante atribuida a estos fitoquímicos (Carmo et al 2013; González de Mejía et al 2010; Hisanaga et al 2014) y, por otro lado, a la susceptibilidad redox de la corteza cerebral que ya ha sido estudiada previamente en otras investigaciones con fitoextractos (Haque et al 2007).

No se ha observado proceso metastásico en la región encefálica estudiada. Sin embargo, este tipo de tumores (pulmón) presenta porcentajes importantes de complicaciones secundarias en Sistema Nervioso (Mayoral Chavez 2004; Medline 2014). Esto puede deberse al poco tiempo de evolución del tumor, dadas las distintas etapas metastásicas desarrolladas por Mayoral Chavez, ya que los ratones han sido sacrificados a los 22 días de ser inoculados dadas las características desarrolladas por el proceso neoplásico y las condiciones éticas establecidas en estos diseños experimentales con animales. A su vez, se han observado aumentos de la microglia y algunas figuras neuronales alteradas en los ratones tratados que podrían dar cuenta de un proceso inflamatorio incipiente, el cual está relacionado directamente con el proceso neoplásico primario y secundario (Strassman et al 1996; Rosatto et al 2013). Sin embargo, los valores de IL6 no han mostrado diferencias significativas en telencéfalo de ratones tratados y sus controles, lo cual puede responder a la capacidad antiinflamatoria atribuida a los compuestos fenólicos ya que en esta región es donde han mostrado mayor concentración tisular.

De esta manera, por los beneficios reconocidos de la utilización de extractos vegetales en la salud humana, y principalmente el uso de yerba mate, resulta relevante profundizar su estudio para conocer la concentración adecuada y la biodisponibilidad de sus fitoquímicos potencialmente protectores en el SNC, permitiendo reconocer sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios y generar nuevas estrategias quimiopreventivas a partir de la ingesta de una planta que presenta un masivo y frecuente consumo en la población argentina.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade JP, Assuncao M. Protective effects of chronic green tea consumption on age-related neurodegeneration. *Curr Pharm Des.* 2012; 18:4-14.
2. Bates MN, Hopenhayn C, Rey OA, Moore LE. Bladder cancer and mate consumption in Argentina: a case-control study. *Cancer Lett.* 2007;246(1-2):268-73.
3. Borges MC, Vinolo MA, Nakajima K, de Castro IA, Bastos DH, Borelli P, et al. The effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on metabolic and inflammatory parameters in high-fat diet-fed Wistar rats. *Int J Food Sci Nutr.* 2013;64(5):561-9.
4. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol.* 2011;136(3):378-84.
5. Bravo L, Goya L, Lecumberri E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Res Inter.* 2007;40:393-405.
6. Canalis A, Defagó MD, Soria EA. Perfil Farmacnutricional de azafrán y cúrcuma: Identificación de compuestos lipídicos y fenólicos con potencial xenohormético. Saarbrücken, Alemania: Editorial Académica Española, 2012.
7. Carmo LS<sup>1</sup>, Rogero MM, Cortez M, Yamada M, Jacob PS, Bastos DH, et al. The Effects of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) consumption on IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 production by bone marrow cells in wistar rats fed a high-fat diet. *Int J Vitam Nutr Res.* 2013;3(1):26-35.
8. Ekiz E, Ozkok A, Ertugrul NK. Paraneoplastic mononeuritis multiplex as a presenting feature of adenocarcinoma of the lung. *Case Rep Oncol Med.* 2013;457346.
9. Erro ME, Martínez M, Ayuso T, Iragui MI. Paraneoplastic polyneuropathy with anti-amphiphysin antibodies. *An Sist Sanit Navar.* 2004;27(1):103-6.
10. Genser B, Cooper PJ, Yazdanbakhsh M, Barreto ML, Rodrigues LC. A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunol.* 2007; 8-27.
11. González de Mejía E, Songa YS, Hecka CI, Ramírez-Mares M. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *J Func Foods.* 2010; 23-34.
12. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr.* 2006; 136:1043-7.
13. Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007; 72(9):R138-51.
14. Heinemann S, Zabel P, Hauber HP. Paraneoplastic syndromes in lung cancer. *Cancer Therapy.* 2008;6:687-98.
15. Hisanaga A, Ishida H, Sakao K, Sogo T, Kumamoto T, Hashimoto F, et al. Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of Oolong tea theasinensin. *Food Funct.* 2014; 5:1891-1897.
16. Jurado Gámez B, Garcia De Lucas MD, Gudín Rodríguez M. Cáncer de pulmón y síndromes paraneoplásicos. *An Med Interna.* 2001;18(8):440-46.
17. Kamangar F, Schantz MM, Abnet CC, Fagundes RB, Dawsey SM. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(5):1262-8.
18. Koike H, Sobue G. Paraneoplastic neuropathy. *Handb Clin Neurol.* 2013;115:713-26.
19. Latruffe N, Rifler JP. Bioactive polyphenols from grapes and wine emphasized with resveratrol. *Curr Pharm Des.* 2013; en prensa.
20. Loria D, Barrios E, Zanetti R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. *Rev Panam Salud Publica.* 2009;25(6):530-9.
21. Mayoral Chávez MA. Perspectiva monográfica del cáncer de pulmón: un enfoque molecular y la metástasis al cerebro. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2004; 17(4):283-292.
22. Medline Plus. Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos [página web]. Estados Unidos, 2014. [citado 7 de abril de 2014]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000769.htm>.
23. Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer [página web]. Argentina; 2014. [citado 7 de abril de 2014]. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/inc/>.
24. Organización Panamericana de la Salud. Plan de Acción Regional de Prevención y Control del Cáncer [monografía en Internet]. Washington DC; 2008. [citado 19 julio 2013]. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/NC/pcc-stakeholders-o8.htm>.
25. Piegari M, Ortiz S, Díaz M del P, Eynard AR, Valentich MA. Characterization of a murine lung adenocarcinoma (LAC1), a useful experimental model to study progression of lung cancer. *J Exp Ther Oncol.* 2011;9(3):231-9.

26. Ramirez-Mares MV, Chandra S, de Mejia EG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res.* 2004;4;554(1-2):53-65.
27. Rossato M, Zabeo E, Burei M, Cecchin D, Guzzardo V, Fassina A, et al. Lung Cancer and Paraneoplastic Neurologic Syndromes. *Clinical Lung Cancer.* 2013;14(3), 301-9.
28. Salamanca Grosso G, Correa Caravajal IL, Principal J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propoleos colombianos. *Zootecnia Tropical.* 2007;25:95-102.
29. Soria EA, Goleniowski ME, Cantero JJ, Bongiovanni GA. Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Hum Exp Toxicol.* 2008;27(4):341-6.
30. Stefani ED, Moore M, Aune D, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Boffetta P, et al consumption and risk of cancer: a multi-site case-control study in Uruguay. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(4):1089-93.
31. Strassmann G, Jacob CO, Fang M et al. Mechanisms of paraneoplastic syndromes of colon-26 involvement of interleukin 6 in hypercalcemia. *Cytokine.* 1993;5:463-68.
32. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 2010;2:1231-1246.
33. Vasilopoulou CG, Kontogianni VG, Linardaki ZI, Iatrou G, Lamari FN, Nerantzaki AA, et al. Phytochemical composition of "mountain tea" from *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* and evaluation of its behavioral and oxidant/antioxidant effects on adult mice. *Eur J Nutr.* 20013; 52:107-16.
34. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Orunda-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and human Health: prevention of disease and mechanism of action. *Nutrients.* 2010; 2:1106-31.

# VALIDACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE UN ANTICUERPO BIOSIMILAR A RITUXIMAB

Héctor Adrián Cuello

Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología,  
Universidad Nacional de Quilmes.

**Director:** Mariano Rolando Gabri

## RESUMEN

Los productos bioterapéuticos similares (PBS) están alcanzando el mercado, ganando aceptación y convirtiéndose en una realidad. Un amplio rango de estos productos está en desarrollo o ha sido aprobado recientemente en varios países. En este escenario, los ensayos de comparabilidad funcional son elementos claves para demostrar su biosimilitud con los productos de referencia, particularmente en los mecanismos de acción. En este trabajo, se reporta una comparación de la capacidad de unión e inducción de ADCC *in vitro* entre un PBS y Rituximab. Mediante FACS cuantitativo se evaluó la unión a células CD20-positivas, no encontrándose diferencias entre ambos productos. Se encuentra descrito que la respuesta a rituximab dependería de los polimorfismos en FcγRIIIA-158. Se genotipificaron 12 donantes voluntarios, encontrándose 3 homocigotas para valina (V/V), 6 para fenilalanina (F/F) y 3 heterocigotas (V/F). La inducción de ADCC fue evaluada mediante cuantificación de liberación de lactato deshidrogenasa utilizando células efectoras de donante FcγRIIIA-158V/V. Se obtuvo una eficacia equivalente entre el PBS y rituximab. Adicionalmente, los resultados también confirmaron una inducción mayor de la respuesta de ADCC para el polimorfismo V/V frente al F/F. En resumen, una capacidad de unión y una actividad de ADCC comparables fue observada para Rituximab y el biosimilar evaluado.

## ABSTRACT

Similar biotherapeutic products (SBPs) are reaching the market, earning acceptance and becoming a reality. A wide range of SBPs are under development or are already licensed in many countries. In this scenario, functional comparability assays are key elements for biosimilarity demonstration, particularly when they assess the molecule action mechanisms. In this work, we report a comparison of binding capacity and *in vitro* ADCC induction between a SBP and rituximab. By means of quantitative FACS we evaluated the binding to CD20-positive cells. No differences in binding capacity were observed between the products. It has been described that responses to rituximab may depend upon polymorphisms in FcγRIIIA-158. We analyzed the genotype of 12 healthy donors by PCR and sequencing, finding that 3 were homozygous for valine (V/V), 6 for phenylalanine (F/F) and 3 were heterozygous (V/F). The ADCC induction was evaluated by a lactate dehydrogenase release-based method with effector cells from a FcγRIIIA-158V/V donor in an Ab concentration-response manner. Equivalent efficacy between SBP and rituximab was observed. Additionally, the results also confirmed that individuals with V/V polymorphism induced major ADCC response than the F/F polymorphism, as it is reported. In summary, comparable binding and ADCC activity were shown for rituximab and the evaluated biosimilar.

## INTRODUCCIÓN

El uso de productos inmunoterapéuticos como base de terapias oncológicas selectivas es una de las mayores contribuciones que la inmunología ha aportado al tratamiento de pacientes oncológicos. Estas estrategias terapéuticas se constituyen en la actualidad como una válida y moderna opción para el tratamiento de diversas indicaciones oncológicas, caracterizadas por su selectividad y baja toxicidad. En este campo, los anticuerpos monoclonales han sido el centro de atención cuando se trata de una terapia selectiva [14, 15].

Uno de los anticuerpos más utilizados actualmente en terapia oncológica es Rituximab, anticuerpo dirigido contra la molécula CD20, característica de linfocitos B. Es del tipo quimérico, de regiones constantes (Fc) humanas y regiones variables murinas, de isotipo IgG1. Fue el primer anticuerpo monoclonal en ser aprobado para uso clínico en terapia oncológica, en 1997 por la FDA para tratar pacientes con linfomas no-Hodgking (LNH) de bajo grado folicular, resistentes a quimioterapia o en recaída [11, 12]. Los mecanismos de acción propuestos para este monoclonal consisten en la inducción e citotoxicidad mediada por complemento (CDC), señalización directa a apoptosis y como mecanismo de acción por excelencia, inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) [5, 13].

ADCC en presencia de Rituximab es mediada por células efectoras que se activan por unión de la región Fc del anticuerpo unido a la célula blanco a través de los receptores FcγR [9]. Miembros de la familia de estos receptores son expresados por distintos tipos celulares. La actividad citotóxica de estas células depende de un balance entre señales activadoras y señales inhibitorias. En células de estirpe mieloide (monocitos, macrófagos, granulocitos) se expresan los receptores activadores FcγRI (CD64), FcγRIIIA (CD16) y el receptor inhibidor FcγRIIB (CD32), que en conjunto producen la señalización en la célula efectora para ejecutar algún mecanismo citotóxico que puede involucrar fagocitosis y ADCC. Existe otro tipo celular involucrado en el reconocimiento de la región Fc de un anticuerpo unido a su antígeno, llamadas células NK (del inglés *Natural Killers*). Esta población celular es parte de la inmunidad innata del huésped y tiene un rol importante en la inducción de la muerte de células tumorales y células infectadas de patógenos intracelulares. Las células NK comparten los mecanismos de acción de las células TCD8+ al inducir la liberación por exocitosis de enzimas líticas, como perforinas y granzimas, y utilizando el Fas-Ligando. Son consideradas las principales células efectoras del mecanismo de ADCC debido a su alta eficiencia en relación a la unión de la célula blanco y la inducción de la muerte de las mismas [6]. Las células NK expresan el receptor activador FcγRIIIA (CD16) en mayor medida que el resto de las especies celulares que lo poseen, por lo que es considerado un marcador específico de este tipo celular [18, 2, 3].

Existe un polimorfismo en la posición aminoacídica 158 del receptor FcγRIIIA determinada por el cambio en una sola base (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) en la posición 559 del gen, que culmina en el posicionamiento de una valina (codón GTT) o una fenilalanina (codón TTT) en el receptor. Se ha demostrado para Rituximab que la respuesta ADCC es diferencial según el polimorfismo del paciente (FcγRIIIA-158 V/V, FcγRIIIA-158 V/F y FcγRIIIA-158 F/F). Se encuentra reportado que cuando en dicha posición está presente un residuo de valina, existe una unión más fuerte con la región constante de las IgG1, en comparación con la presencia de un residuo de fenilalanina [10]. Estudios posteriores pudieron determinar que si bien la respuesta varía con respecto a dicho polimorfismo, la inducción de ADCC por Rituximab generada por diferentes pacientes es significativamente mayor en aquellos con al menos una valina en la posición 158 del receptor [17,7]. Esto indica no sólo el rol central que presenta el receptor en la actividad de Rituximab, sino que también sugiere que la respuesta a la terapia puede ser predicha por análisis del polimorfismo del paciente.

En el año 2001 empezaron a caducar las primeras patentes de productos biológicos, y en 2003 se aprobaron los primeros biosimilares para uso terapéutico. En el caso de Rituximab, su patente fue emitida en Estados Unidos en 1998 y tiene fecha de vencimiento en 2015 [4], lo cual da lugar al advenimiento de productos biosimilares del principio activo una vez que la protección del registro de patentes caduque. Se definen como biosimilares a aquellos principios terapéuticos que se producen a través de la actividad biológica, ya sea de células aisladas u organismos, y que presentan una muy alta o total similitud a un producto de las mismas características que ya se encuentra en el mercado [1, 8]. De esta manera, el desarrollo de anticuerpos monoclonales que semejan otros cuyas patentes han caducado y se utilizan en la clínica, se erigen en una opción de desarrollo biotecnológico que permite la oferta de estrategias terapéuticas de última generación lo que aumenta la oferta de productos equivalentes y promueve la depreciación del producto en el mercado. A este tipo de productos se los conoce mayormente como Productos Bioterapéuticos Similares (PBS) o Biosimilares.

La empresa de capitales nacionales PharmADN se dedica a la producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos, teniendo entre su cartera de productos un biosimilar para Rituximab con el fin de comercializarlo en el país y proporcionar un medicamento con la identidad, seguridad y eficacia del innovador. El mismo busca ser lanzado al mercado nacional, lo que permitirá reducir significativamente los costos para los pacientes que dependan de esta terapia, en el marco de la

sustitución de importaciones. La fase clave en la validación de estos productos implica la demostración del cumplimiento de los mecanismos de acción reportados para el producto original. Es por eso que en la primera etapa del presente proyecto se evaluó la capacidad de unión del biosimilar a su ligando y posteriormente se determinó la capacidad de inducir ADCC en células blanco positivas para CD20, el mecanismo más relevante en la actividad de Rituximab. Se realizó previamente una búsqueda de donantes de células efectoras con el genotipo demostrado como el necesario para generar la mejor respuesta, determinada por la variante alélica antes mencionada. La contribución de nuestro laboratorio en los ensayos preclínicos, sumados a los que realizará la empresa como controles estándares de producción, permitirá validar al biosimilar en cuanto a su actividad biológica.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Condiciones de cultivo y mantenimiento de líneas celulares***

La línea celular WIL2-S (CRL 8885, ATCC), derivada de linfoblasto de células B, se mantuvo in vitro en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco). La línea celular JeKo-1 (CRL-3006, ATCC) derivada de linfoma de células de manto, se mantuvo in vitro en medio RPMI suplementado con 20% de SFB. Las dos líneas celulares crecen en suspensión y fueron subcultivadas mediante dilución tres veces por semana y mantenidas en un rango de concentración entre  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  células/ml.

### ***Anticuerpos utilizados***

Rituximab Mabthera© Lote # 10136513 (Roche); Biosimilar RTX83 Lotes # 1301, 1303, 1304 y 1305 (PharmADN); Control Isotipo, HUMAN IgG1 (SIGMA); polyclonal Rabbit Anti Human IgG/FITC Rabbit F (ab')<sub>2</sub> (Dako).

### ***FACS cuantitativo***

$2,5 \times 10^5$  células WIL2-S/ Jeko-1 se incubaron con las concentraciones correspondientes de biosimilar o Rituximab (15- 7,5- 3,750- 1,875- 0,938- 0,469- 0,234- 0,117 µg/ml para la línea WIL2-S y 3,75- 1,875- 0,938- 0,188 -0,094- 0,047- 0,023-0,012 µg/ml para Jeko-1), en hielo durante 30 min. Se realizaron los lavados y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo FITC (38 µg/L) durante 30 min en hielo en oscuridad. Finalmente se resuspendieron buffer FACS (PBS 2% SFB) y se adquirió en citómetro de flujo FACSCalibur (BD). Se registraron  $1 \times 10^4$  eventos. Como control de la técnica se utilizó un anticuerpo de isotipo IgG1 (15 µg/ml).

Análisis de datos: En la gráfica tamaño en función de fluorescencia se determinó el porcentaje de células positivas como el porcentaje de unión (% de *Binding*), teniendo en cuenta los cuadrantes fijados con el control de isotipo. Dichos porcentajes fueron graficados en función de la concentración de anticuerpo correspondiente y luego por transformación logarítmica y regresión lineal se determinó el *Bindingso* de cada curva resultante, valor de concentración que corresponde al 50% de las células a las que se unió el anticuerpo. El análisis estadístico realizado consistió en Test ANOVA de doble vía contrastado con intervalo de confianza de 95% (IC 95%) mediante el *software* GraphPad Prism versión 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), para comparar las curvas de unión de cada lote con su respectiva curva control del anticuerpo Rituximab. Diferencias significativas fueron consideradas con  $p < 0,05$ .

### ***Inmunofluorescencia***

$2,5 \times 10^5$  células se incubaron con las concentraciones correspondientes de biosimilar o Rituximab (15- 0,938- 0,117 µg/ml para la línea WIL2-S y 3,75- 0,094- 0,012 µg/ml para la línea Jeko-1), en hielo durante 30 min. Luego se realizaron los lavados y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo FITC (38 µg/L) durante 30 min en hielo en oscuridad. Las células fueron fijadas mediante incubación con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, se resuspendieron en medio de montaje con DAPI (VectaShield®). Las muestras fueron visualizadas en microscopio de fluorescencia Nikon® Eclipse T2000.

### ***Extracción de ADN***

Se extrajeron 2 ml de sangre periférica de 12 donantes voluntarios y se utilizó una solución EDTA 1% PBS para anticoagular. La extracción de ADN fue realizada con el Kit Wizard® Genomic DNA Purification A1120 (Promega, Madison, WI) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante.

### **Secuenciación**

Se amplificó región de 460 pb del receptor FcγRIIA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando *primers* específicos (*forward* 5'-TGCAGGGTTGACTCCCAATC-3' y *reverse* 5'-CCCAACTCAACTTCCCAGTGTG-3', Invitrogen S.A.). La PCR fue realizada con 5 ng/μl de ADN genómico, 0,1 μM de cada *primer*, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada dNTP y 0,05 U/μL de Taq polimerasa (Taq platinum®, Gibco), en un volumen final de 50 μl. El ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, luego 35 ciclos (cada uno formados por los pasos de 30 s a 95°C, 30 s a 63°C y 30 s a 72°C) y una extensión final de 2 min a 72°C. Las amplificaciones fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE, teñido con BrEt 2,5 mg/ml. El tamaño relativo fue determinado utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). Los productos de la amplificación fueron secuenciados por la empresa *Macrogen Company*, utilizando el primer Rev. Se realizó un BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*) con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Mediante *Blast two sequence*, se alinearon los diferentes productos de la secuenciación, con la secuencia nucleotídica del receptor FcγRIIA (NG\_009066 GI 21549090), y se identificó la posición nucleotídica 559.

### **PCR SNP**

Se amplificó región de 351 pb del receptor mediante la técnica de PCR, utilizando *primers* específicos (*forward* 5'-TGCAGGGTTGACTCCCAATC-3' y *reverse-SNP* 5'-AGACACATTTTACTCCCAAC-3', Invitrogen S.A.). El *primer reverse* fue diseñado de modo que el extremo 3' hibride con la base Guanina (G) 559 que genera el codón para el aminoácido valina. La PCR fue realizada en las mismas condiciones ya mencionadas. El ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, luego 35 ciclos (formados por los pasos de 30 s a 95°C, 30 s a 53°C y 30 s a 72°C) y una extensión final de 2 min a 72°C.

### **Digestión específica de alelo**

*Nested* PCR seguida de una digestión enzimática específica de alelo (10). Se amplificó fragmento 1.2 Kb conteniendo el sitio del polimorfismo con 2 *primers* FcγRIIA específicos (*forward* A1 5'-ATATTTACAGAATGGCACAGG-3', *reverse* B1 5'-GACTTGGTACCCAGGTTGAA-3', Invitrogen S.A.). La PCR inicial fue realizada con 5 ng de ADN genómico, 150 ng de cada *primer*, 200 μM de cada dNTP y 2 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen S.A.), en un volumen final de 50 μl. El ciclado consistió de una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, luego 35 ciclos (cada uno formado por 1 min a 95°C, 1,5 min a 57°C, y 1,5 min a 72°C), y una extensión final de 8 min a 72°C. La segunda PCR utilizó *primers* específicos (*forward* A2 5'-atcagattcgATCCTACTTCTG-CAGGGGGGCAT-3', *reverse* B2 5'-acgtgctgagCTTGAGTGATGGTGA-TGTTCAC-3', las letras en minúscula indican bases no apareadas) para amplificar un fragmento de 94 pb y crear el sitio de restricción de la enzima *NlaIII* sólo en el alelo FcγRIIA -158V. Esta *nested* PCR se realizó con 1 μl del ADN amplificado anteriormente, 150 ng de cada *primer*, 200 μM de cada dNTP y 2 U de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μl. El perfil de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, luego 35 ciclos (cada uno formado por 1 min a 95°C, 1 min a 64°C y 1 min a 72°C), y una extensión final de 9,5 min a 72°C. El ADN amplificado (10 ul) fue digerido con 10 U *NlaIII* (Thermo Scientific) a 37°C por 12 h y separado por electroforesis en gel de poliacrilamida 12.5 %. Para homocigotas FcγRIIA -158F, solo se esperó una banda no digerida de 94 pb, tres bandas (94 pb, 61 pb, y 33 pb) para los heterocigotas y dos (61 pb y 33 pb) para los homocigotas FcγRIIA -158V. Los tamaños fueron verificados mediante marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen S.A.). Se utilizó como control positivo de la reacción una secuencia sintética de 120 pb del receptor, con la base 559G que genera el polimorfismo FcγRIIA -158V, clonada en el vector pUC57 (*Genscript*).

### **Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)**

ADCC fue medido mediante el ensayo de liberación de Lactato deshidrogenasa (LDH). PBMC provenientes de donantes humanos sanos fueron utilizadas como efectoras. 1x10<sup>5</sup> Células Jeko-1 en un



volumen de 100 µl se incubaron durante 30 min (a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en esterilidad) con 50 µl de las diluciones de los anticuerpos biosimilar o Rituximab correspondientes. Se evaluaron las siguientes concentraciones finales (µg/ml): 0,782- 0,391- 0,1955- 0,098- 0,049- 0,024- 0,012- 6x10<sup>-3</sup>. Luego se adicionaron 2.5x10<sup>6</sup> efectoras en un volumen de 50 µl. Después de 16 h de incubación a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en esterilidad, se recolectaron 50 µl de sobrenadante. La lisis celular fue determinada mediante cuantificación de la liberación de LDH utilizando ensayo colorimétrico (Promega). Se siguió el protocolo indicado por el fabricante y finalmente se registró la absorbancia a 490 nm en lector de placas de ELISA (Asys VVM 340). La liberación máxima de LDH (lisis máxima) fue determinada en células Jeko-1 tratadas con 0,2 % de Tritón X-100. Células Jeko-1 incubadas sólo con anticuerpo (*target*) y efectoras solas fueron incluidas como controles. Los niveles de liberación espontánea del co-cultivo de células blanco y efectoras fueron determinados sin anticuerpo y con control de isotipo. El porcentaje de lisis específica fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lisis específica} = \frac{(\text{Reacción} - \text{Liberación espontánea})}{(\text{Lisis máxima} - \text{Target})} * 100$$

Los porcentajes de lisis específica fueron graficados en función de la concentración. El análisis estadístico fue realizado mediante el software PLA 3.0®, plataforma especializada en el análisis bioestadístico y específico para el análisis de paralelismo de curvas sigmoideas concentración dependientes. Mediante el *software* GraphPad Prism versión 4 se realizaron Test ANOVA de doble vía contrastado IC 95% para las curvas de Biosimilar y control comercial Rituximab, y Test ANOVA contrastado con Tukey para las comparaciones de los dos monoclonales con el control de isotipo. Diferencias significativas fueron consideradas con p valor < 0,05.

## RESULTADOS

### **Valoración de los niveles de expresión del antígeno CD20**

En primera instancia, se confirmó la expresión del antígeno de membrana CD20 en las líneas celulares con las cuales se evaluaron posteriormente las diferentes funciones del monoclonal. Se analizó por citometría de flujo y por inmunofluorescencia la presencia de dicho antígeno en las líneas celulares Jeko-1 y WIL2-S. En ambos casos se utilizó como anticuerpo primario anti-CD20 al monoclonal comercial Rituximab. Como muestra la Figura 1, se puede observar en ambas líneas celulares una positiva expresión del antígeno blanco en la casi totalidad de las células analizadas tanto mediante citometría de flujo (A y B) como por inmunofluorescencia (C y D) en donde se pudo observar una marcación específica de membrana para ambas líneas celulares.

Las medias geométricas de fluorescencia obtenidas fueron  $24,7 \pm 0,35$  y  $14,6 \pm 0,18$  (unidades de fluorescencia), para WIL2-S y Jeko-1 respectivamente. Se determinó que las células WIL2-S expresarían en mayor medida el antígeno CD20 que las Jeko-1.

### **Análisis de la capacidad de unión del Biosimilar**

En un primer acercamiento para el estudio de la función del biosimilar, se valoró su capacidad de unión al antígeno CD20 mediante FACS cuantitativo, comparándolo con Rituximab. En la figura 2A se puede observar el análisis para el lote de biosimilar 1301 con la línea celular WIL2-S, y en la figura 2B con la línea Jeko-1. Para ambas líneas celulares y con los diferentes lotes de biosimilar evaluados, no se encontraron diferencias significativas entre el biosimilar y Rituximab, tanto en el comportamiento de las curvas concentración-dependientes como en el índice de *Binding50* calculado a partir de la regresión lineal de las curvas. En la tabla I se listan los índices de *Binding50* de todos los lotes evaluados, contrastados con su respectivo control comercial, para ambas líneas celulares.

### **Genotipificación de la posición aminoacídica 158 del receptor FcγRIIIA**

Se genotipificaron 12 donantes voluntarios en la posición nucleotídica 559 de la secuencia del receptor FcγRIIIA, que deriva en el fenotipo expresado en la posición aminoacídica 158.

La primera estrategia consistió en la secuenciación de un fragmento de 460 pb con la posición del nucleótido de interés, y posterior secuenciación. A partir del alineamiento de las secuencias obtenidas se pudieron identificar 6 donantes fenilalanina positivos (A, B, C, I, J y K) y 6 donantes valina

positivos (D, E, F, G, H y L). Analizando los cromatogramas se pudieron identificar algunos donantes como heterocigotas, al presentar un nucleótido de menor abundancia en esa posición (G, H, L).

La segunda estrategia consistió en una PCR con amplificación (351 pb) sólo en aquellos donantes valina positivos (559G). Se identificaron posibles donantes con polimorfismo F/F donde no hubo amplificación, y 6 valina positivos (D, E, F, G, H y L). En la figura 3A se muestra un gel con las dos estrategias sobre los donantes A, B, C y D.

Debido a que las estrategias de genotipificación utilizadas no permitieron la correcta identificación de la condición de homocigosis o heterocigosis de los donantes, se llevó adelante una estrategia de *nested* PCR en donde se genera un amplicón de 94pb con el sitio de restricción para la enzima *NlaIII* sólo cuando el donante presenta un alelo con el fenotipo valina (FcyRIIIA -559G). La digestión enzimática de los amplicones obtenidos genera un patrón de bandas característico a cada polimorfismo que se describe como: una única banda de 94 pb en el caso de homocigotas 559-T/T (F/F), tres bandas (94 pb, 61pb y 33 pb) para heterocigotas y dos (33 pb y 61pb) para homocigotas 559-G/G (V/V) (figura 3B). Las muestras analizadas resultan en 6 donantes homocigotas para fenilalanina (FcyRIIIA-158F/F, 50%; donantes A, B, C, I, J y K), 3 donantes heterocigotas (FcyRIIIA-158V/F, 25%, donantes G, H y L) y 3 donantes homocigotas para valina (FcyRIIIA- 158V/V, 25%, donantes D, E y F).

### **Inducción de la respuesta biológica de ADCC**

La inducción de la respuesta de ADCC se evaluó por medición colorimétrica asociada a la liberación de la enzima LDH. Se utilizó una curva de concentración de anticuerpo y se comparó con Rituximab. El ensayo fue realizado con células blanco CD20 positivas Jeko-1 y células efectoras provenientes de donantes voluntarios de sangre con los polimorfismos FcyRIIIA-158 V/V y FcyRIIIA F/F.

La valoración de la actividad biológica de ADCC de los diferentes lotes de biosimilar se llevó a cabo con células efectoras del donante FcyRIIIA-158 V/V. El análisis estadístico ANOVA de doble vía no arrojó diferencias significativas entre las curvas de cada lote de biosimilar (1301, 1303, 1304 y 1305) y Rituximab ( $p > 0,05$ ), y la respuesta de cada biosimilar y su control comercial tuvieron diferencias significativas con respecto al control de isotipo en la mayor concentración de la curva ( $p < 0,001$ ). En la figura 4A, se muestran las curvas de respuesta obtenidas para el lote de biosimilar 1301 y Rituximab.

Se evaluó de la misma manera, la respuesta de ADCC para otro donante con polimorfismo FcyRIIIA 158F/F. Mediante Test ANOVA de doble vía contrastado con IC 95% no se encontraron diferencias significativas entre el biosimilar y rituximab para los lotes evaluados (1301 y 1305). Al comparar las respuestas obtenidas para la concentración más alta de anticuerpo utilizada, los monoclonales anti-CD20 no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero sí con respecto al control de isotipo (ANOVA contrastado con Tukey,  $p < 0,001$ ). En la figura 4B se muestra la respuesta con el lote 1301 con las células efectoras provenientes del donante FcyRIIIA-158 F/F.

Uno de los índices evaluados con el *software* PLA3.0 fue la potencia relativa, que se define como una medida de la similitud en la respuesta de un compuesto desconocido (biosimilar) en relación a un estándar conocido (Rituximab). El segundo fue el análisis del paralelismo de las curvas teniendo en cuenta la región lineal. La potencia obtenida para cada uno de los lotes de biosimilar resultó óptima, así como también se determinó la existencia de un paralelismo entre las curvas. En la Tabla II se detallan las potencias encontradas para cada lote con su respectivo intervalo de confianza del 95%.

Luego de evaluar la inducción de la respuesta de ADCC para cada donante de células efectoras por separado, se comparó la inducción de esta respuesta entre ellos. Se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de lisis específicos inducidos entre ellos, provocando una mayor inducción de ADCC el donante FcyRIIIA-158 V/V (homocigota valina) con respecto al donante FcyRIIIA-158 F/F (homocigota fenilalanina). Estos resultados pueden observarse en la figura 4C, donde se muestran las curvas de respuesta para cada donante con biosimilar y Rituximab.

### **DISCUSIÓN**

Como primer objetivo fue necesaria la valoración de la expresión del antígeno de membrana CD20 en las células estudiadas, Jeko-1 y WIL2-S, para poder continuar con los estudios sobre la función del biosimilar, ya que es un monoclonal dirigido específicamente al CD20, blanco selectivo base del diseño de la terapia. De manera satisfactoria se pudo confirmar mediante diferentes técnicas la presencia del mismo en las líneas celulares de estudio, determinando que las dos líneas celulares

evaluadas expresan casi en su totalidad el antígeno. En un análisis comparado de citometría de flujo, se determinó que la expresión de CD20 es mayor en la línea celular WIL2-S con respecto a la línea celular Jeko-1, evidenciada en el cociente de las medias geométricas de fluorescencia, siendo que mayor intensidad de fluorescencia es sinónimo de mayor expresión del antígeno. Esta mayor expresión se entiende como mayor densidad del antígeno presente en la membrana.

Una vez confirmada la expresión del antígeno se procedió al estudio sobre la capacidad de unión del biosimilar a su blanco. Se analizaron diferentes lotes con el fin de determinar la variabilidad de respuesta entre ellos. Para cada lote se obtuvo una curva en la cual aumenta el porcentaje de células unidas al biosimilar de manera concentración dependiente, no observándose diferencias significativas punto a punto con la curva realizada con Rituximab. Como índice de la capacidad de unión del biosimilar se informó el *Binding50*, valor de concentración de anticuerpo en la cual se obtiene un 50% de células marcadas. Realizando un análisis en detalle sobre estos valores, se corroboró que los *Binding50* junto con su intervalo de confianza del 95% se solapan entre el biosimilar y Rituximab, lo cual condice con el análisis estadístico que no arrojó diferencias significativas entre ambas curvas en cada ensayo realizado, para ambas líneas celulares. Si bien cada lote de biosimilar se asemeja con el control comercial, entre lotes se pueden apreciar pequeñas diferencias que se trasladan a los valores de *Binding50* obtenidos para cada uno de ellos. Estas diferencias podrían deberse a las condiciones de producción que, si bien se encuentran controladas, no son idénticas entre los distintos lotes de producción. De la misma manera, se observaron variaciones en los valores obtenidos para Rituximab. Si se considera que en todos los ensayos se utilizó el mismo anticuerpo control, estas diferencias podrían deberse a las condiciones inherentes de la técnica de citometría de flujo, los valores de expresión variantes en la línea celular que refieren a la complejidad de un sistema biológico, entre otros. Más allá de estas diferencias encontradas, el promedio general del *Binding50* del biosimilar (incluyendo todos los lotes) no presenta diferencias significativas con el promedio general de Rituximab.

Las curvas de Binding obtenidas fueron diferentes entre las líneas celulares utilizadas, en cuanto a las concentraciones necesarias para realizar el ensayo, lo que se puede justificar por las diferencias en la expresión del blanco informado anteriormente. Esto llevó a utilizar una curva con concentraciones menores de anticuerpo para la línea Jeko-1.

La unión de Rituximab a su célula blanco depende de su afinidad al antígeno que reconoce y de su concentración. En términos generales, se pudo determinar que el biosimilar evaluado presenta una afinidad por su antígeno similar al anticuerpo comercial, mostrando un comportamiento concentración dependiente comparable en la unión del antígeno blanco.

Una vez evaluada la unión del anticuerpo a su blanco, se continuó con la evaluación del mecanismo de acción principal del anticuerpo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. El mecanismo fue evaluado utilizando células efectoras de donantes genotipificados en la posición 158 del receptor FcγRIIIA. Como se comentó anteriormente, se encuentra reportado que esta inducción llevada a cabo por Rituximab es diferencial con respecto al polimorfismo en este receptor presente en las células del sistema inmune de pacientes, principalmente en la población NK. Se conoce que en pacientes con al menos una valina en la posición 158 se induce una respuesta mayor de lisis de células tumorales con respecto a los pacientes que no la poseen. Teniendo en cuenta esto se analizó la capacidad de inducción de ADCC, como se encuentra reportado para el anticuerpo licenciado, y la generación de una respuesta diferencial según el polimorfismo.

Se realizó la genotipificación de 12 donantes voluntarios de sangre periférica, para lo cual fue necesaria una extracción de ADN y diferentes estrategias basadas en PCR. En la posición 158 del receptor FcγRIIIA puede haber una valina o una fenilalanina, diferencia producida por la presencia de una G (codón GTT, valina) o una T (codón TTT, fenilalanina) en la posición 559 del gen. Teniendo en cuenta esto se diseñaron diferentes estrategias de genotipado complementarias entre sí, de forma de obtener mayor certeza en el resultado. Todas ellas fueron evaluadas in silico primeramente, de manera de asegurar su funcionamiento antes de llegar al trabajo experimental propiamente dicho.

Finalmente se encontró en la población analizada un 25% de individuos homocigotas para el aminoácido valina, 25% heterocigotas y 50% homocigotas para el aminoácido fenilalanina. Estos valores varían ligeramente de lo reportado (V/F 44,8%; F/F 37,9; V/V 17,2%), razón que puede deberse a que se utilizó una población pequeña en comparación con la que se utilizó para dicho análisis [16].

Del análisis de la genotipificación se seleccionaron los donantes D y A (FcRIIIA-158V/V y FcRIIIA-158 F/F, respectivamente), como donantes de las células efectoras para el ensayo de ADCC.

La lisis de las células tumorales fue medida por medio de un ensayo colorimétrico que permite cuantificar la liberación de LDH, una enzima citosólica estable. Las células que perdieron integridad de membrana liberan LDH al medio, por lo cual puede ser utilizada como indicador de citotoxicidad. El daño celular dependiente de anticuerpo mediado por diferentes tipos celulares, principalmente las células NK, ocasiona la inducción de apoptosis y posterior lisis de la célula blanco [18]. Esto pudo ser medido debido a que las células apoptóticas, después de incubaciones extendidas, finalmente bajan drásticamente el metabolismo, pierden la integridad de la membrana y liberan su contenido citoplasmático al medio de cultivo.

Los datos obtenidos de la lisis específica fueron analizados en el software PLA 3.0, un software especializado para el análisis del paralelismo de curvas sigmoideas características de respuestas concentración dependiente. Con este análisis se pudo comprobar para los dos donantes evaluados el paralelismo entre las curvas de cada lote de biosimilar y su respectiva curva control con el anticuerpo comercial. Además fue calculado el índice de potencia relativa, valor que refiere la respuesta obtenida de un compuesto desconocido (el biosimilar en este caso) referida a la respuesta de un compuesto estándar conocido al que se pretende emular (Rituximab), hallando una potencia óptima (cerca a 1) para todos los lotes del biosimilar en ambos donantes. Esto permitió corroborar el funcionamiento de Rituximab, pero principalmente permitió comprobar que el anticuerpo biosimilar desarrolló la misma respuesta concentración dependiente relativa a la inducción de la respuesta biológica de ADCC que el compuesto de referencia.

Es importante destacar que la determinación de la inducción de ADCC fue evaluada en los donantes homocigotas FcγRIIIA-158V/V (D) y FcγRIIIA-158F/F (A), encontrándose una respuesta de lisis in vitro de las células tumorales mediada por las efectoras de los mismos en ambos casos, con Rituximab y con el biosimilar. Este dato permite afirmar que el biosimilar funciona para ambos fenotipos, como se encuentra reportado para el monoclonal licenciado. Sin embargo, en un análisis comparativo de la respuesta obtenida entre los dos donantes, se pudo comprobar que la respuesta generada con el biosimilar por donantes homocigotas para valina en la posición 158 del receptor FcγRIIIA (aproximadamente 50%) es significativamente superior a la producida para homocigotas fenilalanina (aproximadamente 25%), tal como se encuentra reportado para el anticuerpo comercial [17].

Si bien los valores de lisis obtenidos para ambos donantes fueron suficientes para poner en evidencia la importancia del genotipo y el funcionamiento del mecanismo, no se alcanzaron en ninguno de los casos valores superiores al 50% de lisis, lo cual podría deberse a la presencia de varios tipos celulares impidiendo el encuentro de los agentes necesarios para que se desencadene la respuesta de ADCC, o de anticuerpo unido a la célula blanco y titulado por otro tipo celular. A modo de mejorar la técnica desarrollada, podría proponerse la purificación de las células NK como únicas efectoras en el ensayo.

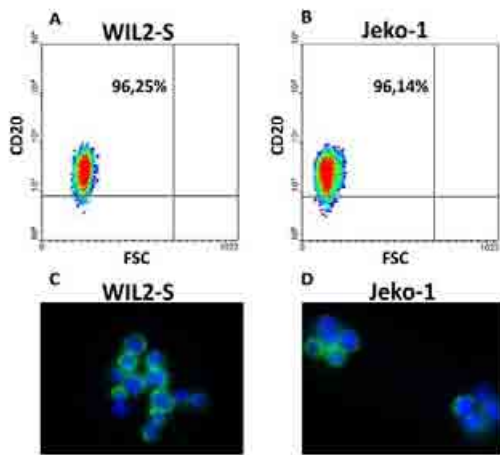
Los datos obtenidos en este trabajo permiten afirmar que el biosimilar muestra una biocomparabilidad con el biológico de referencia (Rituximab), en su función de *Binding* y en la inducción del mecanismo de acción por excelencia, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

En este trabajo se validó la actividad biológica de dicho biosimilar de Rituximab, precisamente en la inducción de ADCC, por ser el mecanismo de acción por excelencia del biofármaco licenciado. Se encontraron resultados ampliamente satisfactorios, lo que se resuelve en un panorama muy favorable en la continuación del camino que debe seguir el biosimilar para ser aprobado por las autoridades regulatorias y finalmente salir al mercado. El desarrollo de esta plataforma no presente en el país, permite al laboratorio establecer las bases para el análisis de la actividad biológica de otros biosimilares de Rituximab así como también de monoclonales dirigidos no sólo contra la molécula de CD20, sino también contra otros antígenos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) A.N.M.A.T, disposición, 7729/11 biológicos con antecedentes.
- 2) Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6:443-6.
- 3) Cooley S, Burns LJ, Repka T, Miller JS. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol.* 1999; Oct 27(10):1533-41.
- 4) DrugBank DB00073.
- 5) Fikes, Bradley J. Why San Diego Has Biotech, San Diego Metropolitan, April 1999. Accessed June 20, 2008.
- 6) Gluck WL, Hurst D, Yuen A, et al: Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response. *Clin Cancer Res* 2004;10:2253-2264
- 7) Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, Hunter ZR, Ciccarelli BT, Verselis S, et al. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fcγ3R13A-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2561-4. Epub 2007 May 2.
- 8) ICH Topic Q 6 B. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.
- 9) Janakiraman N, McLaughlin P, White CA, et al: Rituximab: Correlation between effector cells and clinical activity in NHL. *Blood* 1998; 92:337a.
- 10) Koene HR, Kleijer M, Alegra J, Roos D, von dem Borne AE and de Haas M. Fc gammaR13A-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaR13A, independently of the Fc gammaR13A-48L/R/H. 1997. *Blood*, 90, 1109-1114.
- 11) Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti CD20 monoclonal antibody in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:2188-95.
- 12) McLaughlin et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *JCO* Aug 1, 1998:2825-33.
- 13) Mitchell R Smith. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7359-7368.
- 14) Pillay V, Gan HK, Scott AM. Antibodies in oncology. *N Biotechnol* 2011; 28: 518-529.
- 15) Pillay V, Allaf L, Wilding AL, Donoghue JF, Court NW, Greenall SA, Scott AM, Johns TG. The plasticity of oncogene addiction: implications for targeted therapies directed to receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 2009; 11: 448-458.
- 16) Steven P. Treon, Mark Hansen, Andrew R. Branagan, Sigitas Verselis, Christos Emmanouilides, Eva Kimby, et al. Polymorphisms in FcγR13A (CD16) Receptor Expression Are Associated With Clinical Response to Rituximab in Waldenström's Macroglobulinemia. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23:474-481.
- 17) Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, et al. Polymorphisms in FcγR3A (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2005; 23:474-81.
- 18) Vance BA<sup>1</sup>, Huizinga TW, Wardwell K, Guyre PM. Binding of Monomeric Human IgG Defines An expression Polymorphism of FcγR13 on Large Granular Lymphocyte/natural Killer cells. *J Immunol.* 1993 Dec 1; 151(11):6429-39.

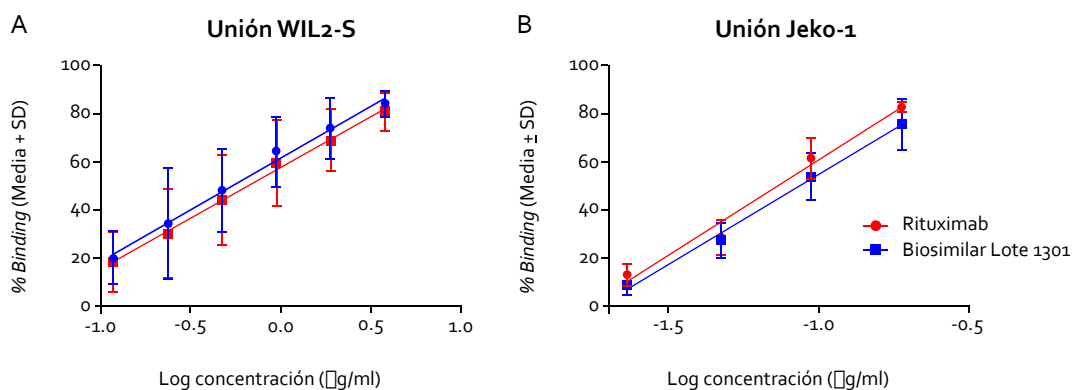
## ANEXO



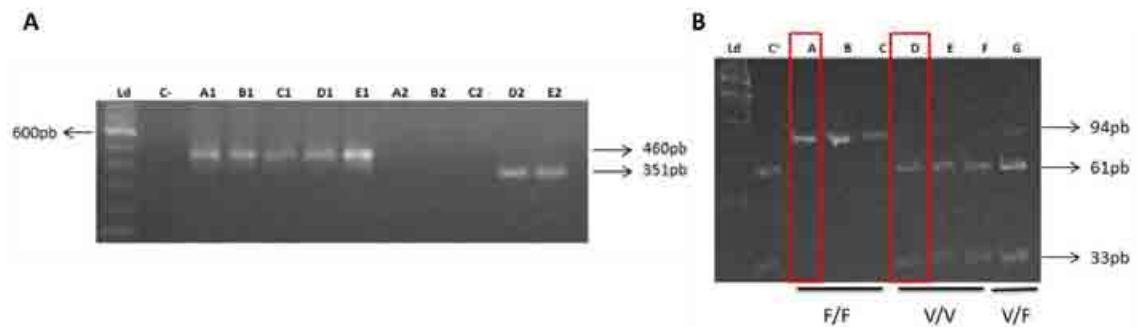
**Figura 1.** Evaluación de la expresión de CD20 en dos líneas celulares de linfocitos B. Citometría de flujo en las líneas celulares WIL2-S (A) y Jeko-1 (B). Inmunofluorescencias de las líneas celulares WIL2-S (C) y Jeko-1 (D). Aumento final 100X

<i>Binding</i> <sub>50+</sub> IC <sub>95</sub> %				
	WIL2-S		Jeko-1	
Lote	Rituximab	Biosimilar	Rituximab	Biosimilar
1301	0,646 ± 0,067	0,524 ± 0,082	0,073 ± 0,006	0,092 ± 0,011
1303	0,325 ± 0,050	0,310 ± 0,101	–	–
1304	0,368 ± 0,063	0,357 ± 0,070	–	–
1305	0,384 ± 0,110	0,462 ± 0,090	0,076 ± 0,012	0,066 ± 0,016

**Tabla I.** Listado de *Binding*<sub>50</sub> de biosimilar y Rituximab, obtenidos con células WIL2-S y Jeko-1. Con WIL2-S, el promedio general de Rituximab fue de 0,431 ± 0,231 µg/ml y el promedio general del biosimilar fue de 0,413 ± 0,155 µg/ml siendo la diferencia ns (T. Test no apareado p=0.91). Para Jeko-1 el promedio general para Rituximab fue de 0,075 + 0,019 µg/ml y el promedio general para el biosimilar fue de 0,079 + 0,165 µg/ml siendo la diferencia ns (T. Test no apareado p=0.84).



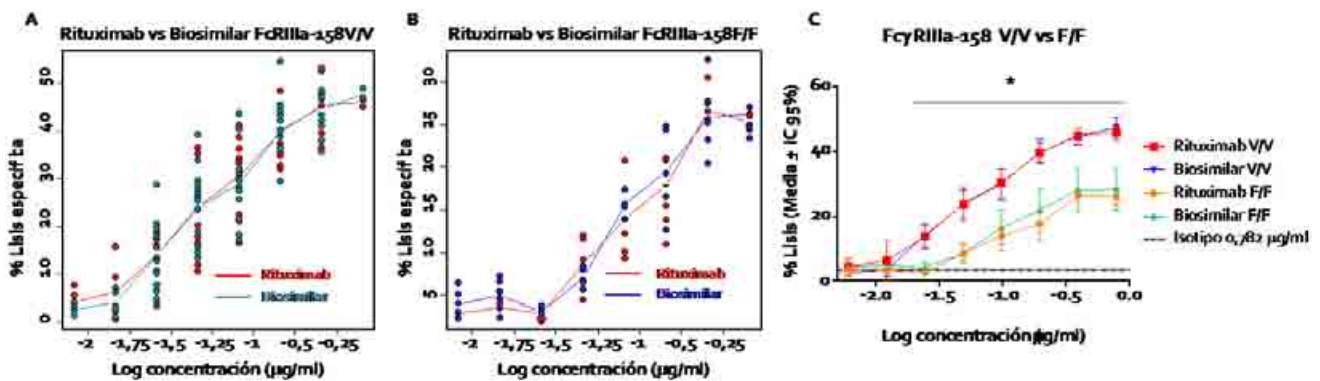
**Figura 2.** Ensayo de biocomparabilidad entre Rituximab y el biosimilar en células WIL2-S y Jeko-1. Curva de % *Binding* en función de la concentración de monoclonal. ANOVA de doble vía contrastado con IC<sub>95</sub>%, ns  $p > 0.05$ , para ambas líneas celulares. Regresión lineal,  $p < 0.001$ . Gráficas correspondientes a 10 ensayos independientes. A) Línea celular WIL2-S, Rituximab  $R^2 = 0,097$  ( $Binding_{50} = 0,646 + 0,067 \mu\text{g/ml}$ ) y biosimilar  $R^2 = 0,992$  ( $Binding_{50} = 0,524 + 0,082 \mu\text{g/ml}$ ). B) Línea celular Jeko-1, Rituximab  $R^2 = 0,981$  ( $Binding_{50} = 0,073 + 0,006 \mu\text{g/ml}$ ) y biosimilar ( $Binding_{50} = 0,092 + 0,011 \mu\text{g/ml}$ )  $R^2 = 0,995$ .



**Figura 3.** A) Amplificación de fragmentos de 351 pb y 460 pb correspondiente a la secuenciación (1) y PCR SNP (2), respectivamente. Ld: Ladder 100 pb, C-: control negativo sin molde. Las demás calles presentan la letra correspondiente a cada donante voluntario (A a E) y el número indica la estrategia utilizada. B) Productos de digestión con *NlaIII* del fragmento de 94 pb resultado de *Nested* PCR. Homocigotas T/T única banda de 94 pb, heterocigotas G/T bandas 94pb, 61 pb y 33 pb; homocigotas G/G, bandas 33pb y 61pb. Ld: *Ladder* 25 pb. C+: Control positivo con secuencia sintética FCGR3IIIA-559G. Las demás calles llevan el nombre del donante analizado. Los donantes marcados son los que se utilizaron para los análisis posteriores. Los productos de digestión fueron comparados con el control sin digerir.

Potencia Relativa+ IC95%		
Lote Biosimilar	FcγRIIIa-158 V/V	FcγRIIIa-158 F/F
1301	0,949 ± 0,191	1,085 ± 0,208
1303	0,916 ± 0,238	–
1304	1,061 ± 0,213	–
1305	0,929 ± 0,189	0,831 ± 0,159

**Tabla II.** Índices de potencia relativa con IC 95% de todos los lotes evaluados de biosimilar, obtenidos con análisis del software PLA 3.0. Donante FcγRIIIA V/V.



**Figura 4.** Respuesta de ADCC desencadenada por biosimilar Lote 1301 en comparación con Rituximab. A) Respuesta con células efectoras de donante D FcγRIIIA V/V, *software* PLA 3.0. Mediante ANOVA de doble vía contrastado con IC 95% no se encontraron diferencias significativas, ns p>0.05. Resultado correspondiente a 5 ensayos independientes. B) Respuesta con células efectoras de donante A FcγRIIIA F/F, PLA 3.0. Mediante ANOVA de doble vía contrastado con IC 95% no se encontraron diferencias significativas, ns p>0.05. Resultado correspondiente a 3 ensayos independientes. C) Respuesta de ADCC comparativa entre donantes con fenotipos FcγRIIIA V/V y F/F. ANOVA de doble vía contrastado con IC95%, \* p<0.01.

## **PARTICIPACIÓN DE RSP03 EN EL DESARROLLO DE TUMORES MAMARIOS DE FENOTIPO BASAL**

**Carla M. Felcher**

Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA y CONICET

**Directora:** Edith C. Kordon

### **RESUMEN**

Los R-spondins (Rspos: roof plate specific spondins) son una familia de cuatro proteínas secretoras que, en los últimos años se encontraron implicado en procesos tales como el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y las enfermedades humanas, y fueron propuestos como potentes factores de crecimiento para Células Madre con posibles aplicaciones terapéuticas. Se ha postulado que las diferencias entre los subtipos tumorales podrían deberse a que se originan a partir de distintos tipos celulares y que esto se relaciona con el patrón molecular de estos tumores. En particular, en los tumores mamarios presentan distintos fenotipos. Algunos son basales con baja expresión de receptores para estrógenos y progesterona (ER-PR-) y otros luminales, que expresan altos niveles de estos receptores (ER+PR+). En este trabajo nos propusimos estudiar la expresión y secreción de Rsp03 en líneas tumorales mamarias humanas. Hallamos que luego del tratamiento con heparina soluble, se produce un enriquecimiento de Rsp03 en el medio condicionado dado que Rsp03 una vez secretado interactuaría con la matriz extracelular. Además, se encontró que las líneas celulares de tumor mamario basales MDA-MB 231 y Hs578T expresan mayores niveles de Rsp03 que las células luminales MCF7 y T47D. También se halló que Rsp03 parece estar localizado en el citoplasma y la membrana celular. Durante este período, también se mejoró la técnica de inmunohistoquímica para completar el perfil de expresión de Rsp03 en cortes histológicos provenientes de tumores de mama humanos. Por último, a partir de análisis bioinformáticos de la secuencia aminoacídica se encontró que Rsp03 tenía sitios potenciales de glicosilación, lo que podría explicar la doble banda observada en la línea celular MDA-MB 231 por Western blot, y podría estar relacionado con un patrón de glicosilación aberrante producto del proceso tumoral.

### **ABSTRACT**

R-spondins (Rspos: roof plate specific spondins) is a family of four secreted proteins. Over the last years, they have been implicated in significant processes like embryonic development, tissue differentiation and human diseases, and they have been postulated as potent stem cells growth factors for therapeutic applications. It has been postulated that the differences between tumor subtypes are caused by their origin in various cell types and it is related with the molecular pattern of these tumors. In particular, mammary tumors have different phenotypes, some of them express hormone receptors (ER+ PR+) and are considered are luminal, while others do not express those proteins (ER-PR-) and are considered basal cancers.

In this project, it is proposed to study the expression and secretion of Rsp03 by human mammary tumor cells. It was found that after treatment with soluble heparin, Rsp03 enrichment occurs in the conditioned medium since, once secreted, Rsp03 interacts with the extracellular matrix. It was also found that basal mammary tumor cell lines MDA-MB 231 and Hs578T express higher levels of Rsp03 than the luminal-like cells MCF7 and T47D. The group also found that Rsp03 seems to be located in the cytoplasm and cell membrane. During this period, the immunohistochemical technique was also improved to complete the expression profile of Rsp03 in histological sections from human mammary tumors. Finally, using bioinformatic analysis of amino acid sequence it was found that Rsp03 had potential glycosylation sites, which could explain the double band observed in the human breast cancer cell line MDA-MB231 by western blot, and could be related with a pattern of aberrant glycosylation product of the tumor process.



## INTRODUCCIÓN

En el mundo entero el cáncer de mama es diagnosticado en más de un millón de mujeres cada año [9]. Aunque las mayores incidencias fueron halladas en América del Norte y Europa, tanto la Argentina como Uruguay muestran índices de mortalidad muy altos, similares a esas regiones del hemisferio norte [13]. Como lo indican los datos aportados por el Instituto Nacional del Cáncer de nuestro país [17] en mujeres de la Argentina, el tumor de mama es el tipo de neoplasia más frecuente y es la primera causa de muerte por cáncer. Al desarrollarse en un órgano que no es vital para la supervivencia de la mujer afectada, la remoción quirúrgica del tumor primario es una operación relativamente sencilla de bajo riesgo para la paciente. Sin embargo, la alta tasa de mortalidad revela que la incidencia es muy alta y que en muchos casos existen limitaciones terapéuticas para frenar la diseminación e invasión a órganos vitales.

El cáncer de mama constituye en realidad un grupo heterogéneo de enfermedades. Esto ha sido confirmado por el hallazgo de perfiles moleculares usando tecnología de microarreglos que demuestran que la heterogeneidad biológica y de respuesta clínica de los cánceres mamarios puede ser explicada por las diferencias a nivel molecular del patrón de expresión de los tumores primarios [4]. Se ha postulado que las consistentes diferencias entre los subtipos tumorales podrían deberse a que se originen a partir de distintos tipos celulares. De hecho, se describen subtipos de tumores mamarios que poseen un patrón de expresión similar al de las células luminales (aquellas que dan a la luz de conductos y alvéolos) y otros que poseen un patrón semejante al de las células basales, que no son secretorias, y se encuentran entre las células luminales y la lámina basal (matriz extracelular) que rodea a la glándula. Los tumores luminales expresan receptores para estrógenos y progesterona (ER+PR+), mientras que el subtipo basal se caracteriza por ser triple-negativo (ER-, PR-, y HER2-negativo). Por otro lado existe otro subtipo de tumores que se caracterizan por la amplificación y alta expresión del gen ERBB2 (también conocido como HER2 o HER2-neu) [15].

Los genes R-spondins (Rspos: roof plate specific spondins) codifican para una familia de proteínas secretorias en vertebrados [10,11]. Todos los miembros de esta familia contienen un dominio Thrombospondin-like y dos dominios ricos en cisteína en el extremo N-terminal que están presentes en factores de crecimiento como el IGF (Insulin-like Growth Factor). Están involucrados en el desarrollo embrionario, en la diferenciación de tejidos en humanos, ranas y ratones, en enfermedades humanas, y se los postula como una promesa terapéutica como potentes factores de crecimiento de células madre [8,16,6].

La cascada Wnt está involucrada en diferentes estadios del desarrollo normal y la carcinogénesis mamaria [12]. Recientemente se encontró que los miembros de la familia Rspo son los ligandos endógenos de Lgr5, que es un gen blanco del pathway Wnt que codifica para un receptor de 7 pasos de membrana, que fue identificado como un marcador de poblaciones stem en el intestino delgado, colon [1], estómago [2] y folículo piloso [3]. Además, se observa que su expresión es necesaria para el desarrollo de la mama durante la pubertad [12]. De esta manera, se determina que miembros de la familia de Rspos modulan positivamente la cascada canónica de Wnt como ligandos de Lgr5 que, a su vez, interactúa con los receptores Frizzled/Lrp activados [14]. A su vez, la activación de la vía de Wnt se vio asociada en humanos a la progresión de tumores de fenotipo basal que es el más agresivo. Los casos de fenotipos basales se pueden asociar molecularmente con una alta expresión de Vimentina, que se toma como marcador de células basales-mesenquimales.

Desde su formación en el año 1998, este grupo de trabajo investiga los mecanismos que subyacen a la transformación de las células mamarias y la consecuente generación de cánceres mamarios. Entre otros resultados, se pudo determinar que ciertas cepas del virus del tumor mamario murino (MMTV) inducen lesiones mamarias ER+PR+ [5]. Estos pequeños tumores progresan luego a un fenotipo hormono-independiente con pérdida de expresión de receptores hormonales. Este proceso también se produce a partir de pequeñas lesiones "dormidas" que resurgen luego de largos períodos de latencia. Análisis de las características histológicas y moleculares indican que esta progresión se debe a la activación de la cascada Wnt [7]. Estando esta activación asociada, en algunos casos, a la inducción del gen R-spondin 3 (Rspo3) por inserciones virales en las cercanías de la zona promotora [8]. La capacidad oncogénica de Rspo3 en células mamarias fue luego verificada y ratificada por otros grupos de investigación [16]. En otros resultados obtenidos previamente en este laboratorio, se observó que

Rspo3 se expresa diferencialmente en las células de ratón de estirpe basal tanto normales como tumorales.

Basados en estos datos, nuestra hipótesis es que Rspo3 es expresado por células tumorales humanas de estirpe basal y que una vez secretada, la proteína Rspo3 interactuaría con componentes de la matriz extracelular o la cara externa de la membrana plasmática permaneciendo así en el nicho de las células basales. Por lo tanto nos proponemos determinar la presencia e involucramiento de Rspo3 en células tumorales mamarias de fenotipo basal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Líneas celulares***

-MCF10A: no-tumoral. Medio completo: DMEM/F12 con 10% SFB e insulina (2ug/ml). -MCF7: tumoral, luminal, ER+ PR+. Medio completo: DMEM con 10% Suero fetal bovino (SFB) e insulina (2ug/ml)

-T47D: tumoral, luminal, ER+ PR+. Medio completo: RPMI-1640 con 10%SFB -Hs578T: tumoral, basal, ER-PR-HER2-. Medio completo: DMEM/F12 con 10% SFB e insulina (2ug/ml).

-MDA-MB231: tumoral, basal, ER- PR- HER2-. Medio completo: RPMI-1640 con 10%SFB Todas las líneas celulares mencionadas son de mama humana y se cultivaron en placas de plástico de 100 mm en una estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***Tratamientos con Heparina o KClO<sub>3</sub>. Obtención de medios condicionados***

Se sembraron 150.000 células en placas de 100mm con el medio completo correspondiente y se dejaron crecer 24hs. Se descartó el medio, se lavó tres veces con PBS 1X y se agregó medio sin suero y según correspondiera Heparina soluble en concentraciones finales entre 10ug/mL y 80ug/mL o KClO<sub>3</sub> en concentraciones finales entre 10mM y 50mM. Se incubó durante 24hs y luego se pasó el medio condicionado a un microtubo, se centrifugó 2 minutos a 5000 rpm para eliminar los restos celulares y se conservó a -20°C. Para concentrar las proteínas de los medios condicionados se colocaron 6 volúmenes de Acetona y dejó precipitando a -20°C toda la noche. Luego se centrifugó 15 minutos a 4500rpm y 4°C y los pellets obtenidos se resuspendieron en Buffer de Siembra con Beta Mercaptoetanol y se trataron durante 10 minutos a 100°C. A las placas de cultivo se les realizó extracción de proteínas.

### ***Extracción de proteínas y Western blot***

Se extrajeron proteínas utilizando buffer de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Luego se realizaron ciclos de congelamiento y descongelamiento a -80°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método Bradford (Bradford, 1976) y la curva de calibración se realizó con concentraciones crecientes (1-10 µg/µl) de albúmina sérica bovina (BSA). Las muestras se mezclaron en Buffer de Siembra con Beta mercaptoetanol y se trataron durante 10 minutos a 100°C.

Se realizó una separación por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 12%. Luego se transfirió a una membrana de PVDF y bloqueo con una solución 5% de leche descremada en PBS tween. Se incubó toda la noche con anti-Rspo3 (R&D Systems) en dilución 1:800. Luego se realizaron lavados y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente en dilución 1:5000. Como control de carga para los extractos totales se utilizó Beta tubulina (Santa Cruz Biotechnology).

### ***Extracción de ARN***

Para extraer el ARN de células en cultivo se descartó el medio, los pocillos fueron lavados con PBS 1X y se les agregó Trizol Reagent (InvitrogenTM, Frederick, MD). Se procedió según las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se guardó a -80°C resuspendido en agua MilliQ.

### ***Síntesis de ADN copia a partir de ARN***

El cDNA se generó a partir de 2 µg de ARN incubados en un termociclador (MinicyclerTM, MJResearch) con 200U de una enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega, Madison, WI) durante 60 minutos a 41°C seguido de 3 minutos a 95°C en presencia de buffer de transcripción 1X, 0,5 µl de un primer oligodT (dT15) (Biodynamics SRL, Buenos Aires, Argentina), 2 µl de mezcla de 10mM de dNTPs (Promega, Madison, WI) y 20U de inhibidor de RNAsas (RNAsin, Promega, Madison, WI) en un volumen final de 20µl.

### ***PCR Cuantitativa en Tiempo Real (qRT-PCR)***

Las reacciones de amplificación fueron realizadas a partir de 5-500 ng de cDNA en un volumen final de 25 µl. Para esto se utilizaron 1,75 µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Invitrogen™, Frederick, MD), 0,5 µl de mezcla de 10mM de dNTPs (Promega, Madison, WI), 0,05 µg de cada primer, 1,25U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen™, Frederick, MD) con su respectivo buffer 1X y 1:30000 SYBR Green (Molecular Probes Inc, Eugene, OR). La normalización de los datos fue realizada por medición de la cantidad de ARNm de TBP (TATA binding protein) usando la misma técnica de qRT-PCR.

### ***Reacción con PNGasa***

Se tomó 1µg de proteína recombinante Rspo3 (R&D Systems) y se suspendió en el buffer de desnaturalización de la enzima. Se calentó durante 10 minutos a 100°C y se agregó Buffer de reacción G7 y NP-40. Se agregaron 2µL de PNGase F (Biolabs) y se incubó a 37°C durante 15 horas. La reacción se detuvo por agregado de Buffer de siembra con Beta Mercaptoetanol. El control se realizó de la misma manera pero agregando Buffer G7 en lugar de PNGasa.

### ***Inmunofluorescencia***

Se sembraron 80.000 células sobre porta de vidrio dentro de placas de 35mm y se crecieron en medio completo hasta alcanzar un 70% de confluencia. Luego se realizaron lavados con PBS 1X, se fijaron las células por tratamiento con Formaldehído durante 30 minutos. Luego se lavó con PBS 1X y se permeabilizaron con Triton 0,02%. Se bloqueó con BSA 3% durante 90 minutos y se incubó toda la noche a 4°C con anti-Rspo3 humano (Sigma) en dilución 1:100. Luego se lavó con PBS 1X y se incubó con anticuerpo secundario fluorescente Alexa 532 (rojo) en dilución 1:200 durante 90 minutos. Por último se lavó con PBS 1X, se incubó con DAPI 1X durante 10 minutos y se realizó el montaje con Glicerol 80%. Se observaron las imágenes en un microscopio confocal.

### ***Inmunohistoquímica***

Los cortes de tejido fueron desparafinados en xileno y a continuación fueron tratados con un gradiente decreciente de etanol con fines de re-hidratar las muestras. Luego la actividad peroxidasa endógena fue inhibida mediante el tratamiento con una solución al 7% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol por 30 minutos. Luego se lavó con H<sub>2</sub>O bidestilada seguido del bloqueo con una solución 5% de suero (kit Elite ABC, Vector Laboratories) en PBS 1X durante 60 minutos en cámara húmeda. Los cortes fueron luego incubados en la misma cámara toda la noche a 4°C con anti-Rspo3 humano (Sigma). Luego de un lavado con PBS 1X, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (kit Elite ABC, Vector Laboratories) en una relación 1:500 durante 120 minutos. Las reacciones antígeno-anticuerpo fueron detectadas utilizando el complejo Avidina Biotina (kit Elite ABC, Vector Laboratories) luego de incubar en oscuridad durante 30 minutos. Se reveló con diaminobencida (DAB Chromogen) activada previamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> siendo el tiempo máximo de incubación 10 minutos. Para contrastar la marca positiva se utilizó la tinción de núcleos por hematoxilina al 10% durante unos pocos segundos.

Finalmente, se deshidrataron los cortes por sucesivos pasajes por alcoholes de graduación creciente y xileno para luego montarlos utilizando un medio de montaje sintético para microscopía. Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por PBS 1X. Los cortes fueron observados por medio de un microscopio óptico Olympus cx31.

## **RESULTADOS PRELIMINARES**

### ***Perfil de expresión de RSPO3***

Uno de los objetivos de este proyecto es el de conocer el perfil de expresión de Rspo3 en líneas celulares mamarias humanas de distintas características.

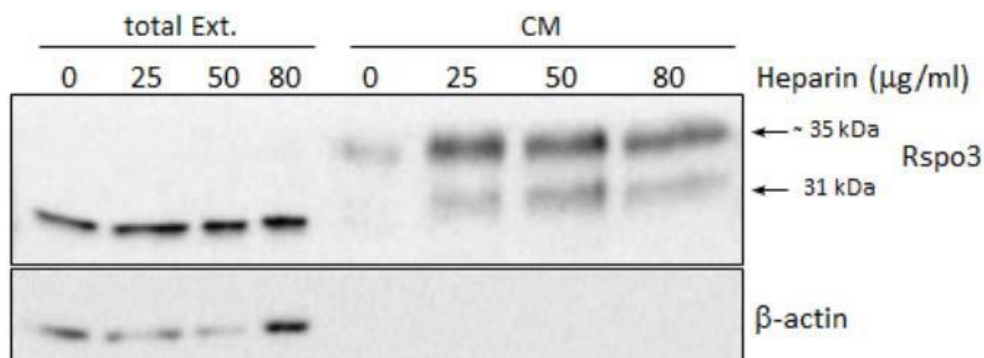
Con el fin particular de analizar la expresión proteica de Rspo3 en el contenido celular de las diferentes líneas, se realizó un Western blot en el que se observó mayor abundancia de Rspo3 en las líneas celulares basales MDA-MB 231 y Hs578T (triple negativas) que en la línea no-tumoral MCF10A en la cual se expresa pobremente (Figura 1). Las líneas MCF7 y T47D (ER+PR+) presentaron un nivel de expresión intermedio, siendo mayor en las MCF7 que en las T47D. Esto se condice con lo hipotetizado,

es decir que Rspo3 se encuentra más representado en las líneas celulares basales, de fenotipo agresivo que en las luminales y más aún que en las no- tumorales.



**Figura 1** - Niveles de proteína Rspo3 en líneas celulares. Western blot

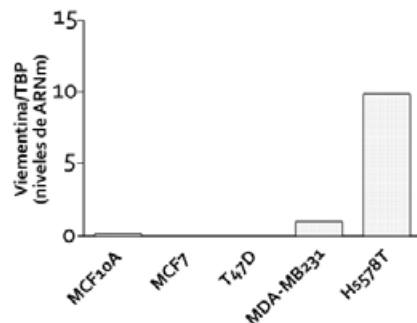
Dado que está reportado que Rspo3 es una proteína de secreción, y que sin embargo su detección por Western blot en los medios condicionados resulta muy dificultoso, se procedió a realizar un ensayo de enriquecimiento de los mismos. Bajo la hipótesis de que una vez secretado Rspo3 interaccionaría con la membrana plasmática o componentes de la matriz extracelular, y por este motivo no se lograría su detección por western blot se trataron las células con Heparina soluble, la cual compite con los Heparan sulfatos produciendo por consiguiente el despegado de Rspo3 o con KClO<sub>3</sub>, el cual reduce la sulfatación de proteoglicanos, produciendo el mismo efecto. Las concentraciones de estos compuestos fueron puestas a punto (Figura 2) y según el efecto observado se optó por seguir trabajando con Heparina soluble en concentración final de 50ug/μL. Para poder establecer una comparación con lo estudiado en líneas celulares murinas, se realizaron en paralelo los mismos ensayos con la línea celular mamaria murina SCg6 (no se muestra la figura). Ambas líneas celulares estudiadas son de fenotipo basal. El efecto obtenido fue el deseado, pudiendo observar un enriquecimiento en la banda de Rspo3 en los medios condicionados. Estos resultados confirman que en la línea celular MDA-MB231, Rspo3 secretado permanece adherido a la matriz extracelular. Rspo3 secretado quedaría unido a las células detectándose como parte de los componentes celulares, mientras que al realizar el despegado de Rspo3 por medio del tratamiento con Heparina o KClO<sub>3</sub>, quedarían solubles fuera de la célula y por lo tanto sería posible detectar su presencia en los medios condicionados. Estos resultados sugieren que Rspo3 una vez secretado permanecería en el nicho de las células basales mamarias, interactuando con la cara externa de la membrana plasmática o componentes de la matriz extracelular.



**Figura 2** - Niveles de proteína en contenido celular y en medio condicionado. Enriquecimiento por tratamiento de MDA-MB231 con Heparina. Total Ext: Extracto total, contenido proteico celular. CM: Medio Condicionado, proteínas secretadas al medio de cultivo. Bandas observadas de 32 y 35kDa

Con el objetivo de relacionar el perfil de expresión proteico con el de ARNm de Rspo3 en líneas celulares tumorales humanas con distintos fenotipos, nos propusimos realizar la técnica de PCR en Tiempo Real (qPCR), para lo que en primer lugar se realizó la puesta a punto de los primers específicos para Rspo3. Por otro lado, también se realizó la puesta a punto de los primers de Vimentina a fin de utilizarlo como marcador basal-mesenquimal y así poder diferenciar las líneas celulares basales, de

fenotipo más agresivo, de las luminales hormonodependientes, cuyo fenotipo es menos agresivo y de esta manera poder relacionar la expresión diferencial de Rspo3 con el fenotipo de cada célula. El perfil de expresión de Vimentina para cada línea celular analizada, indicó que las líneas MDA-MB231 y Hs578T, ambas ER-PR-HER2 negativo, son las que presentaron mayor expresión de ARNm de vimentina con respecto a las líneas MCF10A, T47D y MCF7 (Figura 3). Este resultado concuerda con lo esperado, indicando que las células MDA-MB231 y Hs578T, que son hormono-independientes



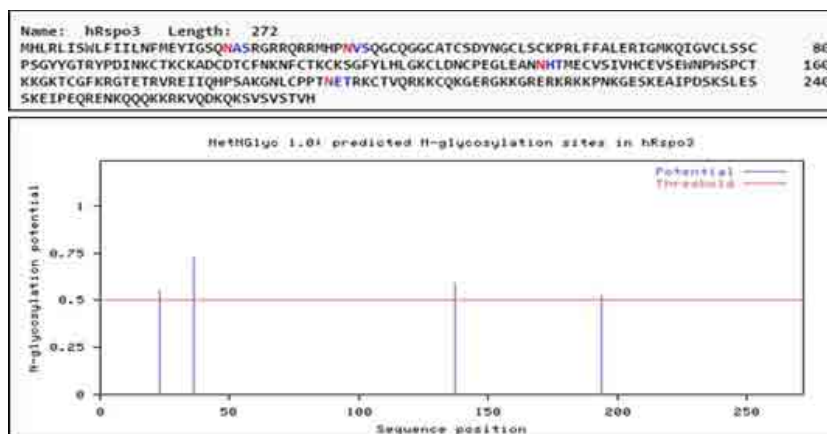
presentan un fenotipo basal-mesenquimal, es decir más agresivo. Por su parte, las líneas celulares T47D y las MCF7, ER+PR+, presentan una expresión de vimentina indetectable, en concordancia con su fenotipo luminal hormonoindependiente.

**Figura 3** - Expresión de Vimentina por RT-qPCR como marcador basal-mesenquimal

#### Estudio del perfil de glicosilación

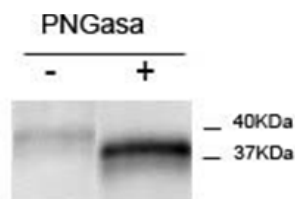
Durante la realización del análisis de enriquecimiento del contenido de Rspo3 en los medios condicionados de distintas líneas celulares vimos que en el caso de la línea celular MDA MB-231, el Rspo3 aparece representado en más de una banda en los western blots, es decir una banda en su peso esperado según lo reportado en la literatura (31kDa) y otra alrededor de los 35kDa (Figura 2). Esta nueva banda, nos llevó a pensar en la existencia de una modificación en la proteína humana que no estuviera reportada, hipotetizando que la nueva banda podría deberse a una diferencia de migración producto de la misma.

Este resultado, que no se observó en los ensayos previos realizados en nuestro laboratorio con la línea mamaria murina basal Scg6, nos llevó a realizar un análisis in silico de la secuencia de Rspo3 humana identificando que existen sitios conservados para la N-glicosilación en la misma (Figura 4) y que dichas modificaciones sobre Rspo3 no se encuentran aún reportadas en la literatura. Teniendo esto en cuenta, y que una característica tumoral es que suele presentar un perfil de glicanos alterados, se considera relevante analizando esta posible modificación.



**Figura 4** - Secuencia aminoacídica de la proteína Rspo3 humana (letra roja: Asn potencialmente glicosiladas; letra azul: secuencia consenso), y análisis de los potenciales sitios de N-Glicosilación mediante el programa NetNGlyc 1.0 Server (Technical University of Denmark).

Para estudiar el perfil de glicosilación de Rsp03 en la línea celular MDA-MB231, procedimos a realizar digestiones con la enzima PNGasa (EndoF), la cual actúa sobre la base de las N-Glicosilaciones separándolas del péptido asociado, esperando observar por western blot un desplazamiento de la banda glicosilada luego de ser digerida por la enzima hacia una zona de menor peso molecular producto de la pérdida del azúcar. Como primer paso, para tener un indicio más de que era posible que se tratase de una glicosilación, se realizó la digestión de una alícuota de proteína recombinante Rsp03 (R&D Systems) con PNGasa en las condiciones indicadas por el fabricante (Figura 5) y se observó que se produjo un desplazamiento de la banda entre el fragmento digerido y el no digerido, es decir que la PNGasa actuó sobre el Rsp03 recombinante produciendo una desglicosilación y por consiguiente un desplazamiento en el gel.

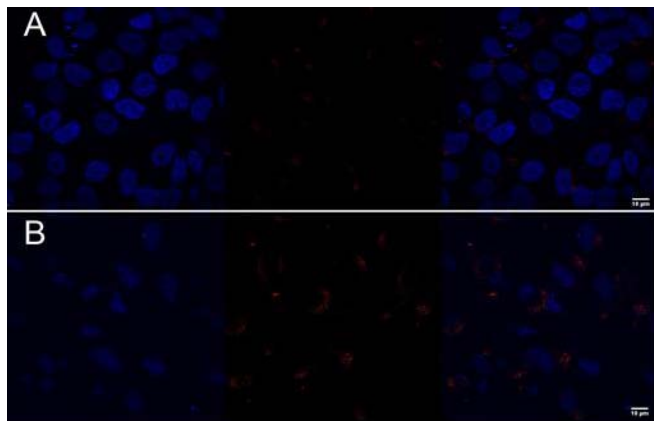


**Figura 5**-Western blot Rsp03 (R&D systems) con tratamiento con PNGasa.

Esto se condice con lo que se hipotetiza, es decir que Rsp03 tendría una N-glicosilación, por lo que se siguió adelante realizando el mismo tratamiento en las muestras de medio condicionado de la línea celular MDA-MB231. Este análisis presentó numerosas dificultades, tales como por ejemplo el proceso de concentración de la muestra ya que la misma se encuentra muy diluida y por ende no resulta viable realizar la reacción enzimática. Para lograr una mayor concentración proteica en los medios condicionados se probó primero precipitar las proteínas con Ácido tricloroacético (TCA) y con Acetona pero con ambos se dificultó la posterior resuspensión del pellet proteico y su utilización para los ensayos enzimáticos y de detección por medio de Western Blot. Finalmente, a partir de la utilización de las columnas Centricon (Millipore), logramos una concentración proteica adecuada y actualmente se continuó la puesta a punto del ensayo enzimático ya que al ser una mezcla compleja hay que realizar las aproximaciones correspondientes para seguir las instrucciones del fabricante dadas para digerir una muestra de proteína purificada.

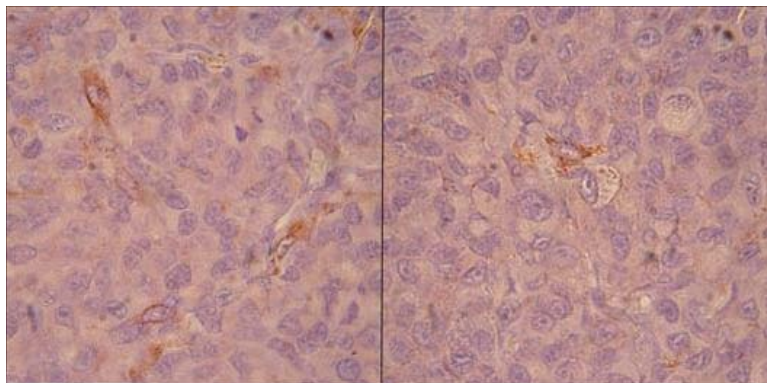
#### ***Estudio de la localización celular de Rsp03***

Continuando con el análisis de presencia y localización de Rsp03 una vez secretado, se realizó la puesta a punto del anticuerpo anti-Rsp03 para detectar la localización de la proteína por medio de Inmunofluorescencia en línea celulares. Al realizar el ensayo se observó marca positiva para Rsp03 (fluoróforo rojo) y localización en citoplasma y membrana plasmática en las líneas celulares MDA-MB231 y T47D (Figura 6). Los núcleos se marcaron con DAPI para apreciar la localización de los mismos por fluorescencia en azul. Se pudo apreciar una mayor marca para Rsp03 en la línea celular MDA-MB231, comparada con la línea T47D y coincidente con lo observado por western blot. Si bien este es un resultado preliminar y que debe ser repetido, apoya la hipótesis de que en tumores mamarios, Rsp03 una vez secretado lleva a cabo su función en el nicho en el que fue secretado. Como próximo paso se realizará el mismo ensayo en las otras líneas celulares basales y luminales, a fin de determinar si efectivamente la abundancia de Rsp03 secretado e interactuando con la matriz extracelular o membrana plasmática varía entre los distintos perfiles celulares.



**Figura 6** - Fotografías de microscopía confocal mostrando la localización de Rsp03. Anti Rsp03 Sigma 1:100, Ab secundario Alexa 532 (rojo). DAPI (azul) A. T<sub>47</sub>D. B. MDA-MB231

Como paso siguiente a los ensayos en líneas celulares, se quiere analizar la presencia de Rsp03 en cortes de tumores mamarios humanos por medio de la técnica de Inmunohistoquímica, en colaboración con el Dr. Martin Abba (UNLP-CONICET). Para esto, se procedió a poner a punto el anticuerpo que reconoce Rsp03. Dado que los cortes de mama humanos se encuentran incluidos en parafina y las muestras con las que cuenta el grupo son limitadas, se procedió a hacer la puesta a punto con cortes de tumores de mama de ratón. Los cortes histológicos utilizados fueron gentilmente cedidos por la Doctoras Adriana de Siervi y Paola De Luca (IBYME-CONICET). Estos tumores se originaron a partir de la inoculación subcutánea de células MDA-MB 231 en ratones nude. Para la puesta a punto de la Inmunohistoquímica se probaron distintas diluciones del anticuerpo primario anti-Rsp03 y diferentes tiempos de incubación con el anticuerpo secundario proveniente del kit de detección ABC Vectastain hasta lograr observar marca específica de Rsp03 (dilución 1:50 del anticuerpo primario) (Figura 7). La marca observada coincide con el patrón de marca observado en algunas proteínas de secreción, es decir, difuso entre las distintas células del corte y más intenso en algunas de ellas. El control de marca específica se realizó incubando en paralelo un corte sin anticuerpo primario, y en éste no se observó marcación.



**Figura 7** - Marcación de Rsp03 humano. Reacción de Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Rsp03 (Sigma) dilución 1:50. Kit Vectastain ABC Reagent. Se observan dos campos del mismo corte. Aumento 1000X

## DISCUSIÓN

Uno de los principales objetivos de este proyecto era el de establecer el perfil de expresión de Rsp03 en líneas celulares tumorales mamarias humanas. A partir del ensayo de western blot podemos concluir que los niveles de expresión de Rsp03 se encuentran relacionados con el fenotipo de cada célula, ya que observamos que la proteína de Rsp03 se encuentra representada mayoritariamente en las líneas celulares mamarias de estirpe basal-mesenquimal y en menor medida en las luminales. Estos resultados deberán ser confirmados por ensayos de PCR en tiempo real, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. Estas técnicas fueron puestas a punto en el marco de este proyecto de

investigación y consideramos que prontamente vamos a poder tener los resultados pertinentes. Los niveles de expresión de ARNm de Rspo3 serán comparados con la expresión de marcadores epiteliales basales, como por ejemplo vimentina.

Observamos de manera preliminar por western blot, inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia que Rspo3 una vez secretado, permanece en el nicho de las células basales por su asociación con la matriz extracelular. Proponemos que esta interacción podría estar modulada por la presencia de glicosilaciones en la proteína. Creemos oportuno seguir adelante estudiando la presencia de la glicosilación en Rspo3 en las líneas celulares humanas, dada la relevancia de la presencia de carbohidratos en las estructuras proteicas. Éstos contienen importante información biológica y la existencia de patrones de glicosilación alterados es característico de las células cancerosas, por lo que consideramos que conocer sobre dichas modificaciones en Rspo3 colaboraría a su caracterización en relación con el cáncer de mama. En este sentido como próximos pasos seguiremos con la puesta a punto de las condiciones de incubación de las muestras de medio condicionado con la enzima PNGasa y oportunamente realizaremos una espectrometría de masa a fin de analizar la composición del glicano correspondiente.

Por último, creemos que analizar la presencia de Rspo3 en muestras humanas es un paso importante, a fin de relacionar fenotipos tumorales caracterizados molecularmente con los niveles de expresión de Rspo3 delineando una posible herramienta de diagnóstico a futuro.

Si bien estos resultados son preliminares y se requiere continuar investigando, se puede concluir que Rspo3 se expresaría diferencialmente en células de estirpe basal y que una vez secretado permanecería en el nicho de las mismas impidiendo su diferenciación. Además, que su sobreexpresión en tumores que se generan a partir de células mamarias basales-mesenquimales colaboraría a mantenerlos indiferenciados (ER-PR-HER2 negativo) y de esta manera más agresivos.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Bom M, Cozijnsen M et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007; 449(7165):1003-7
- 2) Barker N, Huch M, Kujala P, van de Watering M, Snippert HJ, van Es JH et al. *Lgr5*(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1):25-36.
- 3) Barker N, van Es JH, Jaks V, Kasper M, Snippert H, Toftgard R et al. Very long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles from cycling *Lgr5*+ve stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008; 73:351-6.
- 4) Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005; 23:7350-7360.
- 5) Buggiano V, Levy CS, Gattelli A, Cirio MC, Marfil M, Nepomnaschy I et al. Origin and progression of pregnancy-dependent mammary tumors induced by new mouse mammary tumor virus variants. *Breast Cancer Res Treat* 2002;75(3):191-202.
- 6) Fantozzi A, Gruber DC, Pisarsky L, Heck C, Kunita A, Yilmaz M et al. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res* 2014; 74(5):1566-75
- 7) Gattelli A, Cirio MC, Quaglino A, Schere-Levy C, Martinez N, Binaghi M et al. Progression of pregnancy-dependent mouse mammary tumors after long dormancy periods. Involvement of Wnt pathway activation. *Cancer Res.* 2004; 64(15):5193-9.
- 8) Gattelli A, Zimmerlin MN, Meiss RP, Castilla LH, Kordon EC. Selection of early-occurring mutations dictates hormone-independent progression in mouse mammary tumor lines. *J Virol.* 2006; 80(22):11409-15.
- 9) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009, 59:225-249.
- 10) Kazanskaya O, Ohkawara B, Heroult M, Wu W, Maltry N, Augustin HG et al. The Wnt signaling regulator *R-spondin 3* promotes angioblast and vascular development. *Development* 2008; 135(22):3655-64
- 11) Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M et al. Mitogenic influence of human *R-spondin1* on the intestinal epithelium. *Science* 2005; 309(5738):1256-9
- 12) Kordon EC and Smith GH. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* 1998;125(10):1921-1930.
- 13) Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004, 23: 6329-40.
- 14) Schuijers J and Clevers H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, *Lgr5* and *R-spondins*. *The EMBO Journal* 2012; 31(12):2685-96
- 15) Sorlie T. Molecular classification of breast tumors: toward improved diagnostics and treatments. *Methods Mol Biol* 2007, 360:91-114.
- 16) Theodorou V, Kimm MA, Boer M, Wassels L, Theelen W, Jonkers J et al. MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer. *Nat Genet* 2007; 39(6):759-69.
- 17) <http://www.msal.gov.ar/inc/>

## REGULACIÓN DE HSP27 MEDIANTE MIRNAS EN CÁNCER DE MAMA

**Martín Eduardo Guerrero Giménez**

Laboratorio de Oncología, IMBECU, CCT Mendoza, CONICET

**Director:** Dr. Felipe Carlos Martín Zoppino

### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la regulación de HSP27 (HSPB1) mediante miRNAs en cáncer de mama (CM). **Métodos:** Luego de seleccionar a hsa-miR-214 como candidato a interactuar con HSPB1, se transfectaron células MCF-7 (línea Luminal A de CM) con hsa-miR-214 o con un miRNA control negativo. Luego de 48hs se evaluó la expresión de HSPB1 y su forma fosforilada en Ser78 mediante Western Blot. También se estudiaron proteínas que interactúan con HSPB1 tanto por Western blot como por inmunofluorescencia. Finalmente se realizó la clasificación por subtipos moleculares y la expresión diferencial de genes de 1092 muestras de CM del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), posteriormente se estudió la sobrevida total de grupos con diferentes niveles de expresión de HSPB1 y hsa-miR-214 mediante curvas de Kaplan-Meier. **Resultados:** Se informó la disminución de HSPB1 y p-HSPB1 en células MCF-7 transfectadas con hsa-miR-214. También se observó que proteínas relevantes que interactúan con HSPB1 como b-catenina, PTEN y p-PTEN aumentaron su expresión. Finalmente se halló que niveles altos de HSPB1 están relacionados con mejor sobrevida mientras que la expresión aumentada de hsa-miR-214 se relaciona con mayor mortalidad en los pacientes con tumores del subtipo Luminal A. **Conclusión:** Se demostró por primera vez la participación de hsa-miR-214 en CM y su relación con HSPB1.

### ABSTRACT

**Aim:** To evaluate the regulation of HSP27 (HSPB1) by miRNAs in breast cancer. **Methods:** After selecting hsa-miR-214 as a possible HSPB1 interacting miRNA, MCF-7 (luminal A breast cancer cell line) were transfected either with hsa-miR-214 or a negative control miRNA. After 48hs, the expression of HSPB1 and its phosphorylated variant at residue Ser78 were evaluated by western blot. There were studied known proteins that interact with HSPB1, either by western blot and/or immunofluorescence. Subtype classification and differential gene expression analysis of 1092 samples of The Cancer Genome Atlas (TCGA) breast cancer dataset was performed. Overall survival for groups with different expression of HSPB1 and hsa-miR-214 was studied with Kaplan-Meier curves. **Results:** we report that HSPB1 and p-HSPB1 are down regulated in MCF-7 cells transfected with hsa-miR-214. Moreover, b-Catenin, PTEN and p-PTEN, important proteins involved in cancer with demonstrated capacity to interact with HSPB1, present an up-regulated expression. It was found that high levels of HSPB1 were related with better prognosis while increased levels of hsa-miR-214 have an impaired survival in patients with luminal A subtype tumors. **Conclusion:** We account for first time the participation of hsa-miR-214 in breast cancer. This study could address HSPB1 as molecular player involved in hsa-miR-214 action.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es una enfermedad extendida en todo el mundo, presenta más de 1,6 millones de casos nuevos y alrededor de 450.000 muertes anuales a nivel mundial. Las estadísticas de Argentina indican alrededor de 20.000 nuevos casos por año y una mortalidad anual de 6000 personas [15]. Particularmente en la provincia de Mendoza entre el 2003 y el 2007 hubo 3774 nuevos casos y 1226 pacientes murieron a causa de la enfermedad, situándolo como el más frecuente y el principal causante de muerte por cáncer en la población femenina a nivel provincial [13].

Las HSP (*Heat shock proteins*: proteínas de golpe de calor) son proteínas moduladoras de la capacidad de las células para responder a varios tipos de lesiones, estrés oxidativo, choque térmico y otros factores de estrés. Las HSP funcionan asistiendo al correcto plegado y estabilización de las proteínas y ayudando además al secuestro de proteínas dañadas para su restablecimiento o posterior

degradación. Pertenecen a una familia conservada evolutivamente y se dividen en 6 subfamilias de acuerdo a su peso molecular: Hsp pequeñas de 12-43kDa (HSPB), Hsp40 (DNAJ), Hsp70 (HSPA), Hsp90 (HSPC) y las Hsp grandes de 100-110kDa (HSPH), finalmente los genes de Hsp10, Hsp60 y proteínas CCT se agrupan bajo una misma subfamilia (Chaperoninas) [22]. Las HSP se encuentran sobre-expresadas en una amplia variedad de cánceres, incluyendo al cáncer de mama, donde promueven el crecimiento tumoral [6, 10]. Es ampliamente reconocida la función anti-apoptótica de Hsp27 (HSPB1) en niveles pre-mitocondriales, mitocondriales y post-mitocondriales [17, 25]. En el CM ha sido identificada a HSPB1 como un gen "migratorio", donde la invasión y la migración celular disminuyen luego de bloquear la fosforilación de HSPB1 dependiente de Protein-quinasa C [31]. HSPB1 es altamente expresada en cáncer de próstata y media la invasión celular a través de la vía p38MAP quinasa que activa a MAPKAPK2. Esta conduce a la fosforilación de HSPB1 seguida por la activación de la metaloproteínasa de matriz tipo 2 (MMP2) promoviendo de este modo la invasión celular [34]. Algunos estudios muestran la habilidad de HSPB1 para incrementar el potencial metastásico de las células tumorales en ratones desnudos [4, 24]. Sin embargo, el rol pronóstico de HSPB1 en CM no está esclarecido. Es reconocida la interacción de HSPB1 con proteínas relevantes en el cáncer como lo son  $\beta$ -catenina [14] y PTEN [8]. Un paso clave durante la metástasis es la pérdida de adhesión entre células y también a la matriz extracelular,  $\beta$ -catenina es una proteína con función en la adhesión y el señalamiento celular relacionado a la progresión del cáncer. PTEN es una proteína supresora tumoral que mediante la defosforilación de fosfoinosítidos inhibe la vía de señalización PI3K-AKT/PKB reguladora de la progresión del ciclo celular y la supervivencia de la célula. Se ha documentado que la depleción o la inhibición de HSPB1 frecuentemente reduce el tamaño de los tumores brindando de esta manera una nueva estrategia en la terapia anti-cáncer [17]. Recientes estudios demostraron que la sobreexpresión de HSPB1 puede reducir la eficacia del fármaco Herceptina (anticuerpos anti receptor Her2) aumentando estabilidad de la proteína Her2, indicando que la disminución de la expresión de HSPB1 es beneficiosa en conjunto con el tratamiento farmacológico del cáncer de mama [23]. Existen estudios que han demostrado que los niveles de HSPB1 celulares están asociados inversamente con la citotoxicidad del antineoplásico doxorubicina y que la disminución de HSPB1 por RNA de interferencia potencia el efecto citotóxico de la doxorubicina [12].

Los miRNA [21] fueron descubiertos en 1993 pero no fue hasta el año 2000 que se reconoció ampliamente su función biológica [1]. Los miRNA son una clase conservada de pequeños ARN no codificantes de alrededor de 22 nucleótidos de longitud, funcionan controlando negativamente la expresión génica de numerosos transcritos [2, 19]. El mecanismo ocurre a través de la unión por complementariedad de bases a la región 3' no traducida (3'UTR) de los ARNm conduciendo a su degradación o inhibiendo la traducción de los mismos [7]. Los miRNA han sido implicados en la regulación de una variedad de procesos celulares: apoptosis [5], diferenciación hematopoyética [9], metabolismo [30], morfogénesis de la piel [35] y desarrollo neuronal [32], también han sido implicados en la iniciación y progresión del cáncer a través de su capacidad de regular la expresión de genes y proteínas que regulan la proliferación, muerte celular y metástasis [21, 28]. En los últimos años se están desarrollando diversas terapias basadas en el uso de miRNA hacia diversos tipos de patologías. Datos experimentales indican que existen fenotipos de cáncer que pueden ser modificados por la expresión orientada de miRNA. Basándose en esto se están desarrollando miRNA para terapias contra el cáncer, ya sea solos o en combinación con terapias dirigidas actuales, con el objetivo de mejorar la respuesta de la enfermedad y aumentar las tasas de curación [18]. La evidencia experimental también demuestra que la desregulación de miRNA específicos conduce a la resistencia a los medicamentos en los diferentes tipos de cánceres. La corrección de estos miRNA utilizando mimetizadores o antagonistas puede alterar la red de regulación de genes, vías de señalización y sensibilizar a las células cancerosas a la quimioterapia. Por lo tanto, la terapia basada en miRNA proporciona un enfoque anti-tumoral en estudio para la terapia del cáncer [16].

En el presente estudio nos enfocamos en la búsqueda de miRNAs candidatos a regular la expresión de HSPB1. Seleccionamos a hsa-miR-214 y evaluamos su efecto en la expresión de diferentes proteínas relevantes en el CM en la línea celular MCF-7. Con intenciones de conocer en mayor profundidad la realidad de estos genes en la enfermedad evaluamos los niveles de expresión de HSPB1 y hsa-miR-214 en los diferentes subtipos moleculares de CM con el objeto de evaluar la sobrevida total de los pacientes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Búsqueda in silico de miRNA putativos para HSPB1***

Se utilizaron algoritmos computacionales que incluyen TargetScan y microRNA para buscar miRNAs putativos para las secuencias 3' no traducidas (untranslated región UTR) del ARNm de HSPB1. Para la selección de un posible miRNA candidato que actúe en el ARNm de HSPB1 se tuvieron en cuenta aquellas familias de miRNA que se encuentran conservados ampliamente en vertebrados y que presentan un buen score pronóstico *in silico* para interaccionar con la región 3' UTR de HSPB1. Además se consideró la baja variabilidad evolutiva de los sitios 3' UTR diana de HSPB1 entre diferentes especies. Luego utilizando la base de datos miRNAmap se evaluaron los niveles de expresión de HSPB1 en distintos tejidos humanos y su relación con la expresión de varios miRNA para buscar aquellos miRNA que se correlacionan negativamente con la expresión de HSPB1.

### ***Cultivo celular***

Se utilizaron células de cáncer de mama humano MCF-7 que fueron amablemente provistas por el Dr. M. C. Abba (Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina). Las células fueron cultivadas a 37°C en incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad en medio DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO, InVitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 IU/mL de penicilina y 100 Iq/mL estreptomycin (GIBCO).

### ***Transfección con miRNA***

Se transfectaron las células MCF-7 con mimetizadores de hsa-mir-214 durante 48hs (200nM, mirVana™ miRNA Mimics). Además se utilizó un miRNA scrambled como control negativo provisto por el mismo fabricante para normalizar los datos. Como vehículo de los miRNAs se utilizaron liposomas (RNAiMAX, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### ***Western blot***

Lisados proteicos (25 µg por calle) de células MCF-7 se separaron mediante electroforesis usando geles al 10% de SDS-poliacrilamida y luego fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham biosciences, United Kingdom). Luego de bloquear en leche al 5% en PBS-Tween se incubaron las membranas con anticuerpos primarios por 24hs a 4°C. Posteriormente se lavaron dichos anticuerpos con PBS y se incubaron las membranas con anticuerpo secundario conjugados con HRP (Eo464, DAKO). Se usaron los siguientes anticuerpos: anti b-catenina (1:500, Zymed, San Francisco CA), anti-PTEN (1:400, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, EE.UU.), anti-HSPB1 (1:1000, Stressgen Biotech Corp., Victoria, Canada), anti-Ser78-P-HSPB1 (1:100, Novus, Littleton CO, EE.UU.), anti-Ser370-P-PTEN (1:1000, SantaCruz Biotech., Santa Cruz, CA, EE.UU.) y anti β-actina (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, EE.UU.) como control de carga. La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia (Chemidoc XRS with Image Lab, Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). El estudio de densidad de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ.

### ***Microscopía confocal***

Las células fueron fijadas con 2% de paraformaldehido en PBS durante 10 minutos a 37°C, lavadas con PBS y bloqueadas con 50 mM de NH<sub>4</sub>CL en PBS. Posteriormente, las células se permeabilizaron con 0,05% de saponina en PBS con 0,5% de BSA, luego se incubaron con el anticuerpo primario para β-catenina (descrito arriba). Después de lavarlas, las células se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con HRP (Eo464, DAKO); Las células se montaron con Mowiol (Sigma-Aldrich, Argentina) y se examinaron mediante microscopía confocal usando un microscopio confocal Olympus FV1000 y el software FV 10-ASW1.7 (Olympus, Japón)

### ***Base de datos***

Se utilizó la base de datos de TCGA ("The Cancer Genome Atlas"), los datos se extrajeron utilizando el paquete TCGA Assembler para el software R [36]. Se descargó la información

correspondiente a los niveles de expresión génica de 1092 muestras tumorales y 111 muestras de tejido normal adyacente (plataforma BCGSC\_IlluminaHiSeq\_RNASeqV2), los niveles de expresión de miRNA de 752 muestras tumorales y 87 muestras de tejido normal adyacente (plataforma BCGSC\_IlluminaHiSeq\_miRNASeq) y la información clínica de 1039 pacientes. Dichas descargas se realizaron el 28 de octubre de 2014 y corresponden a una cohorte heterogénea de pacientes cuyo tratamiento fue establecido según los protocolos estándares usados en la práctica médica.

### **Clasificación mediante PAM50**

Se aplicó el algoritmo PAM50 para determinar el subtipo intrínseco de cada una de las muestras tumorales, dicho algoritmo consiste en determinar la distancia de los genes de la muestra con respecto a 5 centroides previamente establecidos mediante correlación de Spearman's y permite clasificar a los tumores en 5 subtipos diferentes (Luminal A, Luminal B, HER-2 enriched, Basal-Like, Normal-Like) [29]. Para realizar dicho análisis se utilizó el paquete "GeneFu" para R.

### **Expresión diferencial de genes**

Para determinar si HSPB1 y hsa-miR-214 se encuentra diferencialmente expresado en los diferentes subtipos moleculares de CM con respecto al tejido normal se utilizó el algoritmo DESeq2 [27] aplicado al total de las muestras previamente clasificada en los respectivos subtipos moleculares intrínsecos, para ello se utilizó el paquete DESeq2 para R. Dicho algoritmo utiliza modelos lineales generalizados de distribución binomial negativa (*negative binomial generalized linear models*) para evaluar la expresión diferencial de genes entre muestras de diferentes condiciones. Este test permite un análisis cuantitativo enfocado en la fuerza de la expresión diferencial más que en su simple presencia. El mismo brinda valores del logaritmo en base 2 del cambio (log<sub>2</sub> fold change) asociados a valores de significancia p.

### **Análisis de sobrevida**

De los datos normalizados de la plataforma BCGSC\_IlluminaHiSeq\_miRNASeq se realizó la transformación logarítmica de los niveles de expresión de hsa-miR-214, para ello primero se les sumó una unidad a las cuentas para evitar valores cero (donde el logaritmo no se puede aplicar) y posteriormente se realizó la transformación en base 2. A continuación se calcularon los percentiles 33 y 66 para dichos valores y se dividió la población de forma binomial entre aquellos pacientes que presentaban niveles mayores al percentil 66 y aquellos pacientes con niveles inferiores a dicho percentil. A continuación se realizó el test estadístico Log-Rank y curvas de Kaplan-Meier [33] para representar dichos resultados. Todos los test estadísticos se realizaron utilizando la implementación "Survival" para el software R.

## **RESULTADOS**

### **Búsqueda *in silico* de miRNA putativos para HSPB1**

Utilizando los algoritmos computacionales TargetScan y microRNA [3] encontramos más de 20 miRNA putativos para las secuencias 3' no traducidas (untranslated region UTR) del ARNm de HSPB1 (Fig 1). Para la selección de un posible miRNA candidato que actúe en el ARNm de HSPB1 tomamos en cuenta aquellas familias de miRNA conservados evolutivamente (Fig. 1, A). Seleccionamos a hsa-miR-214 que se encuentra conservado ampliamente en vertebrados y que presenta un buen score *in silico* para interaccionar con la región 3' UTR de HSPB1 (Fig. 1, A y B). Además, se consideró la conservación evolutiva de los sitios diana de los 3'UTR de HSPB1 y se encontraron 5 sitios conservados que interaccionan con miRNA *in silico* (Fig. 2, B). Se determinó que hsa-miR-214 interacciona con uno de estos sitios y comprobamos que no existen diferencias en el sitio entre humanos, chimpancés y gorilas (Fig. 2, A). Luego, utilizando la base de datos miRNAmmap, [20] se evaluaron los niveles de expresión de HSPB1 en distintos tejidos humanos y su relación con la expresión de varios miRNA (Fig. 3, A). Obtuvimos de la misma base de datos los índices de correlación positivos y negativos, en los cuales observamos que hsa-miR-214 se encuentra correlacionado negativamente con HSPB1 (Fig. 3, B). En conjunto todos estos datos sugieren que hsa-miR-214 es un potencial candidato para interaccionar con HSPB1, por lo cual se decidió avanzar en este sentido con la investigación.

### ***Efectos de miR-214 en HSPB1 y proteínas con las que interacciona.***

Según los resultados de las predicciones *in silico* se quiso evaluar el efecto de miR-214 sobre la expresión de HSPB1, en experimentos con células de cultivo MCF-7 se pudo observar que la transfección con hsa-mir-214 disminuye los niveles de HSPB1 a 0,45 veces los valores del control (Fig. 4). Por otro lado, la fosforilación de HSPB1 regula muchos de los aspectos de su funcionamiento y es un mecanismo clave que favorece el reconocimiento de las proteínas "clientes específicas" por lo tanto se quiso evaluar el estado de fosforilación de HSPB1. En células con sobreexpresión de hsa-mir-214 la fosforilación de HSPB1 se redujo a 0,27 veces respecto del miRNA control (Fig. 5). En nuestro laboratorio fue descrita una interacción directa entre HSPB1 y la fosfatasa PTEN, además se demostró que la disminución de HSPB1 por técnicas específicas de interferencia de mRNA (siRNA) provoca un aumento de PTEN y su forma fosforilada [8]. Se analizó el estado de PTEN y P-PTEN en situaciones donde HSPB1 se encontraba disminuida por la acción de hsa-mir-214, se encontró un importante aumento de PTEN y casi una duplicación de los niveles de P-PTEN (Fig. 6). En el 2008 se demostró en el laboratorio la interacción de HSPB1 con la proteína  $\beta$ -catenina [14]. Esta última posee varias funciones, participa en la unión célula-célula mediante el anclaje de las cadherinas al citoesqueleto de actina. También actúa como miembro de la vía Wnt, la cual es muy importante para fomentar el proceso de transición epitelio mesenquimal. En esta vía la localización de  $\beta$ -catenina en el núcleo favorece la acción de los factores de transcripción LEF1, TCF1, TCF2 y TCF3. Cuando analizamos el estado de  $\beta$ -catenina en condiciones de niveles disminuidos de HSPB1 por hsa-mir-214 observamos un aumento de la expresión de  $\beta$ -catenina. Determinamos que este aumento es significativo en la localización cercana a la membrana plasmática y también en menor medida en el citoplasma celular (Fig. 7). También intentamos evaluar posibles cambios en el estado de fosforilación de  $\beta$ -catenina sin embargo en estos experimentos no se pudo determinar cambios posiblemente debido a que la fosforilación de  $\beta$ -catenina provoca su rápida destrucción (datos no mostrados).

### ***Clasificación de pacientes según PAM50***

De TCGA se extrajo la información de la plataforma RNA-Seq de 1092 pacientes, los datos clínicos de 1039 y la expresión de miRNA de 752 pacientes. Se seleccionaron 699 pacientes con información en las 3 plataformas (Fig. 8, A). Para clasificar cada muestra según su subtipo molecular intrínseco se utilizaron los perfiles de expresión génica de los 1092 pacientes con datos de la plataforma RNA-Seq. El subtipo molecular más frecuente en la cohorte fue el Luminal A (55% de los pacientes) mientras que el subtipo menos frecuente fue el Normal-like (1,46%). La proporción de pacientes para cada subtipo se mantiene estable en las diferentes plataformas (Fig. 8, B).

### ***Expresión diferencial de HSPB1 y hsa-miR-214***

La evaluación de la expresión de hsa-mir-214 en el CM no mostró un aumento significativo respecto al tejido normal (datos no mostrados) sin embargo, cuando se evaluó la expresión en los distintos subtipos encontramos que existe expresión diferencial en el subtipo luminal A (1,27 veces aumentado respecto al control,  $p < 0,01$ ) (Tabla 1, A) mientras que el resto de los subtipos moleculares no presentaron diferencias significativas de expresión.

Al mismo tiempo, se evaluó la expresión de HSPB1 observando que este gen se encuentra diferencialmente expresado en todo el CM sin embargo dicho aumento corresponde predominantemente a los subtipos Luminales seguido por el subtipo HER2-enriched (tumores predominantemente receptor de estrógenos positivos) mientras que el aumento en la expresión es moderado para el subtipo basal (generalmente negativo para receptor de estrógeno) (tabla 1,B).

### ***Sobrevida***

Dados los resultados hallados en los análisis de expresión diferencial de genes nos propusimos determinar si el aumento de expresión tanto de hsa-miR-214 como de HSPB1 se relaciona con la sobrevida de los pacientes en la cohorte determinada. Interesantemente se observó que específicamente en el subtipo Luminal A ( $n=568$ ), aquellos pacientes cuyos niveles de expresión de HSPB1 se encontraban por encima del percentil 66 tenían una sobrevida significativamente mayor a los que tenían HSPB1 normal o baja (fig. 9, A), sin embargo este efecto no se observó en el subtipo Luminal B que expresa mayor cantidad de HSPB1 y tiene peor pronóstico clínico.

En relación a hsa-miR-214 se observó un efecto contrario al de HSPB1 ya que los pacientes con mayores niveles de expresión del gen experimentaron una disminución significativa de la supervivencia en el subtipo Luminal A (n=427) (fig. 9, B). Sin embargo dicho efecto tampoco se observó en el resto de los subtipos de CM (datos no mostrados).

## DISCUSIÓN

En la presente investigación se analizó la implicancia de hsa-miR-214 en el CM en relación a HSPB1, para ello aplicamos experimentalmente dos puntos de vista complementarios: El modelo de cáncer de mama en células de cultivo con el análisis de datos moleculares y clínicos de pacientes.

Teniendo en cuenta que los miRNA presentan múltiples RNAm como blancos, se apoyan las conclusiones aquí vertidas con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio mediante la utilización de siRNA específicos para HSPB1 [8]. Existen concordancias en el análisis de expresión de  $\beta$ -catenina y PTEN. Nuestros estudios muestran un aumento de la proteína supresora tumoral PTEN tras la transfección con hsa-miR-214. Es conocida la regulación negativa de la actividad de PTEN debida a la fosforilación de la misma. En nuestros experimentos los análisis de fosforilación de PTEN mostraron un aumento significativo lo cual podría favorecer la activación de la vía oncogénica de PI3Kinasas.  $\beta$ -catenina posee diferentes localizaciones celulares. En la membrana citoplasmática participa de la adhesión célula-célula, mientras que el aumento en el citoplasma favorece la translocación nuclear favoreciendo la activación de la vía oncogénica Wnt. Mediante la transfección de hsa-miR-214 se observó un aumento de la expresión de  $\beta$ -catenina en la localización cercana a la membrana plasmática y en menor medida en el citoplasma celular lo cual facilitaría las condiciones para la activación de la vía Wnt. Estas dos vías podrían favorecer un carácter pro tumoral del hsa-miR-214.

Si bien existen numerosas evidencias respecto del efecto negativo de HSPB1 en el cáncer de próstata [11, 26] en el CM no existe suficiente evidencia para asignarle un rol predictor negativo o positivo a HSPB1. Existen investigaciones que sugieren una función pro tumoral y otras antitumoral de HSPB1. En este estudio se analizó el CM teniendo en cuenta los distintos subtipos del mismo y se encontraron los resultados novedosos respecto del rol predictor positivo para HSPB1. Cabe notar que esta predicción vale únicamente para el subtipo Luminal A. Este subtipo presenta un comportamiento clínico más favorable en relación a los otros subtipos. Sin embargo un porcentaje de pacientes con tumores del tipo Luminal A no responde a los tratamientos estándar. Los resultados sugieren la existencia de subgrupos con diferente comportamiento clínico dentro de este subtipo.

Respecto de hsa-miR-214 si bien el cambio de expresión en el cáncer no adquiere la magnitud comparable de otros miRNA, es evidente y significativo su aumento en el subtipo Luminal A ( $p=0,00015$ ) que además muestra un peor pronóstico ( $p=0,013$ ).

Todos estos datos sugieren una activa participación hsa-miR-214 en el subtipo luminal A del CM que involucraría la participación de HSPB1. La presente investigación abre nuevos panoramas para ser explorados en el campo del cáncer de mama.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ambros, V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001 107: 823-826.
- [2] Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 116: 281-297.
- [3] Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D149-53
- [4] Blackburn, R. V., Galoforo, S. S., Berns, C. M., Armour, E. P., McEachern, D., Corry, P. M. et al. Comparison of tumor growth between hsp25- and hsp27-transfected murine L929 cells in nude mice. *Int.J.Cancer*. 1997 72: 871-877.
- [5] Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*. 2003 113: 25-36.
- [6] Calderwood S.K., Khaleque A., Sawyer D.B., Ciocca D.R. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*. 2006. 31: 164-72
- [7] Cannell, I. G., Kong, Y. W. & Bushell, M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem.Soc.Trans*. 2008. 36: 1224-1231.
- [8] Cayado-Gutiérrez N., Moncalero V.L., Rosales E.M., Berón W., Salvatierra E.E., Alvarez-Olmedo D. et al. Downregulation of Hsp27 (HSPB1) in MCF-7 human breast cancer cells induces upregulation of PTEN. *Cell Stress Chaperones*. 2013 Mar;18(2):243-9. 2.
- [9] Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F. & Bartel, D. P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004. 303: 83-86.
- [10] Ciocca D.R., Calderwood S.K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005. 10: 86-103.
- [11] Ciocca D.R., Fanelli M.A., Cuello-Carrion F.D., Castro G.N. Heat shock proteins in prostate cancer: from tumorigenesis to the clinic. *Int J Hyperthermia*. 2010. 26, 737-47.
- [12] Díaz-Chávez J., Fonseca-Sánchez M.A., Arechaga-Ocampo E., Flores-Pérez A., Palacios-Rodríguez Y., Domínguez-Gómez G., et al. Proteomic Profiling Reveals That Resveratrol Inhibits HSP27 Expression and Sensitizes Breast Cancer Cells to Doxorubicin Therapy. 2013. *PLoS One*. May 27;8(5).
- [13] Diumenjo M. Incidencia de cáncer en Mendoza, Análisis de los resultados del Registro Provincial de Tumores. 2008. Registro Provincial de Tumores de Mendoza.
- [14] Fanelli, M. A., Montt-Guevara, M., Diblasi, A. M., Gago, F. E., Tello, O., Cuello-Carrion, F. D., et al. P-cadherin and beta-catenin are useful prognostic markers in breast cancer patients; beta-catenin interacts with heat shock protein Hsp27. *Cell Stress.Chaperones*. 2008. 13: 207-220.
- [15] Ferlay J. S.I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., et al., 2015. GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11
- [16] Garofalo M., Croce C.M., MicroRNAs as therapeutic targets in chemoresistance. *Drug Resist Updat*. 2013 Jun 8.
- [17] Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E. & Kroemer, G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*. 2006. 5: 2592-2601.
- [18] Garzon R., Marcucci G., Croce C.M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct; 9(10):775-89.
- [19] He, L. & Hannon, G. J. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet*. 5: 522-531.
- [20] Hsu P.W., Huang H.D., Hsu S.D., Lin L.Z., Tsou A.P., Tseng C.P., et al. miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D135-9.
- [21] Jeanteur, P. [miRNAs and cancer]. *Bull.Cancer*. 2010. 97: 1231-1239.
- [22] Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tanguay R.M., Bruford E.A., et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009. 14, 105-11.
- [23] Kang S.H., Kang K.W., Kim K.H., Kwon B., Kim S.K., Lee H.Y., et al. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC Cancer*. 2008 Oct 4;8:286.
- [24] Kato M., Koninkx J., Schumacher U. Heat shock protein expression in human tumours grown in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Lett*. 2000. 161: 113-120.
- [25] Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C. Garrido, C. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*. 2007. 1: 53-60.
- [26] Larkin S.E., Holmes S., Cree I.A., Walker T., Basketter V., Bickers B., et al. Identification of markers of prostate cancer progression using candidate gene expression *Br J Cancer*. 2012 Jan 3;106(1):157-65.
- [27] Love M.I., Huber W. Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 2014. 15, 550.
- [28] Ma, L. Weinberg, R. A.. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet*. 2008. 24: 448-456.



- [29] Parker J.S., Mullins M., Cheang M.C., Leung S., Voduc D., Vickery T., et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 2009. 27, 1160-7.
- [30] Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004. 432: 226-230.
- [31] Shin, K. D., Lee, M. Y., Shin, D. S., Lee, S., Son, K. H., Koh, S., et al. Blocking tumor cell migration and invasion with biphenyl isoxazole derivative KRIBB3, a synthetic molecule that inhibits Hsp27 phosphorylation. *J.Biol.Chem.*2005. 280: 41439-41448.
- [32] Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M. et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*. 2006. 439: 283-289.
- [33] Therneau T.M., Grambsch P.M., *Modeling survival data : extending the Cox model*, New York,2000. Springer.
- [34] Xu, L., Chen, S., Bergan, R. C. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene*. 2006. 25: 2987-2998.
- [35] Yi, R., O'Carroll, D., Pasolli, H. A., Zhang, Z., Dietrich, F. S., Tarakhovskiy, A., et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat.Genet.* 2006. 38: 356-362.
- [36] Zhu Y. Qiu P. Ji Y. TCGA-assembler: open-source software for retrieving and processing TCGA data. *Nat Methods*,2014. 11, 599-600.

# ANEXO

A

Human HSPB1 (NM\_001540) 3' UTR miRNA Table (según TargetsCan.org)

miRNA families broadly conserved among vertebrates

miRNA	conserved sites				poorly conserved sites				Context score	Aggregate P <sub>CT</sub>
	8mer	7mer-m8	7mer-1A	Total	8mer	7mer-m8	7mer-1A	Total		
miR-214/761/3619-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.07	0.11

miRNA families conserved only among mammals

miRNA	conserved sites				poorly conserved sites				Context score	Aggregate P <sub>CT</sub>
	8mer	7mer-m8	7mer-1A	Total	8mer	7mer-m8	7mer-1A	Total		
miR-539/539-5p	1	0	0	1	0	0	0	0	-0.08	< 0.1

Poorly conserved miRNA Families

miRNA	conserved sites				poorly conserved sites				Context score	Aggregate P <sub>CT</sub>
	8mer	7mer-m8	7mer-1A	Total	8mer	7mer-m8	7mer-1A	Total		
miR-663/663a/1908	0	0	0	0	1	1	0	0	-0.52	< 0.1
miR-552/3097-5p	0	0	0	0	2	0	2	0	-0.30	< 0.1
miR-4467	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.26	< 0.1
miR-1273g/1603	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.21	< 0.1
miR-876-3p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.20	< 0.1
miR-654-5p/541	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.20	< 0.1
miR-1909	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.18	< 0.1
miR-608/1331/4651	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.17	< 0.1
miR-4723-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.16	< 0.1
miR-580	1	0	0	1	0	0	0	0	-0.12	< 0.1
miR-3545-3p	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.12	< 0.1
miR-650/650abc/3612	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.12	< 0.1
miR-577	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.10	< 0.1
miR-575/4676-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.10	< 0.1
miR-3133	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.05	< 0.1
miR-3945	0	0	0	0	1	0	0	1	N/A	< 0.1
miR-4253	0	0	0	0	1	0	0	1	N/A	< 0.1

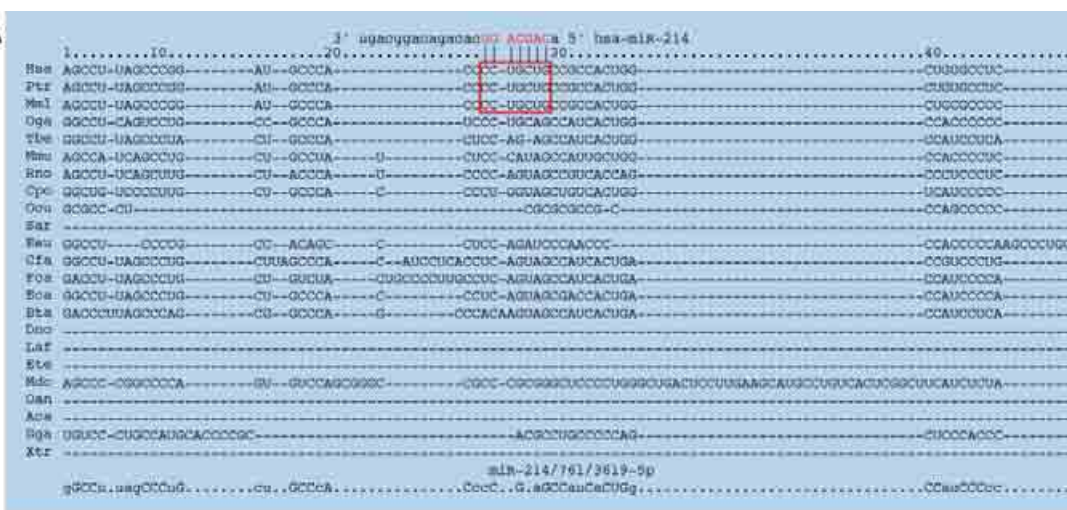
B

Target sites of conserved miRNAs with good mirSVR scores (según microRNA.org)

miRNA	mirSVR score	PhastCons score
hsa-miR-608	-0,215	0,5287
hsa-miR-541	-0,153	0,5287
hsa-miR-761	-0,1519	0,5287
hsa-miR-654-5p	-0,15	0,5287
hsa-miR-214	-0,14	0,5287
hsa-miR-1909	-0,1336	0,5287

Figura 1: Análisis in silico de miRNAs para la región 3' UTR del gen de HSPB1 (Hsp27). La tabla A corresponde a los resultados arrojados por targetsCan.org. Nótese que hsa-miR-214, perteneciente a una familia de miRNA conservada entre vertebrados, posee un score valido de interacción con HSPB1 (P<sub>CT</sub> provee un criterio útil para evaluar la relevancia biológica de una interacción miRNA-blanco pronosticada). En la tabla B los datos son provistos por microRNA.org donde mirSVR score evalúa el reconocimiento del sitio de unión del miRNA al ARNm y PhastCons pondera el sitio de unión del ARNm en el contexto de conservación evolutiva.

A



B

Sitios conservados en UTR 3' de HSPB1  
PhastCons score  
(0 = no conservado; 1 = conservado)

PhastCons score: 0.5287

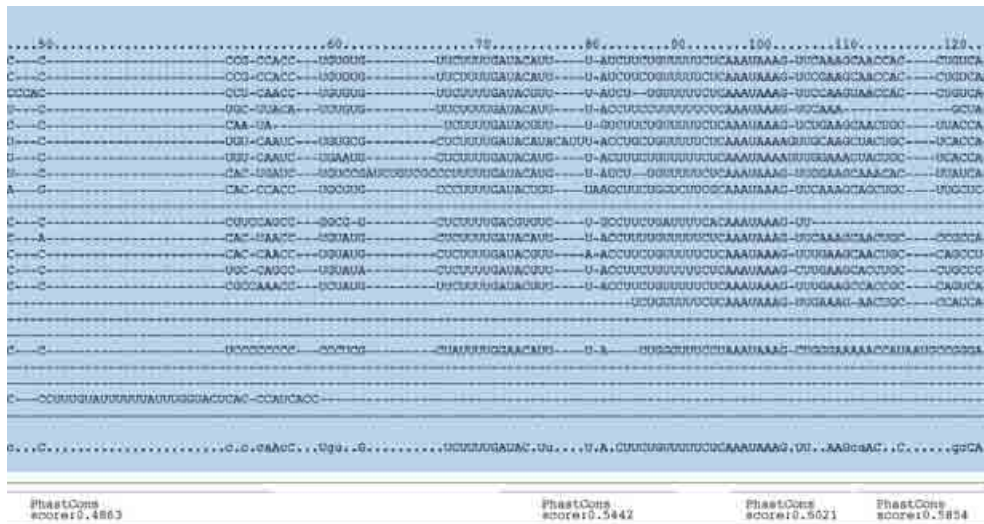


Figura 2: Análisis de comparación de secuencias de la región 3' UTR del ARNm de HSPB1. En la figura A se observa la comparación de secuencias entre distintas especies. Nótese que la región de unión de hsa-miR-214 en 3' UTR de HSPB1 se encuentra conservada en humanos, chimpancés y gorilas (recuadro rojo). En la figura B se analiza la conservación de las distintas zonas del 3' UTR de HSPB1 mediante los scores generados por PhastCons. Obsérvese que el 3' UTR posee sitios medianamente conservados en general.

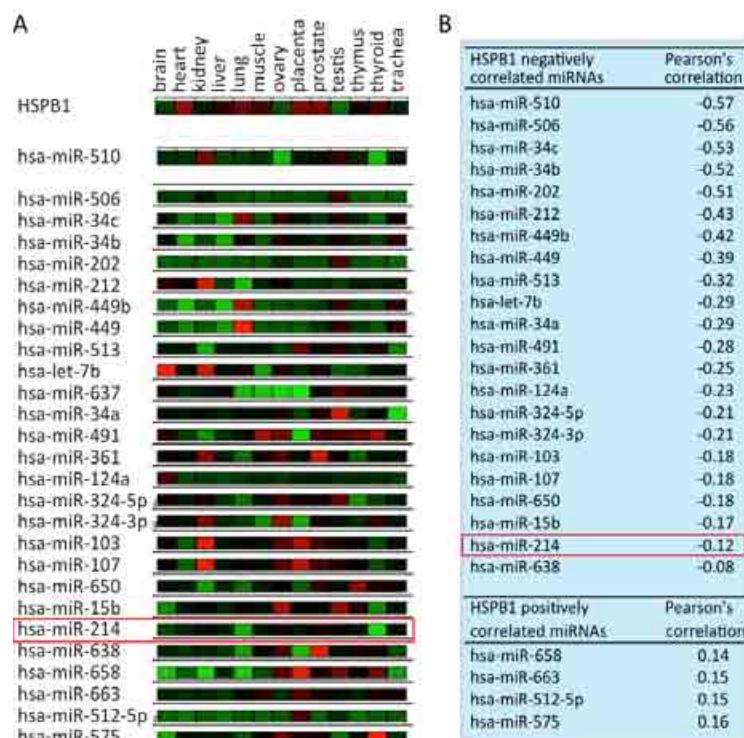


Figura 3: Análisis de expresión de hsa-miR-214 y de la proteína HSPB1 (según miRNome). La figura A representa la expresión de HSPB1 en distintos tejidos y también se muestran los niveles de expresión de diferentes miRNAs para cada uno de ellos. La tabla B corresponde a los índices de correlación de la figura A. Nótese que se discrimina entre correlaciones positivas y negativas. El recuadro rojo denota a hsa-miR-214 correlacionado negativamente con HSPB1.

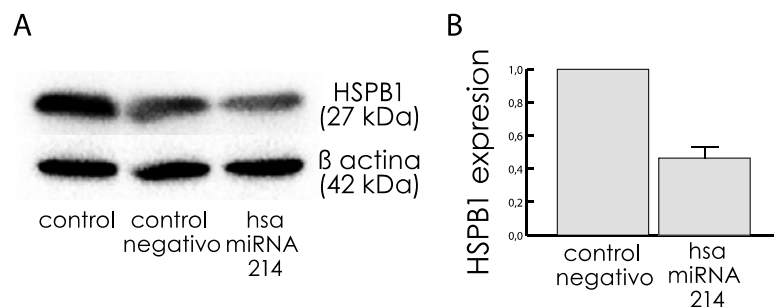


Figura 4. Niveles de expresión de Hsp27 bajo la acción de hsa-mir-214. Células MCF-7 transfectadas con miRNA control negativo inespecífico o con hsa-mir-214 por 48 horas luego lisadas y analizadas por western blot (A). Obsérvese la disminución de Hsp27 cuantificada en el gráfico de barras (B).

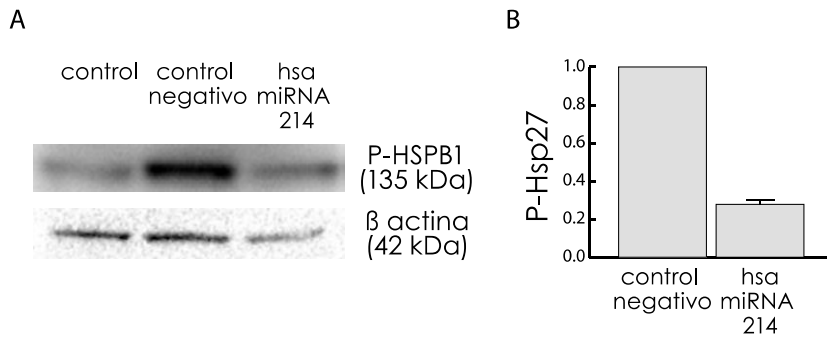


Figura 5. Niveles de expresión de P-Hsp27 bajo la acción de hsa-mir-214. Células MCF-7 transfectadas con miRNA control negativo inespecífico o con hsa-mir-214 por 48 horas luego lisadas y analizadas por western blot mediante anticuerpos específicos para Hsp27 fosforilada en el residuo Ser78 (A). Obsérvese la disminución de la fosforilación de Hsp27 cuantificada en el gráfico de barras (B).

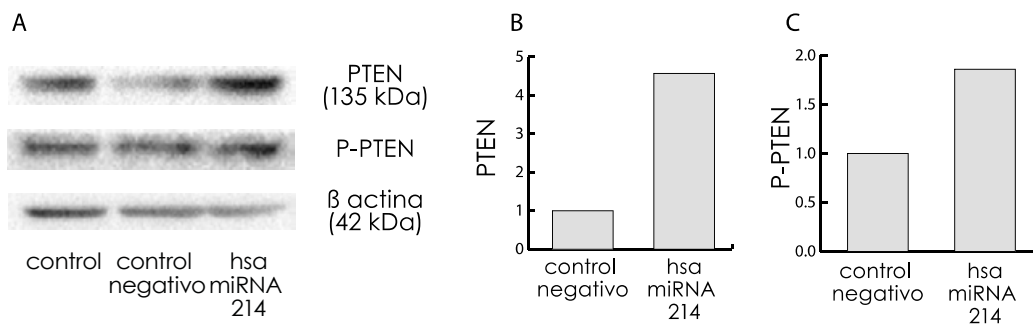


Figura 6. Niveles de expresión de PTEN y P-PTEN bajo la acción de hsa-mir-214. Análisis de células MCF-7 transfectadas con miRNA control negativo inespecífico o con hsa-mir-214. Luego de transcurridas 48 horas las células fueron analizadas por western blot mediante anticuerpos específicos para PTEN y PTEN fosforilado (P-PTEN) (A). Obsérvese el aumento de la expresión de PTEN (B) como también el incremento en el estado de fosforilación de la misma (C).

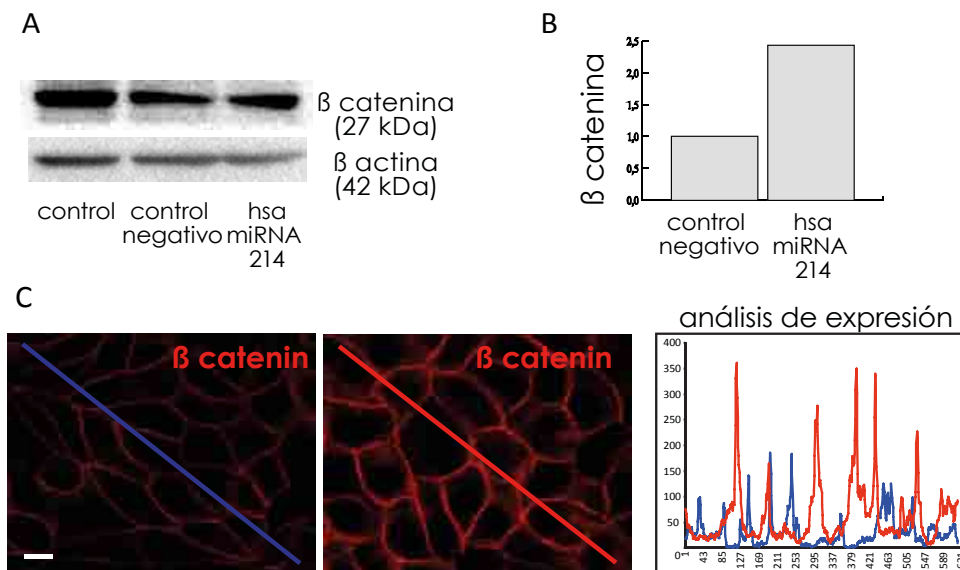


Figura 7: Hsa-miR-214 disminuye la expresión de Hsp27 (HSPB1) en células MCF-7 determinado por western blot (A) y aumenta la expresión de β-Catenina analizado por western (B) y microscopía confocal (C). La barra corresponde a 20 μm.

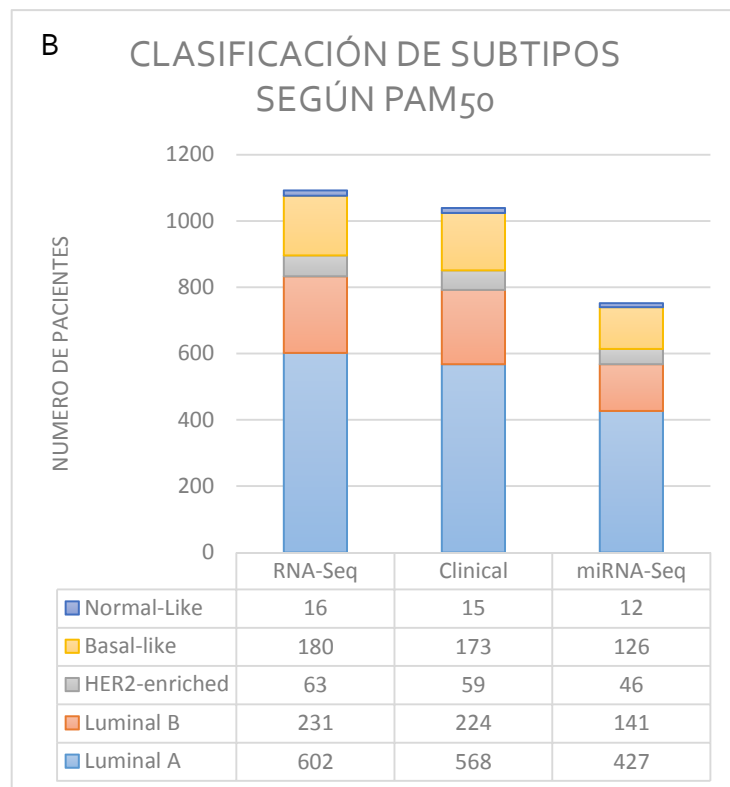
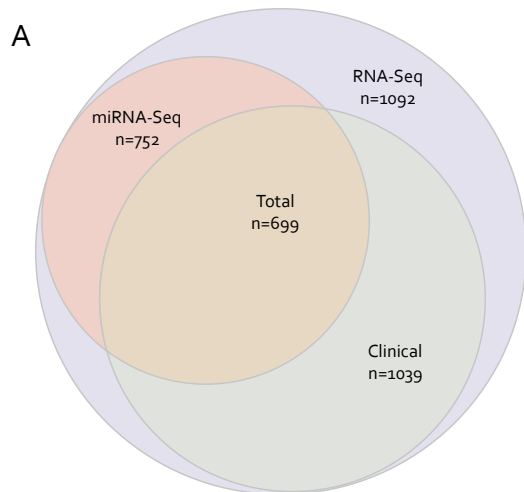


Figura 8: Distribución de los pacientes según plataformas en la cohorte de cáncer de mama en TCGA (A) y resultado de la clasificación de los tumores según PAM50 para cada plataforma (B)

**A**

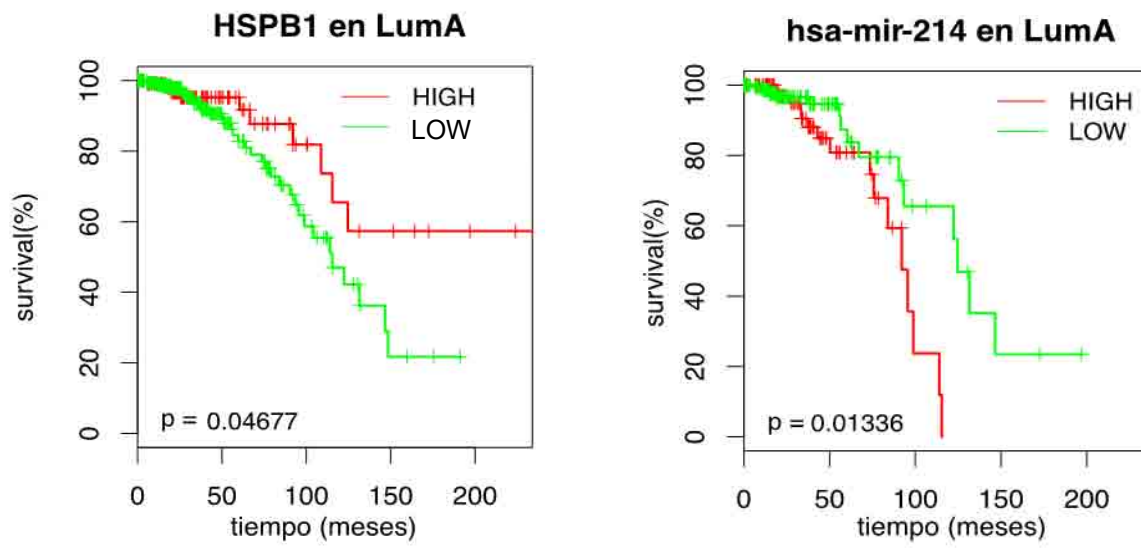
<i>hsa-miR-214</i>	<i>baseMean</i>	<i>log2 FC</i>	<i>lfcSE</i>	<i>Wald</i>	<i>pvalue</i>
<i>Luminal A</i>	150.428	0.347	0.091	3.793	0.00015
<i>Luminal B</i>	101.411	-0.071	0.101	-0.702	0.48282
<i>HER2-enriched</i>	99.943	-0.011	0.106	-0.101	0.91981
<i>Basal-Like</i>	110.843	-0.072	0.148	-0.486	0.62709
<i>Normal-Like</i>	105.263	0.139	0.152	0.911	0.36228

**B**

<i>HSPB1</i>	<i>baseMean</i>	<i>log2 FC</i>	<i>lfcSE</i>	<i>Wald</i>	<i>pvalue</i>
<i>Luminal A</i>	22876.9353	1.331	0.114	11.698	1.31E-31
<i>Luminal B</i>	24408.2334	1.604	0.111	14.386	6.30E-47
<i>HER2-enriched</i>	13333.4126	0.970	0.155	6.246	4.21E-10
<i>Basal-Like</i>	11237.8206	0.295	0.147	2.010	0.04442
<i>Normal-Like</i>	10282.3965	0.419	0.224	1.866	0.06206

Tabla 1: Expresión diferencial de genes calculada mediante algoritmo DESeq para *hsa-miR-214* (A) y *HSPB1* (B).

Ref: *baseMean*= Expresión media del gen; *log2FC*= logaritmo base 2 del Cambio (*log2 FoldChange*); *lfcSE*= Desviación estándar del *log2FoldChange*; *Wald*= Test estadístico de Wald; *pvalue*= Valor de significancia P.



**Figura 9:** Curvas de Kaplan Meier para sobrevida total de pacientes con HSPB1 alta y baja (A) y para pacientes con hsa-miR-214 alto y bajo (B), test estadístico Log-Rank.



**ESTUDIO DE LA RADIOQUIMIORRESISTENCIA EN EL CÁNCER COLORRECTAL:  
DISEÑO Y DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE SENSIBILIZACIÓN A LOS  
TRATAMIENTOS**

**Rodrigo Lloyd**

Comisión Nacional de Energía Atómica

**Directora:** Dra. Lucia Policastro

**RESUMEN**

En los últimos años, se ha vinculado la generación de radioquimiorresistencia en los tumores con la presencia de una pequeña subpoblación de células denominadas células madres tumorales. La expresión de genes embrionarios en esta subpoblación está relacionada con el desarrollo de resistencia en algunos tipos de cáncer, sin embargo existe escaso conocimiento sobre este aspecto en el cáncer colorrectal (CCR). El primer objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión de los genes embrionarios Oct-3/4, Sox-2 y Nanog en cultivos enriquecidos con células madres tumorales putativas de CCR resistentes a oxaliplatino, para detectar posibles blancos de silenciamiento asociados al desarrollo de resistencia en esta subpoblación. El segundo objetivo fue desarrollar un nanovehículo modelo basado en liposomas para su utilización como transportador de pequeños ARN de interferencia (siARN) para su utilización en el desarrollo de nuevas terapias sensibilizadoras en el CCR. Los resultados indican que Oct-3/4 podría ser un blanco de silenciamiento efectivo para el diseño de terapias sensibilizadoras a oxaliplatino en la población de células madres tumorales en el CCR. Por otro lado, la pre-condensación de un ácido nucleico con el polímero endosmolítico polietilenimina y su posterior encapsulamiento en liposomas, aumenta sustancialmente la actividad del nanovehículo y disminuye su toxicidad en ensayos *in vitro*.

**ABSTRACT**

In recent years, radiochemoresistance in tumors has been linked to the presence of a small subpopulation of cells called cancer stem cells (CSCs). The expression of embryonic gene in this subpopulation is related to the development of mechanisms of resistance in some cancers, but this issue is poorly known in colorectal cancer (CRC). The first objective of this study was to characterize the expression of Oct-3/4, Sox-2 and Nanog embryonic genes in cultured tumor cells enriched with colorectal CSCs-like resistant cells to oxaliplatin, in order to identify potential silencing target associated to resistance development in this subpopulation. The second objective was to develop a liposome-based nanovehicle to transport small interference RNAs (siRNAs) to be used in the development of novel sensitizer therapies in CRC. The results indicate that Oct-3/4 might be an effective target to be silenced in the CSCs-like population in CRC. Furthermore, the pre-condensation of a nucleic acid with the endosmolitic polyethylenimine polymer and subsequent encapsulation in liposomes, substantially increases the activity of nanovehicles and decreases its toxicity *in vitro* assays.

**INTRODUCCIÓN**

El cáncer colorrectal (CCR) representa en conjunto el 15% de los tumores diagnosticados y es la segunda causa de muerte por cáncer, después del cáncer de pulmón en el hombre y de mama en la mujer [12]. Los pacientes con CCR son tratados con cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia [18, 31]. Sin embargo, la respuesta de los pacientes con estado avanzado de la enfermedad tratados con 5-Fluorouracilo (5-FU), la droga más utilizada en el CCR es solo del 10-25% [34] y en combinación con otras drogas como el oxaliplatino o la leucovorina mejora moderadamente [31]. Los pacientes tratados con radioterapia pre-quirúrgica (RQTP), una práctica habitual que se utiliza como complemento de la cirugía [33], solo muestra una respuesta completa en el 20% de los pacientes tratados [14]. Una de las principales causas de fracaso de los tratamientos es la radioquimiorresistencia

de los tumores, ya sea intrínseca o adquirida [19]. Este es un fenómeno complejo en donde intervienen desde factores relacionados con microambiente tumoral, como la hipoxia, hasta características genéticas propias de cada tipo tumoral o adquiridas luego de múltiples sesiones de tratamiento [13]. En los últimos años, se ha vinculado el desarrollo de la radioquimiorresistencia de los tumores con la presencia de una pequeña subpoblación de células denominada células madres tumorales o CSC (*cancer stem cells*) [5]. Estudios recientes sugieren que los tratamientos con drogas quimioterapéuticas producen la muerte de las poblaciones de células tumorales sensibles y el enriquecimiento en la población de CSC [20, 23, 27, 29]. Estas células pueden reparar el daño al ADN de manera muy eficiente, poseen una alta expresión de bombas expulsoras de drogas, mecanismos antiapoptóticos muy efectivos y una capacidad antioxidante que le permite mantener niveles intracelulares muy bajos de especies reactivas del oxígeno (ROS) [1, 15, 21]. En los últimos años, se ha demostrado que existe una correlación entre el aumento de la expresión de genes embrionarios en la población de CSC [35] y el desarrollo de resistencia al efecto de drogas antineoplásicas, en líneas celulares y también en muestras de pacientes de distintos tipos de tumores sólidos tales como vejiga, hígado, próstata [4, 30]. Sin embargo, no existe conocimiento de la expresión de genes embrionarios ni de los niveles de especies reactivas del oxígeno en células madres tumorales de CCR. El primer objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los genes embrionarios Oct-3/4, Nanog y Sox-2 y los niveles de ROS en cultivos enriquecidos con células resistentes a oxaliplatino con características de células madres tumorales, a fin de identificar potenciales blancos de silenciamiento para el diseño de terapias sensibilizadoras basadas en el uso de pequeños ARN de interferencias (siARN). Esto último, no sólo requiere de la identificación de blancos de silenciamiento adecuados, sino también del desarrollo de nanovehículos efectivos para el transporte de la molécula terapéutica seleccionada. Los siARN son las moléculas más utilizadas para el silenciamiento de genes en modelos *in vitro* como *in vivo*. Desde su descubrimiento, han sido introducidos en más de 50 protocolos de ensayos clínicos en los que participan 13 empresas farmacéuticas y biotecnológicas, involucrando 26 tipos distintos de siARN [24]. Sin embargo, debido a sus características fisicoquímicas, el uso sistémico de siARN desnudos es altamente inestable [3]. Debido a su carga eléctrica negativa dado por los grupos fosfatos, los siARN pueden condensarse empleando policationes, entre las que se encuentra la polietilenimina (PEI). Esto no sólo facilita la compactación y evita la degradación enzimática del material genético [22], sino que facilita el escape del sistema endosoma/lisosoma. La PEI posee una fuerte capacidad buffer generada a través de las poliaminas, y actúan como una esponja de protones, produciendo un desequilibrio osmótico que provoca rupturas en las membranas endosomales [16]. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión de los genes embrionarios Oct-3/4, Nanog y Sox-2 y los niveles de especies reactivas del oxígeno en cultivos enriquecidos con células madres tumorales putativas de líneas sensibles y resistentes a oxaliplatino (OXA) de CCR. Por otro lado, en este trabajo también se avanzó con el diseño de un nanovehículo modelo para el transporte de siARN utilizando polietilenimina para la pre-condensación del ácido nucleico y su posterior encapsulamiento en liposomas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**1. Enriquecimiento de líneas de CCR sensibles y resistentes a OXA con células madres tumorales putativas.** Se utilizó la línea celular de cáncer colorrectal T-84 y la línea celular T-84 resistente a oxaliplatino (T-84ROxp) generada en nuestro laboratorio mediante tratamientos con dosis crecientes de OXA durante un período de 4-5 meses. La línea T-84ROxp posee una resistencia al OXA 10 veces superior con respecto a la línea parental. El enriquecimiento de estas líneas con células madres tumorales putativas (LCCR-E-CSC), se realizó mediante cultivos sucesivos de estas líneas en placas no adherentes (colonoesferas) y en medios mínimos [11]. Los cultivos se fueron amplificando mediante disgregación mecánica de las colonoesferas y la realización de subcultivos de manera repetida durante 2 o 3 pasajes.

**2. Determinación de la expresión de Oct-3/4, Sox-2 y Nanog en las LCCR-E-CSC.** Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en las líneas celulares crecidas en monocapa y como colonoesferas para la determinación de la expresión de Oct-3/4, Sox-2 y Nanog. Las células fueron colectadas, lavadas con



PBS, disgregadas y fijadas a un vidrio portaobjeto. Se utilizaron anticuerpos primarios contra Oct-3/4, Sox-2 y Nanog (Stemgent) y un secundario anti-conejo-Cy5 (Sigma), y los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Por otro lado, se realizaron ensayos de inmunomarcación para la determinación de Oct-3/4, Sox-2 y Nanog por citometría de flujo (FACSCalibur;BD). Los anticuerpos secundarios empleados fueron anti conejo Cy5 y anti ratón PerCP (Sigma).

**3. Silenciamiento de la expresión de Oct-3/4.** Se realizaron ensayos de silenciamiento utilizando un siARN contra la expresión de Oct-3/4 (Ambion) utilizando Liposfectamine 2000 (Promega) en placas de 24 pocillos. A las 24h postransfección, se sembraron  $2 \times 10^3$  en placas de 96 pocillos que fueron expuestas a distintas concentraciones de OXA durante 48 horas, luego de lo cual se evaluó la proliferación por la técnica de MTT.

**4. Determinación de los niveles de ROS.** Se determinaron los niveles de ROS en las líneas T84 y T84-ROxp crecidas en monocapa y como colonoesferas mediante por citometría de flujo utilizando la sonda 2',7' Diclofluoresceína-diacetato (DCF-dA Molecular Probes) como se realiza de rutina en nuestro laboratorio (20).

### **5. Obtención de un nanovehículo modelo para el transporte de ácidos nucleicos**

Generación de los complejos PEI/ADN. Se utilizó un ADN plasmídico conteniendo el gen de la luciferasa bajo un promotor CMV (CMV-LUCpl) para permitir una mejor visualización de los resultados. En estadios más avanzados de este proyecto, este plásmido será cambiado por un ADN plasmídico que contiene un siARN contra la expresión de Oct-3/4. Para formar los complejos PEI/DNA, el plásmido CMV-LUCpl fue resuspendido en buffer HEPES 10 mM, glucosa 5%, pH 7,4, y se utilizaron cantidades constantes del plásmido a una concentración de 0,1 mg/ml y cantidades variables de una solución 1 mg/ml de PEI (Sigma). Se obtuvieron distintas relaciones de PEI/ADN, teniendo en cuenta la relación Nitrógeno/Fosforo (N/P). Los complejos se caracterizaron en cuanto a su tamaño por dispersión dinámica de la luz y también se obtuvieron medidas de potencial Z en un equipo DTS nano Zetasizer (Malvern).

Encapsulamiento de los complejos PEI/ADN en liposomas y su caracterización. Los complejos descriptos en el punto anterior, fueron encapsulados utilizando el método de hidratación del film (10), para lo cual se realizó una mezcla lipídica compuesta por 0,025 mg de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (POPG), 0,074 mg de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) y 0,019 mg de 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(polyethylene glycol)-2000 (DSPE-PEG) (Avanti Polar Lipids) de cloroformo. Esta solución fue evaporada por un flujo continuo de nitrógeno gaseoso y se resuspendieron con 250  $\mu$ l de complejos PEI/ADN: N/P 5, N/P 10 y N/P 15. La estabilidad de los complejos y de los complejos encapsulados en liposomas se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. La cuantificación del ADN encapsulado se determinó por fluorescencia utilizando el kit Accublu (Biotium) según las especificaciones del fabricante. El tamaño y potencial Z de los nanovehículos fueron medidos por dispersión dinámica de la luz. Finalmente se obtuvieron microfotografías de los liposomas por microscopía de transmisión electrónica (TEM, Philips CM200), donde se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo 2%.

Actividad y toxicidad de los complejos PEI/DNA y de los complejos PEI/DNA encapsulados en liposomas. Se evaluó la actividad biológica de los complejos PEI/DNA encapsulados o no en liposomas en la línea celular LoVo mediante determinaciones de la expresión del gen de la luciferasa (Luciferase Assay System, Promega). Se sembraron células a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pocillos en placas de 96 pocillos. Estas células fueron expuestas a los complejos de relaciones N/P 5, N/P 10 y N/P 15 y estos encapsulados en liposomas a una concentración de 4  $\mu$ g/ml. La actividad luciferasa se evaluó a las 24 horas postransfección. La toxicidad se evaluó mediante el ensayo de MTT en placas paralelas.

**6. Análisis estadístico.** El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante ANOVA de un factor o test de Student T según corresponda. Para todos los casos se consideró la diferencia como estadísticamente significativa cuando se obtuvo un valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### **1. Enriquecimiento de las líneas celulares sensibles y resistentes a OXA con células madre tumorales putativas.**

Teniendo en cuenta que las células con características de células madres tumorales tienen capacidad de formar tumoresferas cuando se las cultiva en placas con superficie no adherente y en presencia de medios mínimos sin suero, las líneas celulares T84 y T84ROxp fueron crecidas en las condiciones mencionadas. En la Figura 1A se puede observar el crecimiento de las colonoferas a los 5 y 15 días de cultivo. Se observó que la línea T-84 forma menor cantidad de esferas y de mayor tamaño con respecto a la línea T-84ROxp, mientras que la línea T-84ROxp forma mayores cantidad de esferas pero de un menor tamaño. Este dato se condice con los resultados de la cuantificación del número de esferas luego de 15 días de cultivo (Figura 1B).

### **2. Expresión de Oct-3/4, Sox-2 y Nanog en los cultivos en monocapa y en las colonoferas sensibles y resistentes a OXA-**

Se realizaron ensayos cualitativos empleando técnicas de inmunofluorescencia para Oct-3/4, Sox2 y Nanog. La expresión de Nanog y Sox-2 no se indujo en las monocapas ni en las colonoferas (Figura 2 A y B). Con respecto a Oct-3/4, la expresión fue mínima en las líneas crecidas en monocapa, donde se observa una mayor expresión en T-84ROxp respecto de T-84. La expresión de Oct-3/4 fue mayor en los cultivos de colonoferas provenientes de las células T-84ROxp con respecto a las provenientes de células T-84 (Figura 2 C) Con el fin de cuantificar la diferencia observada en los resultados cualitativos anteriores, realizamos ensayos de citometría donde se evaluó la expresión de Oct-3/4, Sox-2 y Nanog. La expresión de Oct-3/4 mostró un 56,5% de señal positiva en T-84ROxp crecidas en monocapa y un 75,6% para las células crecidas como colonoferas (Figura 3). La expresión de Sox-2 fue muy baja (Figura 3) así como también la expresión de Nanog (datos no mostrados)

### **3. Sensibilización al OXA por el silenciamiento de Oct-3/4**

El silenciamiento de Oct-3/4 produjo una sensibilización de las células a la exposición a OXA respecto de los controles transfectados con un siARN control contra la expresión de luciferasa (Figura 4). Estos ensayos se realizaron en monocapa, y en este momento se están realizando los ensayos de silenciamiento provenientes de cultivos enriquecidos con células madres tumorales.

### **4. Niveles de ROS en las células sensibles y resistentes a OXA.**

Se evaluaron los niveles de ROS en las líneas T84 y T84-ROxp crecidas en monocapa y en colonoferas mediante citometría de flujo, utilizando la sonda fluorescente DCF-dA (20). Comparativamente se observó una disminución en los niveles de ROS las líneas enriquecidas con CSC. En el caso de las T-84, el 72% de las células no dieron señal positiva para ROS (debajo del límite negativo delimitado por el marcador M1), mientras que en las T-84 ROxp enriquecidas con CSC, los niveles descendieron hasta un 83% por debajo del límite negativo delimitado por el marcador M1 (Figura 5). Comparando las diferencias del contenido de ROS, se observó una disminución de los niveles de ROS, tanto en número de células como en intensidad en las T-84 ROxp enriquecidas CSC con respecto a las T84 sensibles enriquecidas en CSC (Figura 6). Actualmente estamos evaluando, la vinculación entre el silenciamiento de Oct-3/4 y la generación de ROS.

### **5. Desarrollo y caracterización de un nanovehículo modelo para el transporte de ácido nucleicos**

Con el fin de optimizar el encapsulado de un ADN plasmídico en un liposoma, se formaron complejos entre un el ADN plasmídico CMV-LUCpl y el polímero PEI debido a las propiedades antes mencionadas y se realizaron caracterizaciones de tamaño y potencial Z.

#### **5.1. Caracterización Físicoquímica de los complejos ADN/PEI**

Se realizaron complejos PEI/ADN utilizando las relaciones N/P: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y se evaluó su estabilidad mediante ensayos de electroforesis en gel de agarosa. A partir de la relación N/P4 se observó un total de acomplejamiento del ADN a la PEI, ya que la totalidad del ADN se observa en la

línea de siembra (Figura 7). Posteriormente, se midieron los tamaños y potencial Z de los complejos. A partir de la relación N/P 5 se obtuvieron tamaños de alrededor de los 100 nm, para N/P menores a 5 se obtuvieron errores en la medición de tamaño debido a que el PEI no llega a acomplejarse al ADN. Con respecto al potencial Z, a partir de la relación N/P 5 la carga es positiva y a relaciones menores el potencial Z es negativo (datos no mostrados). Teniendo en cuenta estos resultados determinamos que las relaciones N/P mayores a 5 son las adecuadas para el desarrollo del nanovehículo (Tabla 1).

### **5.2- Encapsulado de los complejos PEI/ADN en liposomas**

Posteriormente se procedió al encapsulado del complejo PEI/DNA a una N/P 5 en liposomas, mediante el método de hidratación del film lipídico [10]. El tamaño del complejo encapsulado fue de  $189,5 \pm 63$  con un potencial Z de 13,6 mV. Posteriormente, se realizaron tratamientos con heparina al 2% (carga negativa), con el fin de generar una competencia de la heparina por el PEI, y de este modo lograr la liberación de ADN que se encuentra adsorbido a la superficie. Se realizaron nuevamente medidas de tamaño observándose que este disminuyó a  $153 \pm 77$  y el potencial Z bajo a -29,2 mV, posiblemente por la eliminación de complejos adsorbidos a la membrana lipídica (Tabla 2). Finalmente se realizó una microscopia electrónica de los complejos encapsulados en liposomas, observándose que estos tienen una morfología esférica y que poseen un tamaño comprendido entre 150-180 nm (Figura 8).

### **5.3 Caracterización de la actividad y toxicidad de los complejos PEI/DNA y complejos PEI/DNA encapsulados en liposomas**

Con el fin de caracterizar la actividad de los complejos PEI/DNA y de los complejos PEI/DNA encapsulados en liposomas se evaluó la capacidad de expresar el ADN contenido en su interior a través de determinaciones de actividad luciferasa en la línea celular LoVo. Se evaluó la actividad de los complejos N/P 5, 10 y 15 y de estos complejos encapsulados en liposomas en las mismas relaciones. Se observaron grandes incrementos en la eficiencia de transfección con respecto al control, siendo la relación N/P 15 la que mostró mayores niveles de expresión (Figura 9 A). Finalmente se evaluó la toxicidad de los complejos y los complejos encapsulados mediante la técnica de MTT (Figura 9 B). Se pudo observar una mayor viabilidad celular en las células tratadas con los complejos encapsulados en liposomas con respecto a los complejos sin encapsular (Figura 9 B).

## **DISCUSIÓN**

Durante este trabajo, se ha caracterizado expresión de los genes embrionarios Oct-3/4, Sox-2 y Nanog en cultivos enriquecidos en células madres tumorales putativas resistentes y sensibles a oxaliplatino derivadas de la línea T-84ROxp y T-84 respectivamente. La línea T-84ROxp muestra niveles de expresión de Oct-3/4 significativamente superiores con respecto a la línea sensible T-84. Estos niveles aumentan aún más en los cultivos de colonoesferas derivados de la línea T-84ROxp. La expresión de Sox-2 y de Nanog no sufre modificaciones en los distintos tipos de cultivos. Por otro lado, el silenciamiento de Oct-3/4 genera una sensibilización a la exposición a oxaliplatino, por lo que este gen sería un buen candidato de silenciamiento para el diseño de terapias de sensibilización a los tratamientos. La expresión de genes embrionarios con función de factores de transcripción como Oct-3/4, Nanog y Sox2 está aumentada en las CSC [35] y ha sido involucrada con la resistencia a drogas mediante la inducción de la expresión de bombas expulsoras así como también de proteínas asociadas a la supervivencia celular [26]. Estudios realizados en pacientes con CCR muestran que hay una correlación entre la expresión de Oct-4 luego de tratamientos con quimioterapia [26]. Por otro lado, también hemos evaluado la generación de ROS en T-84 y T-84ROxp y en las colonoesferas derivadas a partir de estas células, ya que el aumento de los niveles de defensa antioxidante y la disminución de los niveles intracelulares de ROS, es una característica de las células madres tumorales. Nuestros resultados indican que la producción de ROS en los cultivos de colonoesferas es significativamente menor que las células crecidas en monocapa, siendo aún menores los niveles de ROS en los cultivos de colonoesferas provenientes de las células T-84ROxp con respecto a los de las T-84. Estos resultados concuerdan con los resultados de otros autores que muestran que las células con características de células madres tumorales poseen bajos niveles de ROS comparadas con las células no tumorigénicas [21]. Estos bajos niveles están asociados con el aumento de la expresión de sistemas secuestradores de ROS [6, 21]. Se ha demostrado que los tratamientos con drogas quimioterapéuticas favorece la

selección de una población que expresa marcadores asociados a células madres tumorales como CD133 y Oct-3/4, que poseen una estabilización de los sistemas secuestradores de radicales libres [1]. Los bajos niveles de ROS en conjunción con otros parámetros asociados a las células madres tumorales han sido sugeridos como marcadores de la presencia de CSC en tumores humanos de pulmón [33].

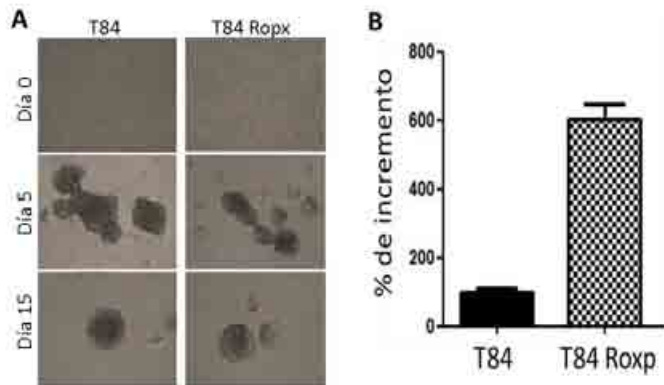
Teniendo en cuenta que el objetivo de este proyecto, es buscar nuevas estrategias de radioquimiosensibilización para el tratamiento del CCR, es imprescindible abordar también el diseño de nanovehículos para el transporte de los siARN seleccionados. Por lo tanto, de manera paralela hemos abordado el desarrollo de un nanovehículo modelo para el transporte de un siARN en su forma de oligonucleótido o plasmídica. Dado que la que la visualización de la expresión de un gen reportero como la luciferasa tiene altos niveles de sensibilidad y menor error que la detección del silenciamiento de un gen, en esta etapa del este proyecto se puso a punto la generación de un nanovehículo con un ADN plasmídico conteniendo el gen reportero de la luciferasa. Una vez puesto a punto el nanovehículo modelo será posible avanzar con el diseño de un nanovehículo que transporte un siARN de interés en su forma plasmídica o en su forma de oligonucleótidos. En principio, hemos puesto a punto la generación de un inmunonanovector conteniendo un ADN plasmídico y dirigido por un anticuerpo contra un antígeno altamente expresado en células de CCR. Sin embargo, este nanovehículo mostró muy baja actividad, aparentemente por dificultades en el escape del ADN de la vía endosoma/lisosoma. Por lo tanto, se abordó esta problemática mediante la incorporación de un polímero endosmolítico en el nanovehículo. En este caso elegimos la PEI, con la cual hemos logrado formar complejos PEI/ADN que resultaron estables y de un tamaño de alrededor de los 100nm, adecuado para su utilización sistémica. Hemos demostrado el encapsulamiento de los complejos PEI/DNA en liposomas a través de la disminución del potencial Z de los complejos una vez encapsulados en los liposomas (Tabla 1 y 2). Por otro lado, hemos determinado que la relación PEI/ADN N/P15 encapsulada en liposomas tiene buenos niveles de expresión luciferasa en la línea LoVo y niveles de toxicidad aceptables. Otros autores han logrado encapsular complejos de PEI/DNA pero a través de sistemas de encapsulamiento que involucran la utilización de grandes cantidades de ADN [7]. Harashima et al utiliza relaciones de ADN/lípido similares a la que se utilizan en este trabajo, sin embargo las relaciones de PEI/DNA tienen valores mucho más bajos de N/P a las usadas en este trabajo [10]. La puesta a punto de un nanovehículo modelo nos permitirá avanzar con la realización de experimentos más complejos que apunten al silenciamiento de los genes blancos seleccionados en modelos *in vivo* a fin de lograr el diseño y desarrollo de nuevas estrategias de una sensibilización a los tratamientos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

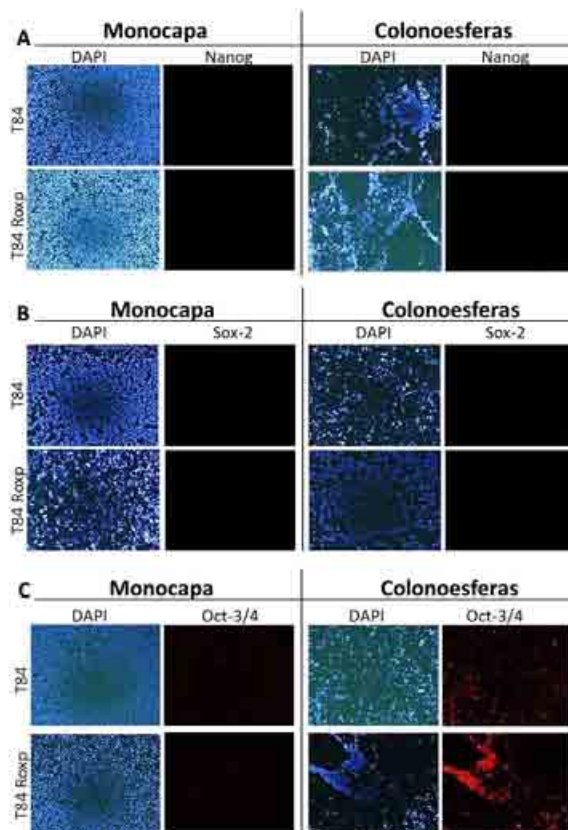
1. Achuthan S, Santhoshkumar TR, Prabhakar J, Nair SA, Pillai MR. Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(43):37813-29. Epub 2011/09/01.
2. Andre T, Boni C, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(19):3109-16. Epub 2009/05/20.
3. Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & biology*. 2012;19(1):60-71. Epub 2012/01/31.
4. Chang CC, Shieh GS, Wu P, Lin CC, Shiao AL, Wu CL. Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Cancer research*. 2008;68(15):6281-91. Epub 2008/08/05.
5. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(4):275-84. Epub 2005/04/02.
6. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009;458(7239):780-3. Epub 2009/02/06.
7. Heyes J, Palmer L, Chan K, Giesbrecht C, Jeffs L, MacLachlan I. Lipid encapsulation enables the effective systemic delivery of polyplex plasmid DNA. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007;15(4):713-20. Epub 2007/02/15.
8. Hosokawa Y, Takahashi H, Inoue A, Kawabe Y, Funahashi Y, Kameda K, et al. Oct-3/4 modulates the drug-resistant phenotype of glioblastoma cells through expression of ATP binding cassette transporter G2. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1850(6):1197-205. Epub 2015/02/04.
9. Jerabek S, Merino F, Scholer HR, Cojocaru V. OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1839(3):138-54. Epub 2013/10/23.
10. Kogure K, Moriguchi R, Sasaki K, Ueno M, Futaki S, Harashima H. Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2004;98(2):317-23. Epub 2004/07/21.
11. Kreso A, O'Brien CA. Colon cancer stem cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*; 2008: Chapter 3. Published in Wiley Interscience. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2008;Chapter 3:Unit 3.1. Epub 2012/04/03.
12. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, et al. Colon cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2010;74(2):106-33. Epub 2010/02/09.
13. Martinez-Lacaci I, Garcia Morales P, Soto JL, Saceda M. Tumour cells resistance in cancer therapy. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2007;9(1):13-20. Epub 2007/02/03.
14. Mohiuddin M, Winter K, Mitchell E, Hanna N, Yuen A, Nichols C, et al. Randomized phase II study of neoadjuvant combined-modality chemoradiation for distal rectal cancer: Radiation Therapy Oncology Group Trial 0012. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(4):650-5. Epub 2006/02/01.
15. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *Journal of oncology*. 2011;2011:941876. Epub 2010/10/29.
16. Neu M, Fischer D, Kissel T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *The journal of gene medicine*. 2005;7(8):992-1009. Epub 2005/05/28.
17. Nguyen J, Szoka FC. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? *Accounts of chemical research*. 2012;45(7):1153-62. Epub 2012/03/21.
18. Noguchi T, Ritter G, Nishikawa H. Antibody-based therapy in colorectal cancer. *Immunotherapy*. 2013;5(5):533-45. Epub 2013/05/04.
19. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS letters*. 2006;580(12):2903-9. Epub 2006/02/25.
20. Policastro LL, Ibanez IL, Duran HA, Soria G, Gottifredi V, Podhajcer OL. Suppression of cancer growth by nonviral gene therapy based on a novel reactive oxygen species-responsive promoter. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009;17(8):1355-64. Epub 2009/05/14.
21. Policastro LL, Ibanez IL, Notcovich C, Duran HA, Podhajcer OL. The tumor microenvironment: characterization, redox considerations, and novel approaches for reactive oxygen species-targeted gene therapy. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(8):854-95. Epub 2012/07/17.
22. Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, Escande D. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(13):7507-11. Epub 1998/04/29.

23. Preston TJ, Henderson JT, McCallum GP, Wells PG. Base excision repair of reactive oxygen species-initiated 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine inhibits the cytotoxicity of platinum anticancer drugs. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(7):2015-26. Epub 2009/07/02.
24. Rettig GR, Behlke MA. Progress toward in vivo use of siRNAs-II. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012;20(3):483-512. Epub 2011/12/22.
25. Rodel C, Martus P, Papadopoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(34):8688-96. Epub 2005/10/26.
26. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(12):3488-98. Epub 2009/08/07.
27. Scholer HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *The EMBO journal*. 1989;8(9):2543-50. Epub 1989/09/01.
28. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76. Epub 2006/08/15.
29. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(7):579-91. Epub 2009/05/30.
30. Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L, Yang ZF, Lu P, Chen KK, et al. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway. *Hepatology*. 2010;52(2):528-39. Epub 2010/08/05.
31. Wilkes G, Hartshorn K. Clinical update: colon, rectal, and anal cancers. *Seminars in oncology nursing*. 2012;28(4):e1-22. Epub 2012/10/31.
32. Wolpin BM, Meyerhardt JA, Mamon HJ, Mayer RJ. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2007;57(3):168-85. Epub 2007/05/18.
33. Ye XQ, Li Q, Wang GH, Sun FF, Huang GJ, Bian XW, et al. Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011;129(4):820-31. Epub 2011/04/27.
34. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*. 2008;13(8):1551-69. Epub 2008/09/17.
35. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules*. 2012;17(6):6196-236. Epub 2012/05/29.
36. Zielske SP, Spalding AC, Wicha MS, Lawrence TS. Ablation of breast cancer stem cells with radiation. *Translational oncology*. 2011;4(4):227-33. Epub 2011/08/02.

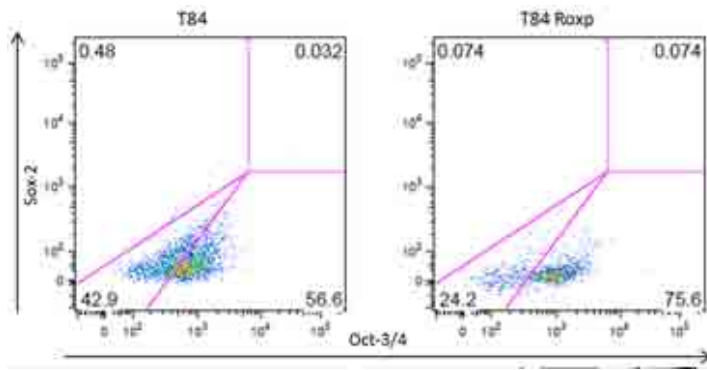
ANEXO



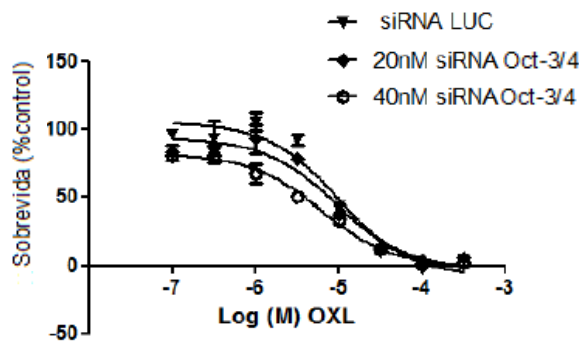
**Figura 1:** Cultivos de colonoesferas a partir de T-84 y T-84ROxp. (A) Fotomicrografía óptica a los 5 y 15 días de cultivo. (B) Número de colonoesferas formadas por T-84 y T-84ROxp a los 15 día de cultivo (% de incremento: Nro de esferas día 15/nro de esferas día 5) ( $p < 0,05$ ).



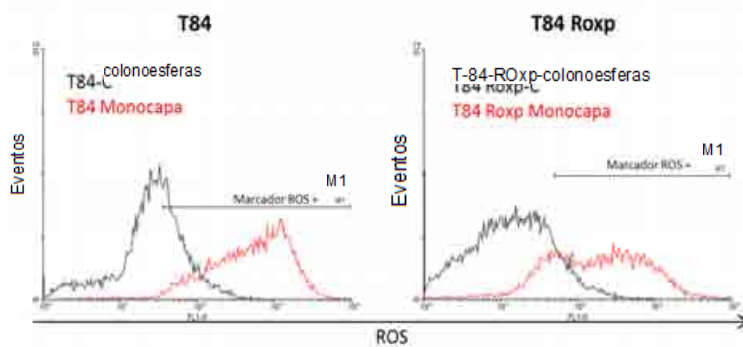
**Figura 2:** Inmunofluorescencia de cultivos de T-84 y T-84ROxp crecidas en monocapa (izquierda) o en colonoesferas (derecha). (A) Nanog, (B) Sox-2 y (C) Oct-3/4 marcado con Cy5 (rojo). Los núcleos están marcados con DAPI (azul).



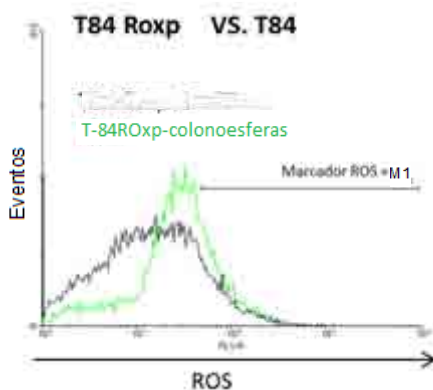
**Figura 3:** Citometría de flujo para Oct-3/4 y Sox-2 de los cultivos de colonoesferas generados a partir de T-84 y T-84ROxp (56,6% de Oct-3/4<sup>+</sup> en T84 y un 75,6% de Oct-3/4<sup>+</sup> en T-84ROxp) (p<0,05)



**Figura 4:** Sobrevida de células T-84ROxp con silenciamiento de Oct-3/4 expuestas a distintas dosis de oxaliplatino.

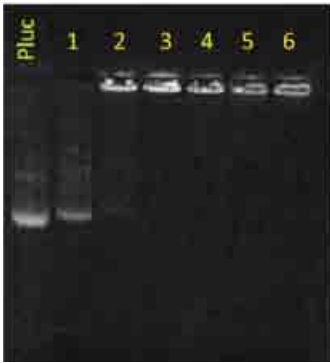


**Figura 5:** Citometría de flujo para la DCF-dA en las células T-84 (izquierda) y T-84ROxp (derecha) crecidas en monocapa y en T-84ROxp



**Figura 6:** Citometría de flujo para DCF-dA en los cultivos de colonoesferas para T-84 (verde) y T-84ROxp (negro).





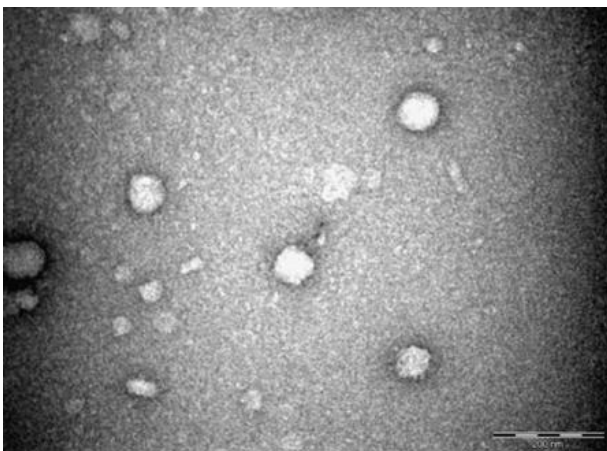
**Figura 7:** Electroforesis de los complejos PEI/ADN en gel de agarosa. De izquierda a derecha Calle 1: ADN plasmídico, Calles: 2-6 relaciones N/P: 1-6

	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
N/P 5	97,5 ± 32	7,2 ± 5
N/P 6	68,2 ± 32	18,6 ± 4
N/P 10	99,5 ± 5,3	23,2 ± 5,3
N/P 15	103 ± 7,5	20,3 ± 6,6

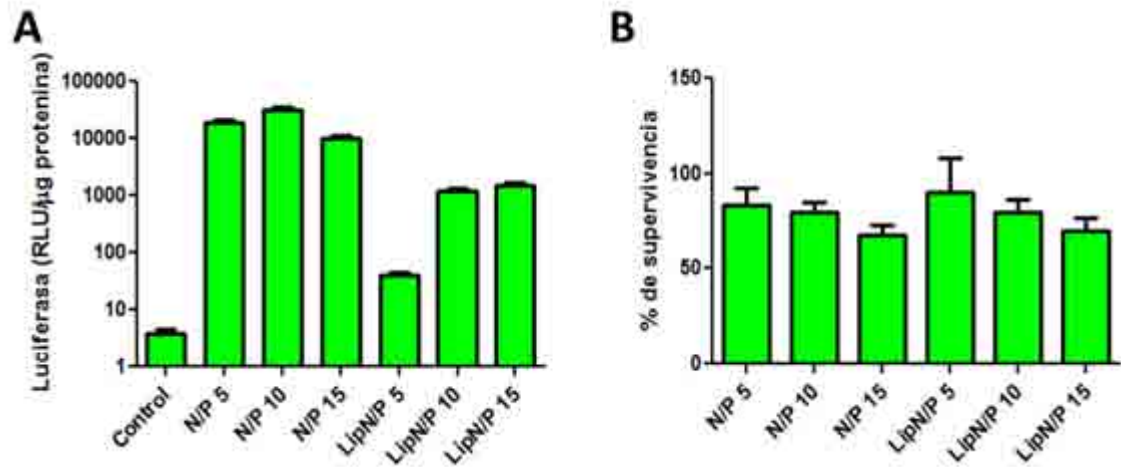
**Tabla 1:** Tamaño y potencial Z de complejos de PEI/ADN a distintas relaciones N/P.

	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	% de encapsulamiento
Liposoma	189,5 ± 63	13,6	95
Liposoma + heparina	153 ± 77	-29,2	95

**Tabla 2:** Tamaño, potencial Z y porcentaje de encapsulamiento del complejo (N/P 5) en liposomas.



**Figura 8:** Microfotografías de TEM de los complejos N/P 15 encapsulados en liposomas



**Figura 9:** Actividad y toxicidad de complejos PEI/ADN. A) Expresión de luciferasa en la línea celular LoVo incubada con complejos N/P 5, 10 y 15 y estos complejos encapsulados en liposomas: LipN/P5, LipN/P10 y LipN/P15. B) Toxicidad de los complejos N/P 5, 10 y 15 y estos encapsulados en liposomas LipN/P 5, LipN/P10 y LipN/P15 evaluada por el ensayo de MTT

# CÉLULAS MADRE CON PLURIPOTENCIALIDAD INDUCIDA PARA EL MODELADO DE LA INICIACIÓN Y PROGRESIÓN TUMORAL EN MAMA

**María Paula Marks**

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)

**Director:** Dr. Luciano Vellón

## RESUMEN

De acuerdo al modelo de Células Madre TumORAles (CMT), el crecimiento tumoral es mantenido por un número limitado de células madre que poseen la capacidad aberrante de autorrenovación, resistencia a terapias anti-cáncer convencionales y están implicadas en la recurrencia de la enfermedad y metástasis de distintos tumores, incluyendo el cáncer de mama (CMA). Sin embargo, su escasa frecuencia *in vivo*, sumado a la ausencia de marcadores fiables para su caracterización y aislamiento, hacen necesario el desarrollo de bioprocesos que permitan la producción masiva de células con el fenotipo, plasticidad y funcionalidad esperados en CMT de cáncer de mama humano. Al respecto, la reprogramación celular con factores definidos ofrece una gran herramienta para entender los mecanismos de generación de CMT a partir de diferentes subtipos de tumores mamarios. Dado que esta metodología puede ser demasiado costosa y laboriosa, se propuso como alternativa la generación de un microambiente tumoral artificial que permita el cultivo a gran escala de mamoesferas, enriquecidas en CMT, obtenidas a partir de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A.

## ABSTRACT

According to the Cancer Stem Cell (CSC) model, tumor growth is maintained by a limited subpopulation of cells that can self-renew, are resistant to conventional anti-cancer therapies and implicated in the recurrence and metastasis of different tumors, including breast cancer. However, both the scarce frequency of CSCs *in vivo*, and the lack of reliable markers for their characterization and isolation, requires the development of bioprocesses that allow massive production of cells with the phenotype, plasticity and function expected for CSCs in human breast cancer. In this regard, cell reprogramming with defined factors offers an appropriate tool to understand the mechanisms that underlay the generation of CSCs from different subtypes of breast cancer. Nonetheless, since this technique can be expensive and time-consuming, we have proposed to create an artificial tumor microenvironment that allows large-scale culture of mammospheres, which are enriched in CSCs, derived from MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A breast cancer cell lines.

## INTRODUCCIÓN

Una idea central dentro del concepto de células madre tumorales (CMT) es la observación de que no todas las células en un tumor son iguales. De acuerdo al modelo de CMT, el crecimiento tumoral es mantenido por un número limitado de células madre que poseen la capacidad aberrante de autorrenovación, mientras que la masa del tumor está formada por células en proliferación rápida y células diferenciadas postmitóticas [1]. La mayoría de las CMT presentan resistencia a terapias anti-cáncer convencionales, incluyendo quimioterapia y radiaciones ionizantes, estando implicadas en la recurrencia de la enfermedad y metástasis durante la evolución de distintos tumores, incluyendo el Cáncer de Mama (CMA) [2, 3]. Dichos autores identificaron una subpoblación en CMA con un fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> capaces de perpetuarse y regenerar la heterogeneidad tumoral en ratones inmunosuprimidos. Interesantemente, las CMT usurparían la maquinaria molecular y los factores que regulan el funcionamiento de las células madre normales, con lo cual es más que razonable suponer que la comprensión de las características de las CMT y su paralelismo con la función normal de las células madre resultará en un entendimiento más profundo de la patogénesis tumoral en la mama [3].

En efecto, en células tumorales, la capacidad adquirida de dividirse perpetuamente y sustentar el crecimiento, metástasis y capacidad invasiva tiene puntos en común con la biología de las células madre embrionarias (ESC). La inmortalización de células tumorales se ha asociado a la activación de vías de señalización esenciales para la autorrenovación celular, tales como Wnt, sonic hedgehog (SHH) o Notch [4, 5]. Es más, la organización de la cromatina puede presentar similitudes entre ESC y ciertos tipos de tumores indiferenciados, tal como sucede con la pérdida de marcadores de heterocromatina en modelos de tumores de mama metastáticos y de leucemias linfoides [6,7,8]. Adicionalmente, se ha demostrado que los factores que componen el cóctel de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) se encuentran sobreexpresados en varios tipos de tumores, por ejemplo, los niveles de Oct4 se encuentran aumentados en cáncer de vejiga, próstata, oligodendrioma, glioblastoma multiforme y astrocitoma, cáncer primario de colon, etc. Sox2 generalmente actúa como un *partner* de Oct4 y se encuentra sobreexpresado en cáncer de páncreas, cáncer de mama y carcinoma hepatocelular. Klf4 se encuentra elevado en carcinoma de células escamosas, cáncer de mama, leucemia linfoblástica aguda entre otros. c-Myc es un conocido oncogén con sobreexpresión en una amplia gama de tumores [9]. Las células tumorales pueden “reprogramarse” a un estado similar al de célula madre [10] y la expresión de los factores de Yamanaka en la línea celular derivada de epitelio mamario humano no transformado MCF-10 da como resultado células con características de CMT, tales como expresión de los marcadores CD44, ABCG2, y ALDH 1A1 (aldehído-deshidrogenasa 1A1), formación de colonias en condiciones independientes de sustrato y formación de tumores en ratones inmunosuprimidos [11].

La adquisición de propiedades características de células madre en células de epitelio mamario podría ser amplificada *in vivo* por señales del microambiente tumoral que promuevan el proceso de Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) [12]. La influencia de los factores del microambiente se evidencia por la observación de que medios condicionados provenientes de explantes de adipocitos de tumores mamarios humanos promueven un fenotipo más migratorio e invasivo en líneas celulares de tumor de mama. Interesantemente, se ha demostrado que los adipocitos residentes en tumores de mama secretan, entre otras citoquinas el factor de crecimiento tumoral beta 1 (*Tumor Growth Factor-β1*, TGF-β1) [13], uno de los principales mediadores de EMT. Confirmando la noción de que el microambiente puede determinar el destino de las células madre, se ha demostrado que la glándula mamaria murina es capaz de redirigir células madre adultas testiculares y progenitores neurales murinos hacia células del epitelio mamario durante la regeneración de la glándula mamaria [14]. Células de carcinoma embrionario y de tumores mamarios pueden ser reprogramadas, proliferar y dar origen a los distintos linajes mamarios cuando se mezclan con células epiteliales de mama normales y son inoculadas en almohadillas grasas de ratones inmunosuprimidos [15,16].

A pesar de tener un gran impacto en el diagnóstico, tratamiento y prevención de CMA, la ausencia de marcadores fiables de células madre en tumores sólidos hace necesarios bioprocesos basados en características funcionales de las CMT que faciliten su producción de forma masiva, repetible y en condiciones definidas. En este sentido, la experiencia en cultivos a gran escala de células madre de mama se encuentra limitada a epitelio mamario murino [17,18,19]. En dichos trabajos, se ha estimado que una muy pequeña fracción (1:2.500) de células en el epitelio mamario murino poseen la capacidad de regenerar el epitelio mamario, en tanto que esferoides derivados de un ratón transgénico sobreexpresando el gen *her2/neu* contienen un 40% de células con capacidad de auto-renovación [18, 19].

Como consecuencia, las CMT representan una diana terapéutica prometedora, con el potencial para el desarrollo de terapias de combinación dirigidas tanto contra las CMT como a la masa de células tumorales diferenciadas, incrementando el grado de respuesta frente a los tratamientos estándares. Sin embargo, y aunque atractivo, el concepto de CMT como diana terapéutica aún requiere una validación de los mecanismos moleculares de autorrenovación, dormancia, y multirresistencia a drogas de estas células. Adicionalmente, las CMT de mama son una población escasa *in vivo*, por lo tanto, es necesario el desarrollo de bioprocesos que permitan la producción masiva de células con el fenotipo, plasticidad y funcionalidad esperados en CMT de cáncer de mama humano, y que puedan ser capitalizados para el diseño racional de modelos de iniciación y progresión tumoral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Cultivo de Líneas Celulares***

Se utilizaron líneas establecidas de cáncer de mama representando los distintos subtipos moleculares según Neve y col. (2009) [20]: Luminal A: MCF-7, Basal B: MDA-MB-231, así como la línea de epitelio mamario inmortalizada MCF-10A. Se cultivaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM/F12 enriquecido con Suero Fetal Bovino, Glutamina y antibiótico (Penicilina/Estreptomicina, P/S). Para el cultivo de células reprogramadas se utilizó el medio Knock-Out DMEM enriquecido con Knock-Out Serum Replacement (KSR), Glutamax, 2-Beta-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales (NEAA) y P/S.

### ***Generación y cuantificación de mamoesferas***

La formación de esferas se efectuó de acuerdo al protocolo original publicado en Dontu y col. (2003) [21] y validado por colaboradores del grupo de Regulación del Crecimiento Celular dirigido por el Dr. Angel García Martín [22, 23]. Brevemente, se trataron placas de cultivo de 6 pocillos con poli-Hema (poli 2-hidroxietilmetacrilato) para evitar la adhesión celular. Posteriormente, se cultivaron las células (1.000-2.000 cél/ml) en medio de esferas, compuesto por DMEM/F12 enriquecido con B27, glutamina, Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF). Las células se dejaron crecer durante siete a catorce días y se observó la formación de mamoesferas. Para una cuantificación más precisa de las mamoesferas, se utilizó el ensayo de dilución límite (LDA), que permite calcular la frecuencia de formación de una esfera por número de células mediante análisis estadístico [24]. El mismo se realizó utilizando la herramienta online disponible en el Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research Bioinformatics Division (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda>).

### ***Aislamiento de Fibroblastos Embrionarios Murinos (MEF)***

Las hembras preñadas se sacrificaron a los 13.5 dpc por inhalación de CO<sub>2</sub> y se dispone de los restos según lo establecido por las normas del Bioterio del IBYME. Se extrajeron los cuernos uterinos y se realizó un lavado en PBS, se separaron los embriones de la placenta y del saco vitelino. Una vez lavados los embriones, se separó la cabeza y los órganos oscuros. Una vez hecho esto, se disgregó mecánicamente el tejido hasta que la suspensión celular se pudo recoger con micropipeta. Se digirió entonces enzimáticamente, se inactiva la enzima y se coloca la suspensión celular en medio de cultivo fresco, pasándose el equivalente de 3-4 embriones a un frasco de cultivo T175. Esto se considera el pasaje o (Po), a partir del cual se realiza la expansión y almacenamiento de los MEF. Este procedimiento fue aprobado por el comité de Ética del IBYME y se encuentra ampliamente documentado, una muy buena descripción puede encontrarse en el siguiente link del Journal of Visualized Experiments (JOVE), donde se describe el protocolo utilizado en el Max Planck Institute for Molecular Genetics y se hace constar la aprobación por parte del comité ético correspondiente: <http://www.jove.com/video/3854/preparation-mouse-embryonic-fibroblast-cells-suitable-for-culturing>.

### ***Producción de lentivirus***

Se utilizaron cuatro vectores lentivirales bicistrónicos que coexpresan cada uno de los factores Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc (pLMs-OSKM) junto con una proteína fluorescente bajo el promotor de la fosfoglicerato-quinasa humana (hPGK) [25]. La combinación de proteínas fluorescentes pudo ser detectada por microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo, permitiendo un seguimiento en tiempo real de la expresión de cada factor. El panel de vectores lentivirales es, por tanto: vexGFP-Oct4; mCitrine-Sox2; mCherry-Klf4 y mCerulean-cMyc (fig 1). Dichos vectores fueron solicitados a Addgene, mientras que los vectores de empaquetamiento (pMD2G) y envoltura (psPAX) de lentivirus de segunda generación fueron cedidos por el laboratorio de investigación aplicada a las Neurociencias de la Fundación Fleni, dirigido por el Dr. Santiago Miriuka. La extracción de ADN plasmídico se realizó con el kit Midiprep de Quiagen. Para la producción de lentivirus, se transfectaron células Hek293 por el método de Cloruro de Calcio, durante 6 horas. Una vez reemplazado el medio de transfección por medio fresco, se recogieron los sobrenadantes virales a las 50 horas y se almacenaron a -80°C.

### ***Infeción y reprogramación celular***

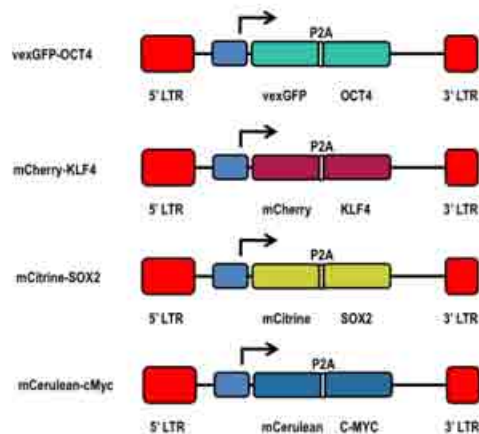
Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron en presencia de los sobrenadantes virales durante aproximadamente 16-20 horas y cinco a siete días después de la

infección, se colocaron en placas sobre un sostén celular de fibroblastos embrionarios murinos irradiados (irrMEF) cambiando el medio de cultivo por medio específico para ESC humanas. Para el cultivo de células reprogramadas se utilizó el medio Knock-Out DMEM enriquecido con Knock-Out Serum Replacement (KSR), Glutamax, 2-Beta-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales (NEAA) y P/S. Aproximadamente 20 días después, las colonias con una morfología similar a ESC se pasaron manualmente a placas con soportes celulares de fibroblastos irradiados y se expanden para detectar marcadores de pluripotencialidad y capacidad de diferenciación. Para el ensayo de fosfatasa alcalina se utilizó el "Alkaline Phosphatase detection Kit" de Millipore (Cat No SCRo04), de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante. Brevemente, se preparó una mezcla de Fast Red Violet/Naftol/H<sub>2</sub>O (solución FRV) en una proporción 2/1/1 respectivamente en un volumen suficiente para obtener 1ml de reactivo por pocillo de placa de 6 (10 cm<sup>2</sup>/pocillo). Se fijaron las células con PFA 4%, se lavó y se agregó un volumen suficiente de la solución FRV, y se incubó a RT en agitación durante 15 minutos en oscuridad. Posteriormente, se aspiró la solución FRV y se lavó. Se agregó PBS y se contó el número de colonias coloreadas AP positivas (indiferenciadas) respecto de las AP negativas (diferenciadas).

## RESULTADOS PRELIMINARES

### *Producción de vectores virales y reprogramación celular*

Los vectores lentivirales pLM-OSKM fueron obtenidos de Addgene y responden al siguiente esquema (fig.1)



**Fig 1:** Representación esquemática de los vectores vexGFP-Oct4; mCitrine-Sox2; mCherry-Klf4 y mCerulean-cMyc. **LTR, Long terminal repeat** (Papapetrou y col., 2009).

Una vez obtenidos se realizaron ensayos de introducción a las técnicas de reprogramación celular en líneas de fibroblastos dérmicos humanos disponibles comercialmente. El protocolo de reprogramación para células somáticas se esquematiza en la figura 2 y se realiza de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Una vez obtenidas las primeras colonias luego de la infección y mediante el ensayo de fosfatasa alcalina (AP), se procedió a calcular las frecuencias de reprogramación de acuerdo a la fórmula  $(\text{número de colonias AP+} / 20.000 \text{ células infectadas}) \times 100$ , en presencia (barra anaranjada) y en ausencia (barra gris) de Ácido Valproico (VPA), un inhibidor de histona deacetilasas que aumenta significativamente la frecuencia de reprogramación (fig. 3).

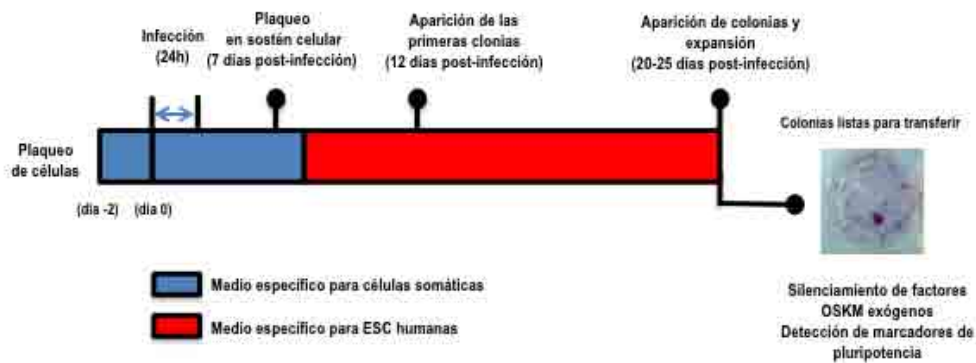


Fig 2: Planteo esquemático del proceso de reprogramación de células somáticas.

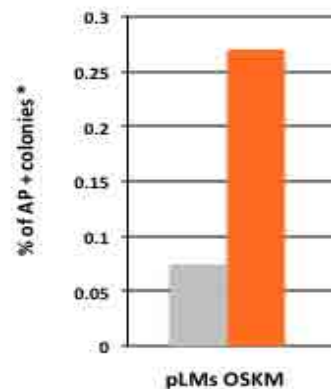


Fig 3: frecuencias de reprogramación de acuerdo a la fórmula  $(\text{número de colonias AP+} / 20.000 \text{ células infectadas}) \times 100$ , en presencia (barra anaranjada) y en ausencia (barra gris) de VPA.

Se comenzó con la infección de la línea celular MCF-7 para evaluar las frecuencias de infección, reprogramación y establecer los correspondientes clones de células reprogramadas. Al respecto, ya establecimos sublíneas de células MCF-7 expresando cada uno de los factores de Yamanaka para su utilización en estudios funcionales de estado CMT.

### Generación de Mamoesferas

Dado que la reprogramación por factores definidos utilizando vectores virales puede ser una metodología demasiado costosa y laboriosa para la obtención de Células Madre Tumorales (CMT) putativas, se planteó como un objetivo de salida, establecer bioprocesos para la generación de un microambiente tumoral "artificial" que permita el cultivo a gran escala de mamoesferas generadas a partir de modelos celulares de tumores mamarios. Dichas mamoesferas están enriquecidas en CMT, y pueden ser de gran utilidad como modelos para la realización de estudios celulares, moleculares y el cribado de drogas específicas. Con este propósito se ha puesto a punto la técnica de generación de mamoesferas a partir de las líneas celulares de carcinoma mamario MCF-7 (fig 4), MDA-MB-231 y de epitelio mamario no transformado MCF-10A. Adicionalmente, se está poniendo a punto el ensayo de dilución límite para cuantificación de esferas (LDA), que permite calcular la frecuencia de formación de una esfera por número de células (fig 5).

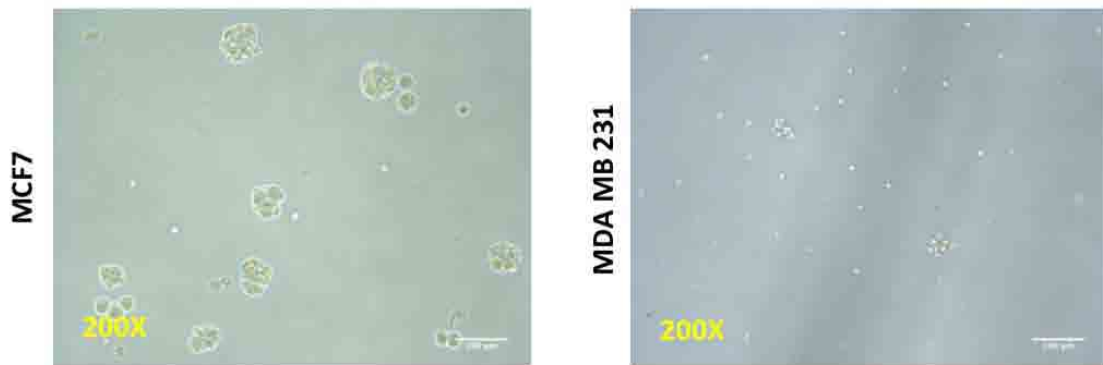


Fig 4: Mamoesferas resultantes de las células MCF-7 y MDA-MB-231 cultivadas durante 11 días en suspensión.

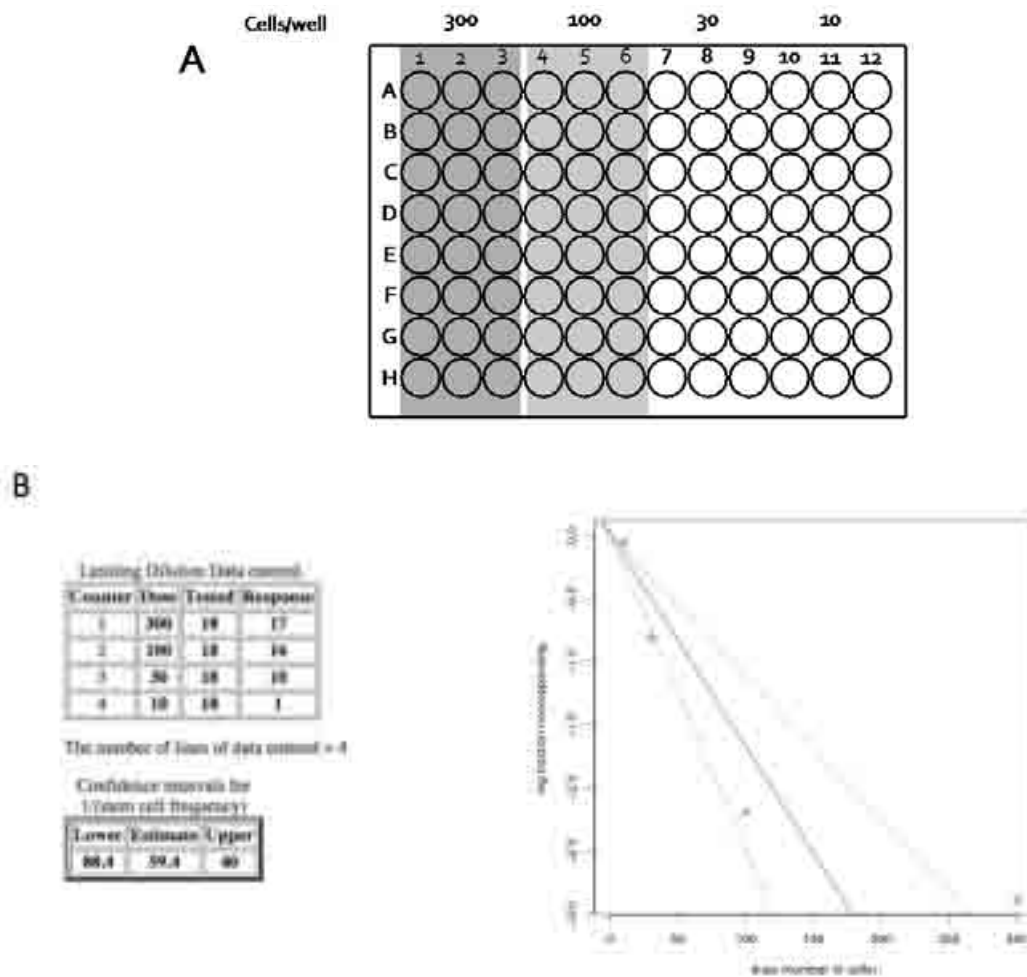


Fig 5: Ensayo de LDA en células MCF-7. **A.** Se muestra el diseño de la placa y distintos números de células utilizados. **B.** Izquierda: Se observa el cuadro de salida que se obtiene a partir del programa especializado disponible en el sitio web del Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research Bioninformatics Division donde se ingresa el número de células (dosis), la cantidad de experimentos testeados (Tested) y la cantidad de eventos positivos (response). El análisis da como resultado la frecuencia de stem cells (1/stem cell frequency). Derecha: se



observa el gráfico donde se muestra la curva de regresión entre el número de células (dosis) y los eventos positivos (la inversa del logaritmo de eventos sin respuesta)

## DISCUSIÓN

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial, en la medida que otras causas de mortalidad son controladas y la población envejece, las enfermedades neoplásicas aparecen entre las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo.

El cáncer de mama (CMA) es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en países desarrollados y en vías de desarrollo, estimándose un total de más de 1.700.000 nuevos casos por año a nivel global. La Argentina tiene la segunda tasa de mortalidad en el continente, lo que se traduce en unas 5.400 muertes/año, y se estiman 18.000 nuevos casos anuales [26].

Como ya se mencionó, una de las principales barreras para el diseño de terapias dirigidas específicamente contra las CMT en mama y en otros tumores es su escasa frecuencia *in vivo*. En este sentido, las aplicaciones clínicas de las células madre requieren el uso de grandes cantidades de células, en el orden de  $10^{10}$ - $10^{12}$ , lo que genera la necesidad de sistemas de cultivo escalables y reproducibles [27].

La reprogramación celular ha generado gran expectativa tanto en ciencia básica como en industria, y ofrecen una gran herramienta todavía no muy explotada para el modelado de los mecanismos de generación de CMT. Por lo tanto, la combinación de una serie de condiciones de cultivo que promueve la autorrenovación y la proliferación celular con una serie de ensayos de caracterización efectiva de CMT mamarias, permite la generación de un grupo de CMT "putativas" a partir de diferentes subtipos de tumores mamarios. Estudios previos de nuestro grupo, utilizando la tecnología de reprogramación celular en modelos de tumores de mama luminales (MCF-7), demuestran que la tecnología de reprogramación de Yamanaka puede ser utilizada para reprogramar (epigenéticamente) células tumorales obtenidas de pacientes de CMA y crear plataformas personalizadas para "predecir" la trayectoria evolutiva de tumores individuales. Al respecto, hemos demostrado que células de la línea MCF-7 pueden ser reprogramadas a un estado intermedio entre células tumorales y células iPS *bona fide*, con reactivación de la expresión endógena de Sox2 y silenciamiento del Sox2 exógeno. Estas células mostraban actividad fosfataza alcalina (AP) así como un incremento del porcentaje de células CD44+ y de células ALDEFLUOR+, indicando un estado más cercano a CMT que la población original [28].

Considerando que las CMT se encuentran en una frecuencia muy baja en los tumores, esta estrategia produciría un número adecuado de células madre tumorales "putativas" o "avatares" que capturen el genoma del tumor de un individuo en particular. Estos "avatares" o células madre tumorales inducidas (iCSC), serían de gran utilidad en experimentación, representando una oportunidad única para tomar ventaja de una tecnología novedosa y prometedora para la comprensión de la iniciación tumoral, con gran potencial para el cribado de drogas dirigidas específicamente contra las CMT y el estudio de los mecanismos de resistencia a terapia. Adicionalmente, las iCSC se podrían re-diferenciar luego de un trasplante ortotópico en los tejidos correspondientes en ratones inmunodeficientes para generar avatares murinos/iCSC. Este modelo *in vivo* progresaría a lo largo de los diferentes estadios tumorales, lo que permitiría la exploración directa de sus propiedades biológicas para el cribado de drogas, diagnóstico y tratamiento personalizado en pacientes. Este abordaje permitiría, además, efectuar comparaciones pareadas con células madre pluripotentes inducidas (iPSC) normales derivadas del mismo *background* genético. Es más, la edición genómica de las iCSC permitiría crear plataformas traslacionales para investigar directamente la relación entre los cambios en expresión genética y malignización de forma libre del "ruido de fondo" epigenético y proveer una base conceptual para el futuro desarrollo de terapias cromosómicas dirigidas contra las aneuploidías en tumores. Se podría también determinar las marcas epigenéticas que corrigen el carácter tumorigénico de la población celular reprogramada, y normalizar el fenotipo maligno *in vivo*. En su conjunto, una serie de xenopacientes "2.0" generados mediante la reprogramación de los paisajes epigenéticos de los genomas de pacientes con cáncer podría revolucionar las plataformas actuales utilizadas en investigación en oncología molecular, proveer una herramienta para la prestación de servicios científicos y generar gran valor para el modelado de procesos tumorales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* (2011), 17(3): 313-9.
2. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003), 100(7): 3983-8.
3. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* (2008), 26(17): 2813-20.
4. Ruiz i Altaba A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* (2002), 2(5): 361-72.
5. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* (2001), 414(6859): 105-11.
6. Kirschmann DA, Lininger RA, Gardner LM, Seftor EA, Otero VA, Ainsztein AM, et al. Down-regulation of HP1 $\alpha$  expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer Res* (2000), 60(13): 3359-63.
7. Dialynas GK, Vitalini MW, Wallrath LL. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutat Res* (2008), 647(1-2): 13-20.
8. Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, et al. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell* (2010), 6(5): 479-91.
9. Sun C, Liu YK. *J Cancer Res Clin Oncol* (2010), 137(1): 1-8.
10. Oliveras-Ferreros C, Vazquez-Martin A, Menendez JA. Pharmacological mimicking of caloric restriction elicits epigenetic reprogramming of differentiated cells to stem-like self-renewal states. *Rejuvenation Res* (2010), 13(5): 519-26.
11. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene* (2013) Jan 14. doi: 10.1038/onc.2012.614. [Epub ahead of print].
12. Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011), 108(19): 7950-5.
13. Pistone Creydt V, Fletcher SJ, Giudice J, Bruzzone A, Chasseing NA, Gonzalez EG, et al. Human adipose tissue from normal and tumoral breast regulates the behavior of mammary epithelial cells. *Clin Transl Oncol* (2013), 15(2): 124-31.
14. Booth BW, Mack DL, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, Boulanger CA, Smith GH. The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008), 105(39): 14891-6.
15. Bussard KM, Boulanger CA, Booth BW, Bruno RD, Smith GH. Reprogramming human cancer cells in the mouse mammary gland. *Cancer Res* (2010), 70(15): 6336-43.
16. Bussard KM, Smith GH. Human breast cancer cells are redirected to mammary epithelial cells upon interaction with the regenerating mammary gland microenvironment in-vivo. *PLoS One* (2012), 7(11): e49221.
17. Liu M, Liu N, Zang R, Li Y, Yang ST. Engineering stem cell niches in bioreactors. *World J Stem Cells* (2013), 5(4): 124-35.
18. Youn BS, Sen A, Kallos MS, Behie LA. Large-Scale Expansion of Mammary Epithelial Stem Cell Aggregates in Suspension Bioreactors. *Biotechnol Prog* (2005), 21(3): 984-93.
19. Youn BS, Sen A, Behie LA, Girgis-Gabardo A, Hassell JA. Scale-up of breast cancer stem cell aggregate cultures to suspension bioreactors. *Biotechnol Prog* (2006), 22(3): 801-10.
20. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. *Cancer Cell* (2006), 10(6): 515-27.
21. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. *Genes Dev* (2003), 17(10): 1253-70.
22. Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, et al. *Oncogene* (2012), 31(11): 1354-65.
23. Iglesias JM, Belouqui I, García-García F, Leis O, Vazquez M A, Eguiara A, et al. *Stem Cells* (2013). *PLoS One*, 8(10):e77281. doi: 10.1371.
24. Rota LM, Lazzarino DA, Ziegler AN, LeRoith D, Wood TL. Determining mammosphere-forming potential: application of the limiting dilution analysis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2012), 17(2): 119-23.
25. Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, Menon J, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009), 106(31): 12759-64.
26. Estudio Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. Informe final julio de 2010: diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales
27. Liu N, Zang R, Yang ST, Li Y. Stem cell engineering in bioreactors for large-scale bioprocessing. *Engineering in life sciences* (2014), 14: 4-15.

28. Corominas-Faja B, Cufí S, Oliveras-Ferraro C, Cuyàs E, López-Bonet E, Lupu R, et al. Nuclear reprogramming of luminal-like breast cancer cells generates Sox2-overexpressing cancer stem-like cellular states harboring transcriptional activation of the mTOR pathway. *Cell Cycle* (2013), 12(18): 3109-24.
29. Menendez JA, Alarcón T, Corominas-Faja B, Cuyàs E, López-Bonet E, Martín AG, et al. [Xenopatients 2.0: reprogramming the epigenetic landscapes of patient-derived cancer genomes](#). *Cell Cycle* (2014), 13(3): 358-70.

# IMPORTANCIA DEL MICROAMBIENTE ESTROMAL, EN PARTICULAR DE LA CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y DE LA CÉLULA TUMORAL EN LA EVOLUCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

## PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES Y DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN LA EVOLUCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

**Ayelén Matas**

Laboratorio de Inmunohematología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)

**Director:** Dra. Labovsky Vivian

### RESUMEN

Estudios evidencian que en la interacción entre los componentes del sistema inmune y las células tumorales, durante el desarrollo del cáncer de mama, puede prevalecer un estado de supresión del primero, resultando en una respuesta inmune poco competente para poder vencer las estrategias de las células tumorales para evadir los mecanismos efectores. El equipo investigó si el papel pro-tumoral de las células madre mesenquimales y de los fibroblastos asociados al tumor podría asociarse con la presencia de alguna población de células del sistema inmune y si la presencia de estas últimas células podrían asociarse con los parámetros de pronóstico clásicos y otros datos clínico-patológicos de las pacientes con carcinoma mamario ductal infiltrante (estadios I/II). Demostramos que el número elevado de células positivas para CD4, en el estroma del tejido tumoral es un parámetro evidente de pronóstico desfavorable para estas pacientes. El mismo, es un biomarcador predictivo del desarrollo de metástasis, en particular ósea, y menor sobrevida. Por otra parte, nuestros resultados indicaron que el número elevado de células positivas para CD1a en el estroma del tejido tumoral de estas pacientes es un parámetro evidente de pronóstico favorable del cáncer de mama como lo es la ausencia de metástasis y mayor sobrevida.

### ABSTRACT

Previous studies have shown that, upon the interaction between the components of the immune system and tumor cells during breast cancer development, a state of immune suppression can prevail, resulting in an immune response unable to overcome the tumor strategies to evade effector mechanisms. We investigated whether the tumor-promoting role of mesenchymal stem cells and tumor-associated fibroblasts could be associated with the presence of specific immune cells populations, and whether the presence of these latter cells could be associated with classical prognostic parameters and clinical-pathological data from breast invasive ductal carcinoma patients (stages I / II). To this regard, it was shown that the significant high number of CD4 positive cells in the tumor stroma is a parameter for poor prognosis, a predictive biomarker for metastases to bone and lower survival expectancy in breast cancer. Conversely, our results indicated that the high number of CD1a positive cells in the tumor stroma of these patients is a parameter for favorable prognosis, absence of metastases and longer survival in breast cancer.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM), a pesar de ser tema de gran número de investigaciones, continúa siendo el cáncer más común entre las mujeres [1, 2]. Un estudio realizado en Argentina durante el trienio 2008-2010, indicó que la mayor mortalidad por cáncer en mujeres corresponde al CM, con un promedio anual de casos de 5.367/ 25.618 totales [3]. Y a pesar de los esfuerzos realizados para detectar el CM en estadios tempranos, esto no garantiza la sobrevida del paciente [4]. En los últimos años se demostró

que la formación de un tumor clínicamente relevante depende de la composición y función del microambiente tumoral (**MT**). Dentro de este MT se han encontrado fibroblastos, pericitos, leucocitos [linfocitos T (**LT**), linfocitos B (**LB**), *natural killer*, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, basófilos y mastocitos], miofibroblastos o fibroblastos asociados al tumor (**TAF**), células dendríticas, células endoteliales vasculares linfáticas y de sangre, células derivadas de médula ósea entre las cuales se encuentran las células madre mesenquimales (**MSC**) y los progenitores mesenquimales, las células madre hematopoyéticas y progenitores hematopoyéticos, así como células supresoras derivadas de progenitores mieloides.

Hoy se sabe que el MT proporciona señales esenciales para el mantenimiento de las células madre tumorales o las células que inician el tumor y promueven la siembra de células cancerosas en los sitios metastásicos [5]. En particular, los tumores primarios o metastásicos atraen MSC a su MT donde ellas o diferenciadas en TAF actúan como reguladoras de la proliferación, supervivencia, migración y metástasis de la célula tumoral, así como del proceso de angiogénesis y de la supresión del sistema inmune [6-9].

Si bien la mayoría de los componentes celulares del sistema inmunológico son capaces de rechazar tumores, en la práctica son utilizados por las células tumorales para promover su crecimiento e invasión. [10] A partir de la segunda mitad del siglo XX los Cirujanos Mamaros y Patólogos comenzaron a reportar la presencia de infiltración linfocítica en los tumores mamaros, suceso que sugería una participación efectiva del sistema inmune. Posteriormente, el estudio de los ganglios linfáticos axilares y la definición de "ganglio centinela" permitieron precisar, que a pesar de la importancia de estas estructuras como sitios del primer encuentro entre tumor y sistema inmune, no deben ser considerados barreras absolutas contra la diseminación de células malignas, porque no siempre los mecanismos propios del sistema inmune participan eficientemente contra el tumor. El CM es una enfermedad que se mantiene latente por un período largo. En esa etapa, el sistema inmune puede inhibir el desarrollo de las células neoplásicas o hacer lo contrario y aceptarlas como "propias". Así, el conocimiento y control del MT se está convirtiendo en algo tan importante como el conocimiento y control de las células tumorales para entender mejor la biología del cáncer y para idear un nuevo enfoque terapéutico [10].

De lo expuesto anteriormente surge el interés de encontrar asociaciones entre la presencia de MSC y/ o TAF y las células del sistema inmune que demuestren el papel inmunosupresor de las primeras; así como asociaciones entre las células del sistema inmune con los parámetros de pronóstico clásicos y otros datos clínico-patológicos de las pacientes con cáncer de mama (**PCM**) para establecer nuevos elementos predictores de la evolución tumoral y de la tendencia a desarrollar metástasis.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio es de cohorte retrospectiva incluyendo casos consecutivos con diagnóstico clínico e histo-patológico confirmado por Médicos especialistas. Se trabajó con cortes del taco de tumores primarios obtenidos de 41 PCM en estadio clínico-patológico temprano, libres de tratamiento adyuvante. Como control utilizamos tejido mamario no neoplásico proveniente de 10 mujeres. Las PCM tuvieron un rango de edad entre 42 y 79 años, mientras que las mujeres control entre 40 y 75 años.

Todas las muestras pertenecían al Archivo de Cirugía del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Italiano, Ciudad de Buenos Aires. Este trabajo se desarrolló bajo los principios de la Declaración de Helsinki. El proyecto fue aprobado tanto por el Comité de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (**IBYME**) como por el Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano. Dichas aprobaciones también incluyen la de los consentimientos informados.

### **Muestras**

Las muestras se obtuvieron del material tumoral original extraído de la mama en el momento de la cirugía de las PCM y las muestras controles de tejidos de mama que resultaron no neoplásicos. Los Médicos Patólogos Mamaros Dres. Hernán García Rivello, Kevin Mauro Davies y Sáez Perrotta Marie Catherine, todos del Hospital Italiano, nos entregaron cortes de 4 µm de tejido mamario, los cuales fueron embebidos en parafina previa fijación con formol neutro al 10%.

Los criterios de inclusión muestral fueron incorporar mujeres con carcinoma mamario ductal infiltrante, estadio clínico-patológico temprano I y II [según el sistema **TNM** (tamaño, presencia de nódulos y metástasis) de la Unión Internacional de Lucha contra el Cáncer] y que presentaban un

período de tiempo mínimo de 10 años desde el momento de su cirugía, así como mujeres controles con resultados negativos de CM. Los criterios de exclusión fueron pacientes que desarrollaron otros tumores primarios, así como tejido mamario no disponible en ambos grupos.

### ***Inmunohistoquímica***

Iniciamos el ensayo de inmunohistoquímica (**IHQ**) con el desparafinado e hidratado según un protocolo estándar. El proceso de recuperación antigénica lo llevamos a cabo mediante la incubación de las muestras en TRIS-EDTA en baño térmico a 98°C durante 20 minutos (**min**). Bloqueamos la actividad de peroxidasa endógena mediante una incubación con peróxido de hidrógeno 3% durante 5 min y realizamos el bloqueo proteico incubando las muestras con PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente.

La incubación de los anticuerpos primarios (**Ac**) se llevó a cabo durante toda una noche a 4°C. Los Ac usados y sus correspondientes concentraciones se detallan en la Tabla 1, donde también se describen los controles de isotipo respectivos. Se utilizó PBS 1X para la dilución de los Ac.

Revelamos utilizando el sistema Biotina-Estreptoavidina-HRP de Dako (Dako, K0690). Para tal fin, se incubaron los cortes con el Ac secundario universal-biotinilado durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente con el Ac unido a estreptoavidina-peroxidasa de rábano (**HRP**) durante 30 min a temperatura ambiente y se revelaron utilizando como cromógeno 3'3'-diaminobencina (**DAB**, Dako K3468) diluido, según indicaciones del fabricante, en buffer Imidazol-HCl pH 7,5 con peróxido de hidrógeno y agentes antimicrobianos (Buffer Sustrato, Dako K3468). Se contra-tiñeron los núcleos de las células con Hematoxilina durante 1 min. Montamos los preparados con Bálsamo sintético de Canadá (Canadax, Biopur).

### ***Cuantificación***

Las lecturas fueron realizadas con microscopio óptico por dos patólogos (Dra. Saez Perrotta MC y Dr. Davies KM) del Hospital Italiano. Se contó el número de células positivas por campo, considerando positivas aquellas células con marca y con la morfología correspondiente esperada para cada marcador evaluado. Para cada muestra se obtuvo el resultado de 5 campos y se calculó un promedio de los mismos. El valor del coeficiente Kappa como medida del grado de acuerdo en la evaluación de la expresión de estas moléculas entre ambos observadores fue 0,8002 (lo cual indica un muy buen acuerdo).

Las fotografías se obtuvieron con el microscopio Nikon Eclipse Ti-E con cámara, usando el software ArcturusXT, del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Las imágenes fueron editadas con el uso de Corel Draw.

### ***Relevamiento de datos***

En nuestro trabajo se consideraron los siguientes parámetros de pronóstico clásicos del CM: edad, tamaño tumoral, grado histológico, receptor de estrógeno (**RE**) y receptor de progesterona (**RP**), Her2/neu y presencia/ausencia de nódulos linfáticos regionales. Categorizamos estos datos clínico-patológicos según un procedimiento de diagnóstico estandarizado [13]: i) pacientes <50 y ≥ 50 años; ii) pacientes con tamaño del tumor < 2 y ≥ 2 cm; iii) el grado histológico fue evaluado basado en el sistema de clasificación Scarff Bloom Richardson [14] y expresado como bien (G1), intermedio (G2) y pobremente diferenciado (G3); iv) los receptores hormonales (RE y RP) y la expresión de Her2/neu fueron considerados como negativos o positivos de acuerdo a Martínez et al. [11] y v) la presencia de nódulos linfáticos metastásicos regionales (centinelas/axilares) fue también categorizada como negativo o positivo (incluyendo los que presentaron micrometástasis).

También recolectamos los siguientes datos clínico-patológicos: número de PCM que desarrollaron metástasis, que presentaron la primera evidencia de metástasis en hueso y que tuvieron recidiva local (recidiva del tumor primario extirpado en el mismo sitio de la mama). Además, tuvimos en cuenta el tiempo transcurrido post-cirugía: libre de enfermedad (período desde la fecha de la cirugía hasta la primera evidencia del desarrollo de metástasis y/o de recidiva local o el último seguimiento de la paciente), libre de recidiva local (período desde la fecha de la cirugía hasta la primera evidencia de recidiva del tumor primario extirpado en el mismo sitio de la mama o el último seguimiento de la paciente), libre de recurrencia metastásica (período desde la fecha de la cirugía hasta la primera evidencia de la ocurrencia de metástasis o el último seguimiento de la paciente), libre de metástasis

ósea o **MTsO** (período desde la fecha de la cirugía hasta la primera evidencia de la ocurrencia de metástasis en hueso o el último seguimiento de la paciente) y el tiempo de supervivencia post-cirugía (período desde la fecha de la cirugía hasta la muerte de la paciente como consecuencia del CM o el último seguimiento de la paciente).

Por otro lado, utilizamos los datos obtenidos en un trabajo previo de nuestro laboratorio, en el cual se estudió la presencia de células estromales mesenquimales de morfología fusiforme y no asociadas a la vasculatura (MSC y/o TAF) [11]. En el mismo se evaluó la presencia de  $\alpha$ -SMA, FSP, CD105 y CD146. La lectura de las reacciones para  $\alpha$ -SMA, FSP, CD105 y CD146 se realizó según un score conformado por la suma del número de células fusiformes con FSP positivo y la intensidad de la expresión de FSP/célula, basado en el trabajo de Surowiak P y colaboradores [12]. De este trabajo realizado previamente utilizamos los score asignados a cada paciente para los distintos marcadores.

### **Análisis estadístico**

Para estudiar las diferencias entre las muestras de PCM y las muestras control respecto a los marcadores de células del sistema inmune, se utilizó el Test de Mann Whitney para muestras independientes no apareadas.

Para evaluar asociaciones entre la presencia de las células estromales fusiformes ( $\alpha$ -SMA/FSP/CD105/CD146 + y CD34-) y las células del sistema inmune, así como también las asociaciones entre las células del sistema inmune (en el tejido tumoral) con los datos de los parámetros de pronóstico clásicos del CM, utilizamos el Test de Mann Whitney.

Para evaluar asociaciones entre la presencia de células del sistema inmune y los datos clínicos patológicos que no son parámetros de pronóstico clásicos utilizamos las curvas de supervivencia Kaplan-Meier analizadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox). Para dicho análisis fue necesario dicotomizar las variables CD19, CD4, CD8, CD1a, CD83, CD14, CD64, CD200R y CD163 estableciendo un punto de corte o *cut-off*. Así, determinamos el *cut-off* óptimo de cada variable teniendo en cuenta tanto los valores de cuartil 1 (**Q1**), mediana (**M**) y cuartil 3 (**Q3**) como el análisis de la asociación de ambos grupos de pacientes originados por la respectiva clasificación binomial con el tiempo de supervivencia post-cirugía de dichas pacientes a través de la construcción de curvas de supervivencia Kaplan-Meier analizadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox) (11). Todo se realizó en consenso con la Especialista en Estadística, la Bioquímica María de Luján Calcagno, así como con los Médicos Patólogos Mamaros Dres. Hernán García Rivello y Kevin Mauro Davies. Así, el *cut-off* elegido fue el de mayor significancia estadística (menor *p-value*). Para cada caso, los valores de *cut-off* óptimos elegidos fueron= CD19 (M: 3,90); CD4 (Q3: 68); CD8 (Q3: 30); CD1a (Q1: 1,4); CD83 (Q1: 0); CD14 (M: 0,7); CD64 (Q1: 0); CD200R (Q3: 2,0) y CD163 (Q1: 3,8). De esta manera, el valor  $\leq 0 >$  del *cut-off* nos permitió la clasificación de las muestras tumorales en dos grupos: número negativo/bajo de células positivas y número alto de células positivas para el marcador, según corresponda.

Por último, se hizo uso del análisis multivariado [Cox Proportional Hazards Model, Backward Stepwise (Likelihood Ratio)] para evaluar si alguno de los marcadores estudiados en las PCM podrían ser factores predictivos independientes o no del tiempo libre de enfermedad, del tiempo libre de recidiva local, del tiempo libre de metástasis, del tiempo libre de MTsO y de la supervivencia a 10 años.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con los siguientes programas: SPSS software (versión 18,00, Chicago, Illinois) e InfoStat (versión 2012, InfoStat Group, Universidad de Córdoba). En todos los casos se consideró resultado significativo cuando  $p < 0,05$  (dos colas).

El análisis estadístico anteriormente detallado se llevó a cabo con el asesoramiento y colaboración de la Bioquímica María Luján Calcagno, especialista en Estadística para Ciencias de la Salud, Cátedra de Bioestadística, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

### **RESULTADOS PRELIMINARES**

Se halló que para cada marcador el porcentaje de pacientes que presentaron marca respecto del total fue el siguiente: CD19= 82,21% (32/38), CD4= 86,84% (33/38), CD8= 92,31% (36/39), CD1a= 94,74% (36/38), CD83= 56,41% (22/39), CD14= 63,16% (24/38), CD64= 72,22% (26/36), CD200R= 51,35% (19/37) y CD163= 94,74% (36/38) en el estroma del tejido mamario tumoral. Respecto al estroma del tejido mamario no-neoplásico los valores fueron: CD19= 90,00% (9/10), CD4= 70,00% (7/10), CD8=

70,00% (7/10), CD1a= 100,00% (10/10), CD83= 90,00% (9/10), CD14= 50,00% (5/10), CD64= 42,86% (3/7), CD200R= 90,00% (9/10) y CD163= 50,00% (5/10).

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de la tinción por IHQ de la presencia de estos marcadores analizada en las muestras de tejido mamario tumorales, no-neoplásicas y amígdala.

Al comparar la presencia de las distintas subpoblaciones del sistema inmune entre el tejido tumoral y no-neoplásico, encontramos que el valor de media para CD8, CD64, y CD163 en el tejido mamario tumoral fue significativamente mayor que en el tejido mamario no-neoplásico ( $p=0,001$ ,  $p=0,017$ , y  $p=0,002$ , respectivamente); mientras que el valor de media para CD200R en el tejido mamario tumoral fue significativamente menor que aquella encontrada en el tejido mamario no-neoplásico ( $p=0,013$ ).

#### ***El número de células CD19+ en el estroma tumoral mamario se asocia con parámetros de pronóstico clásicos y con la presencia de células estromales fusiformes FSP+/CD34-***

Encontramos que el número de células que expresan CD19/5 campos leídos con morfología de linfocito se asocia con el tamaño tumoral de las pacientes ( $p=0,046$ ). Así, las pacientes cuyo tamaño tumoral es mayor a 2 cm presentaron un valor mayor del número de células que expresan CD19 en el estroma tumoral que aquellas pacientes con un tamaño tumoral menor a 2 cm (Figura 2A). Además, se evidenció que el número de células que expresan de CD19 se asocia en forma inversa con la presencia de metástasis en nódulos linfáticos regionales de las pacientes ( $p=0,043$ ). Es decir, como se puede observar en la Figura 2B, aquellas pacientes que no presentaron metástasis en nódulos linfáticos regionales fueron aquellas que presentaron en el estroma tumoral un mayor número de células con expresión de CD19/5 campos leídos.

También, encontramos que las pacientes que tenían expresión alta de FSP se asociaban con aquellas que presentaban baja expresión de CD19 en el estroma mamario tumoral ( $p=0,014$ ).

Siguiendo con este análisis obtuvimos una correlación significativa entre las pacientes que presentaron un número elevado de células que expresan CD19 en el estroma del tejido mamario tumoral con un menor tiempo de supervivencia comparadas con las pacientes con negativo/bajo número de este tipo de células [datos expresados en meses como  $X \pm$  error estándar (ES), test Log-rank (Mantel-Cox)]:  $110,52 \pm 10,85$  y  $149,56 \pm 4,29$ ; respectivamente,  $p=0,031$  (Figura 3).

#### ***El número de células CD4+ en el estroma tumoral mamario se asocia con parámetros de pronóstico clásicos y con otros datos clínico-patológicos.***

En cuanto al número de células con morfología linfocítica que expresan CD4/5 campos leídos, se observó que la misma se asocia significativamente con el estado de expresión del HER2/neu ( $p=0,008$ ) y con la recidiva local ( $p=0,048$ ). Como puede observarse en la Figura 4A, las pacientes con HER2/neu positivo tienen un número mayor de células que expresan CD4. Del mismo modo puede observarse en la Figura 4B que las pacientes que presentaron recidiva local tienen un número mayor de células que expresan CD4.

También, se encontró una asociación significativa con las pacientes que presentaron un número elevado de células que expresan CD4 en el estroma del tejido mamario tumoral con un menor tiempo de enfermedad, con un menor tiempo libre de metástasis, con un menor tiempo libre de MTsO y menor supervivencia comparadas con las pacientes con un número bajo/negativo de células positivas para CD4 (Figura 5).

#### ***El número de células CD1a+ en el estroma tumoral mamario se asocia con parámetros de pronóstico clásicos y con otros datos clínico-patológicos.***

Se encontró que el número de células que expresan CD1a/5 campos leídos se asocia con el tamaño tumoral, con la metástasis, particularmente con la MTsO y con la muerte ( $p=0,005$ ,  $p=0,017$ ,  $p=0,027$  y  $p=0,013$ , respectivamente). Así, se observó que las pacientes que presentaron un tamaño tumoral mayor a 2 cm, desarrollo de metástasis, en especial MTsO y muerte, tenían un número bajo de células que expresan CD1a (Figura 6).

También se halló una asociación significativa con las pacientes que presentaron un número elevado de células que expresan CD1a en el estroma del tejido mamario tumoral con un mayor tiempo



libre de enfermedad, con un mayor tiempo libre de metástasis, con un mayor tiempo libre de MTsO y con un mayor tiempo de sobrevida comparadas con las pacientes con un número bajo/negativo de células que expresan CD1a (Figura 7).

***El número de células CD4+ y el número de células CD1a+ en el estroma tumoral mamario son factores predictivos independientes.***

Se realizó un análisis multivariado para determinar si alguno de los marcadores estudiados podrían ser factores predictivos independientes o no de los tiempos evaluados. De esta manera, las variables incluidas fueron las que resultaron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la prueba de log-rank. Los factores incluidos para cada modelo multivariado fueron: CD4 y CD1a para el tiempo libre de enfermedad y para el tiempo libre de metástasis; CD4, CD1a y tamaño tumoral para el tiempo libre de MTsO; y CD19, CD4, CD1a y tamaño tumoral para el tiempo de sobrevida. Encontramos que el número elevado de células positivas para CD4 en el estroma tumoral mamario es un factor predictivo independiente de un tiempo menor libre de enfermedad ( $p=0,048$ ), de un tiempo menor libre de metástasis ( $p=0,010$ ), en particular de un tiempo menor libre de MTsO ( $p=0,015$ ), y de un tiempo menor de sobrevida ( $p=0,008$ ). También encontramos que el número elevado de células positivas para CD1a en el estroma tumoral mamario es un factor predictivo independiente de un tiempo mayor libre de enfermedad ( $p=0,009$ ), de un tiempo mayor libre de metástasis ( $p=0,002$ ), particularmente de MTsO ( $p=0,013$ ) y de un tiempo mayor de sobrevida ( $p=0,007$ ).

## DISCUSIÓN

La progresión tumoral es un fenómeno de pasos múltiples en el cual existe una interacción activa y recíproca entre las células del MT y las células tumorales, suministrando señales adecuadas que pueden promover la agresividad del tumor [15].

En referencia al papel de las células del sistema inmune en la evolución del CM, las cuales también forman parte del MT, numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo* en animales, así como estudios por IHQ en muestras de pacientes con cáncer han proporcionado una gran cantidad de datos que confirman que las células del sistema inmune juegan un papel clave en la progresión del cáncer [16]. De esta manera, los datos obtenidos con tumores de PCM pueden ayudar a los médicos a establecer el grado y el tipo de respuesta inmune en curso en el tumor y, por tanto, ayudar en el diagnóstico y estrategia terapéutica de cada paciente.

En relación a las células del sistema inmune analizadas en este trabajo, los resultados muestran un número significativamente mayor de células con expresión para CD163 (M2), CD64 (M1) y CD8 (LT) en el estroma del tejido tumoral mamario en comparación a los valores estimados en las muestras del tejido mamario no-neoplásico, y la relación inversa para el caso de CD200R (M2). Por un lado, la presencia de LT estaría poniendo en evidencia la activación en primera instancia de una respuesta inmune contra el tumor. Por otro lado, se sabe que en los tumores existe una gran infiltración de leucocitos inflamatorios, siendo los macrófagos el componente mayoritario de dicho infiltrado tumoral [17]. Los macrófagos que infiltran el tumor o TAM orquestan y promueven el crecimiento del tumor, en particular en los estadios tempranos [5]. Cuando los macrófagos arriban al tumor, su activación depende del MT y a su vez en función del medio que lo rodea adquirirá funciones diferentes. Los macrófagos activados clásicamente, denominados M1, son los inducidos por exposición al IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , tienen una función pro-inflamatoria, anti-tumoral y activan la respuesta Th1 al liberar una alta concentración IL-12 y baja de IL-10. Estos macrófagos son CD64 y CD14 positivos. También están los macrófagos M2, activados alternativamente, por acción de IL-4, IL-13, IL-10, glucocorticoides y TGF- $\beta$ . Estos últimos tienen propiedades pro-tumorales que promueven la angiogénesis, el remodelado de la matriz y la supresión de la inmunidad adaptativa y activan la respuesta Th2. Dentro de este último grupo se pueden encontrar a los macrófagos M2b, los cuales expresan altos niveles de IL-10 y baja de IL-12, característicos de M2, aunque también pueden producir un perfil de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , entre otros) como los macrófagos M1; y a los macrófagos de tipo M2a y M2c, los cuales producen citoquinas anti-inflamatorias y se los puede reconocer por la expresión de CD200R y CD163, respectivamente [18]. También es importante considerar que estas células pueden cambiar de fenotipo, por ejemplo, la fagocitosis de células en apoptosis por macrófagos de tipo M1, los desactiva y puede transformarlos en macrófagos de tipo M2 [18-20]. En base a la teoría y a nuestros resultados, y

coincidiendo con Tang X y Medrek *et al.* [21, 22], podemos decir que el aumento de macrófagos principalmente de tipo M2 en el tejido tumoral en comparación con el tejido no-neoplásico estaría indicando un estroma anti-inflamatorio propicio para el desarrollo del tumor.

En relación con este tema y teniendo en cuenta la actividad inmunosupresora que ejercen las MSC (CD105+ y CD146+) y/o transformadas en TAF ( $\alpha$ -SMA+ y FSP+), es decir las células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura CD34-, que se estudiaron aquí, en el MT de las PCM en estadios clínico-patológicos tempranos se evaluó si existe asociación entre ellas y las células del sistema inmune. En este estudio se observa que las pacientes con un score elevado para FSP se asocian significativamente con un número menor de células positivas para CD19 (LB) en el MT.

En la actualidad no se han descrito estudios que asocien la presencia de LB y las células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura que expresan FSP dentro del MT de las PCM.

Existen varios trabajos que indican la presencia de células B supresoras y LB reguladoras (**Bregs**) de las respuestas inmunes protectoras contra enfermedades autoinmunes (23). Y más aún, se ha demostrado que un subgrupo de células B, denominadas células Breg tumorales (**TBregs**), tiene un rol importante en la metástasis pulmonar del cáncer de mama mediante la conversión de los LT CD4+ a LTreg Foxp3+, acción mediada por el TGF- $\beta$  [23].

Por otro lado, resultados previos de este laboratorio mostraron que las PCM en estadio clínico I y II que presentan un score elevado de FSP en las células fusiformes, no asociadas a la vasculatura, tuvieron un tiempo libre de MTsO así como un tiempo de sobrevida significativamente mayor. También este parámetro se asoció con un tiempo mayor libre de recurrencia metastásica. Así, este resultado conjuntamente con los datos de la existencia de Bregs y lo encontrado en nuestro trabajo, que las pacientes con alta expresión de FSP se asocian significativamente con las pacientes que tiene un número menor de células CD19+, estarían indicando que la presencia de LB podría estar influenciando el desarrollo del tumor. Interesantemente, al estudiar si existen asociaciones entre las células del sistema inmune evaluadas y los parámetros de pronóstico clásicos, se ha hallado que las pacientes con tumores mayores a 2 cm tenían un número mayor de células CD19+. Más aún, se halló una correlación significativa entre las pacientes con un número mayor de células CD19+ en el estroma del tejido mamario tumoral con un menor tiempo de sobrevida, indicando que a mayor desarrollo tumoral mayor presencia de LB y peor expectativa de vida. Sin embargo, se ha hallado que las pacientes con nódulos linfáticos positivos al momento de la cirugía se asociaron con un número menor de células CD19+. Aún no está totalmente definido el papel de los LB en la evolución del cáncer de mama, ni tampoco se sabe si existen diferentes poblaciones de LB que puedan ejercer funciones diferentes. Por lo tanto, la profundización del estudio de estas células en el estroma del MT y la caracterización de su fenotipo funcional podría arrojar nuevos elementos que ayuden a entender un poco más el papel del sistema inmune en la evolución tumoral.

En este estudio y siendo que la población principal de linfocitos en el MT corresponde a LT CD4+, se halló que las pacientes con HER2/neu positivo y recidiva local se asociaron con un número mayor de células positivas para LT CD4+ en el estroma tumoral. En concordancia con estos resultados, algunos autores encontraron que la presencia de LT CD4+ se asocia con la metástasis en los ganglios linfáticos axilares, sugiriendo un papel importante de estas células en la propagación de la neoplasia a los ganglios linfáticos en pacientes con CM temprano [24]. Interesantemente, un estudio demostró una correlación entre la presencia de LT CD4+ Th2 y células T reguladoras (LTreg) CD25+ con las pacientes que expresan Her2/neu. Es bien sabido que, entre los diversos tipos de tumores de mama las que expresan Her2/neu en la superficie tienen peor pronóstico clínico [25]. El aumento en el porcentaje de LT CD4+ Th2 junto con el aumento de LTreg, así como una disminución en la población de células T citotóxicas pueden explicar el fenotipo más agresivo y de mal pronóstico observado en pacientes Her2/neu+ [25-27].

Siguiendo con el estudio del CD4+, los resultados revelaron que las pacientes que presentan un número mayor de células positivas para CD4 en el estroma del tejido mamario tumoral se asociaron significativamente con un tiempo menor libre de enfermedad, con un tiempo menor libre de metástasis y con un tiempo menor libre de MTsO, así como con un tiempo menor de sobrevida de estas pacientes. Interesantemente, el análisis multivariado de los datos arrojó que el número mayor de células positivas para CD4 en el estroma del tejido mamario tumoral es un factor predictivo independiente de estos tiempos. Estos resultados sugieren que un aumento en el número de células CD4+ en el estroma tumoral de las pacientes analizadas podría utilizarse como un marcador de mal pronóstico para el CM.

Nosotros intentamos caracterizar dentro de los LT CD<sub>4</sub><sup>+</sup> encontrados en nuestras pacientes qué tipo de LTCD<sub>4</sub><sup>+</sup> eran. Específicamente y con el objetivo de determinar si eran LT reguladores, llevamos a cabo una triple marcación con CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>25</sub><sup>+</sup>/Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>. Luego de varios intentos no pudimos obtener ningún resultado contundente sobre la presencia de células marcadas conjuntamente con CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>25</sub><sup>+</sup>/Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>. Cabe mencionar, que los LT reguladores (**LTreg**) en cáncer están involucrados en el escape del tumor al sistema inmune del hospedador [28, 29]. Sin embargo, aún no está claro el papel de estas células en la progresión tumoral, sobre todo porque su frecuencia en los tejidos o en la sangre de las pacientes no siempre se correlaciona con la evolución [30]. Por ejemplo, en pacientes con cáncer de ovario un incremento de LTreg se asocia a mal pronóstico [31], mientras que en pacientes con cáncer de colon, un incremento en LTreg es predictivo de buen pronóstico y sobrevida [32]. Interesantemente, un estudio en carcinoma de células renales determinó que un subgrupo de LT CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>-</sup> y no los CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> evaluadas en el estroma tumoral se asocian con las características patológicas de mal pronóstico y menor sobrevida en estas pacientes [33]. También es importante mencionar, que en el microambiente tumoral se encontraron células con capacidad homeostática y moduladora como son las células T inmunoregulatorias CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup> (también llamadas LTreg, Th<sub>3</sub> o TR1) [34]. Estas discrepancias entre estos hallazgos sugieren que hay LTreg en los tejidos tumorales con funciones diferentes y estas funciones *in situ* pueden estar bajo el control de una red de regulación compleja y orquestada por factores que permanecen en gran medida sin identificar. Los datos más recientes sugieren que las funciones de LTreg y su polarización a una condición de "bueno" o "malo" están reguladas por el medio ambiente por un sistema bien afinado entre las interacciones moleculares y las charlas (*crossstalk*) celulares [34].

Por último, y no por eso menos importante, encontramos que las pacientes con un número mayor de células que expresan CD<sub>1a</sub> se asociaron con los tumores menores a 2cm, con la ausencia de metástasis, particularmente con la MTsO y mayor sobrevida. Interesantemente, Park MH *et al.* al analizar la asociación entre las células tumorales que expresan la quimoquina ligando 1 con motivo C-X<sub>3</sub>-C (**CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub>**) con el número de células que expresan CD<sub>1a</sub> (entre otros marcadores) en el estroma tumoral, encontraron que el incremento de células CD<sub>1a</sub> en el MT está asociada con las pacientes que expresan mayores niveles de CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> en las células tumorales (35). Y además, demostraron que las pacientes con niveles altos de expresión de CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> en las células tumorales están asociadas con un tiempo mayor libre de enfermedad y sobrevida. Este trabajo sugiere que la expresión de CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> por las células tumorales parece mejorar el reclutamiento de células dendríticas CD<sub>1a</sub> y otras células como lo son los LT CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, células *natural killer* CD<sub>57</sub><sup>+</sup>, provocando con ello un mejor pronóstico en el cáncer de mama.

Más aún, y de acuerdo a lo observado por Park MH *et al.*, se halló una asociación significativa entre las pacientes que presentan un número mayor de células positivas para CD<sub>1a</sub> en el estroma del tejido mamario tumoral con un tiempo mayor libre de enfermedad, con un tiempo mayor libre de metástasis, con un tiempo mayor libre de MTsO y con un tiempo mayor de sobrevida. Por último, se halló que el número elevado de células positivas para CD<sub>1a</sub> en el estroma tumoral mamario es un factor predictivo independiente de un tiempo mayor libre de enfermedad, de un tiempo mayor libre de metástasis, particularmente de MTsO y de un tiempo mayor de sobrevida. Estos resultados sugieren que una mayor infiltración de células dendríticas CD<sub>1a</sub><sup>+</sup> en el estroma tumoral de las pacientes analizadas podría utilizarse como un marcador de buen pronóstico para el CM.

De esta manera, podemos concluir que la evaluación de estos parámetros podrían ser incorporados en los informes histopatológicos de rutina ya que son herramientas altamente accesibles, sencillas y no invasivas. Además, la incorporación de esta evaluación podría ser útil para la selección adecuada del tratamiento para cada paciente y podría permitir el desarrollo de terapias adyuvantes no tradicionales. Con este trabajo se pudo encontrar algunos resultados interesantes que podrían considerarse como la base de futuros estudios en esta área. Al ser el CM una enfermedad heterogénea y difícilmente prevenible, el lograr adelantarnos a la ocurrencia de la lesión metastásica en sitios distantes nos permitiría concretar una gran ilusión para las pacientes que padecen esta patología.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 2008;26(17):2813-2820.
- 2) Patel SA, Heinrich AC, Reddy BY, Srinivas B, Heidarani N, Rameshwar P. Breast cancer biology: the multifaceted roles of mesenchymal stem cells. *J Oncol* 2008;2008: 425895.
- 3) Dirección de Estadísticas e Información en Salud de la Nación. Estadísticas vitales: Publicación 2013. Argentina; Ministerio de Salud.
- 4) Moharita AL, Taborga M, Corcoran KE, Bryan M, Patel PS, Rameshwar P. SDF-1 $\alpha$  regulation in breast cancer cells contacting bone marrow stroma is critical for normal hematopoiesis. *Blood J* 2006;108:3245-3252.
- 5) Lorusso G, Rügge C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol.* 2008;130:1091-1103.
- 6) Yang X, Hou J, Han Z, Wang Y, Hao C, Wei L, et al. One cell, multiple roles: contribution of mesenchymal stem cells to tumor development in tumor microenvironment. *Cell Biosci* 2013;3:5.
- 7) Garamszegi N, Garamszegi SP, Shehadeh LA, Scully SP. Extracellular matrix-induced gene expression in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009;7:319-329.
- 8) El-Haibi CP, Karnoub AE. Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15:399-409.
- 9) Rhodes LV, Muir SE, Elliott S, Guillot LM, Antoon JW, Penforis P, et al. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121:293-300.
- 10) Albin A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2007;7:139-147.
- 11) Martinez LM, Labovsky V, Calcagno ML, Davies KM, Garcia Ravello H, Bianchi MS, et al. CD105 expression on CD34-negative spindle-shaped stromal cells of primary tumor is an unfavorable prognostic marker in early breast cancer patients. *Plos One* 2015;10(3):e0121421.
- 12) Surowiak P, Murawa D, Materna V, Maciejczyk A, Pudelko M, Ciesla S, et al. Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. *Anticancer Res* 2007;27:2917-2924.
- 13) Wernicke M, Roitman P, Manfre D, Stern R. Breast cancer and the stromal factor. The "prometastatic healing process" hypothesis. *Medicina.* 2011; 71(1):15-21.
- 14) Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957;11:359-377.
- 15) Barcellos-de-Souza P, Gori V, Bambi F, Chiarugi P. Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players, *Biochim Biophys Acta* 2013, 1836(2):321-335.
- 16) Whiteside TL. Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis? *Front Oncol* 2013;3:107.
- 17) Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol* 2007;178:7405-7411.
- 18) Duque Correa MA, Rojas López M. Grupo Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología* 2007 Abr-Jun;26(2):73-86.
- 19) Obeid E, Nanda R, Fu YX, Olopade OI. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *Int J Oncol* 2013;43:5-12.
- 20) de la Cruz-Merino L, Barco-Sánchez A, Henao Carrasco F, Nogales Fernández E, Vallejo Benítez A, Brugal Molina J, et al. New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:785317.
- 21) Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Letters* 2013;332:3-10.
- 22) Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* 2012;23:306.
- 23) Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4<sup>+</sup> T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res* 2011;71:3505-3515.
- 24) Macchetti AH, Marana HR, Silva JS, de Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Bighetti S. Tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics* 2006;61:203-208.
- 25) Faghih Z, Erfani N, Haghshenas MR, Safaei A, Talei AR, Ghaderi A. Immune profiles of CD4<sup>+</sup> lymphocyte subsets in breast cancer tumor draining lymph nodes. *Immunol Lett* 2014;158:57-65.
- 26) Decker T, Fischer G, Bücke W, Bücke P, Stotz F, Grüneberger A, et al. Increased number of regulatory T cells (T-regs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:1945-1950.

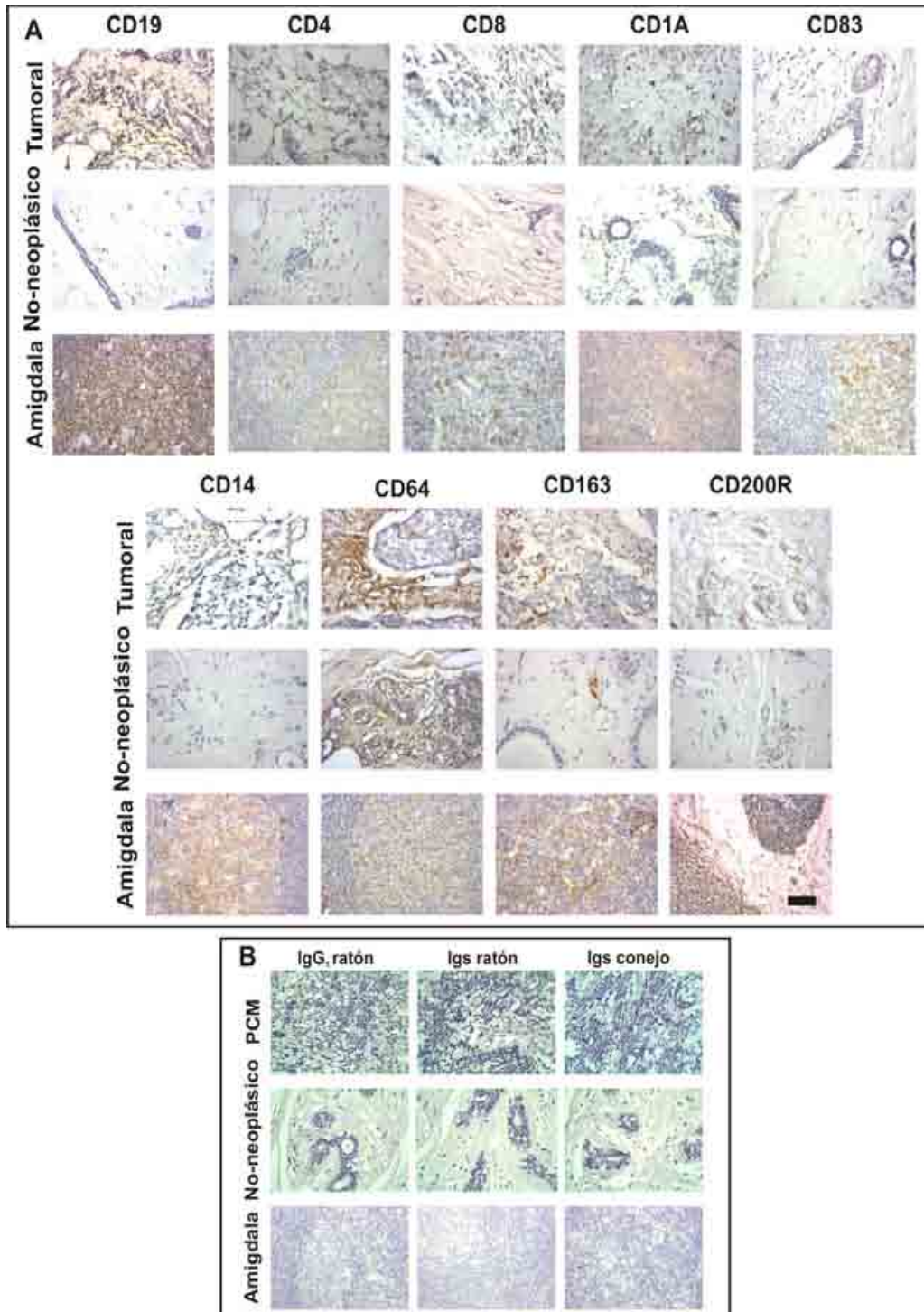
- 27) Droeser R, Zlobec I, Kilic E, Güth U, Heberer M, Spagnoli G, et al. Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers. BMC Cancer 2012;12:134.
- 28) Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. Adv Cancer Res 2010;107:57-117.
- 29-) Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. Int J Cancer 2010;127:759-767.
- 30) deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. Clin Cancer Res 2012;18:3022-3029.
- 31) Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med 2004;10:942-949.
- 32) Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. J Clin Oncol 2009;27:186-192.
- 33) Siddiqui SA, Frigola X, Bonne-Annee S, Mercader M, Kuntz SM, Krambeck AE, et al. Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2007;13:2075-2081.
- 34) Whiteside TL. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? Cancer Immunol Immunother 2014;63:67-72.
- 35) Park MH, Lee JS, Yoon JH. High expression of CX3CL1 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating CD8+ T cells, natural killer cells, and dendritic cells in breast carcinoma. J Surg Oncol 2012;106:386-392.

## ANEXO

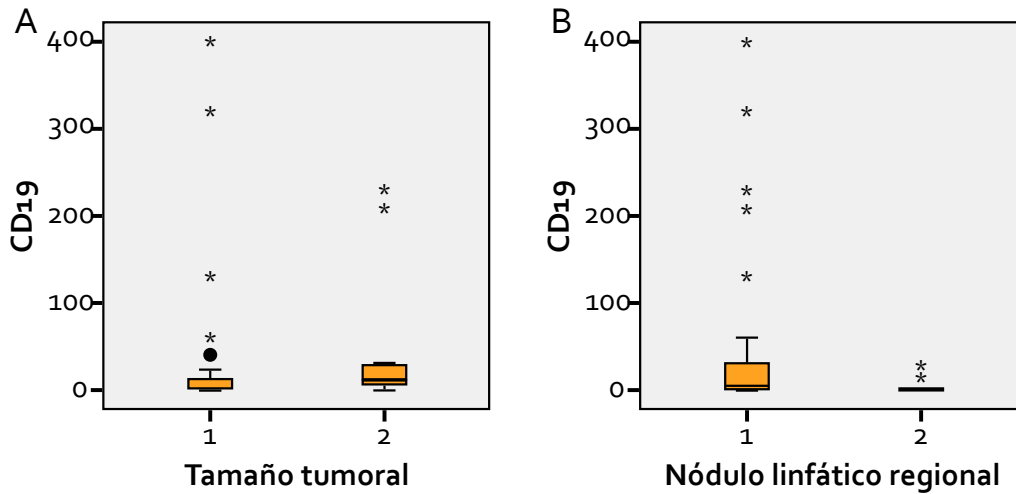
**Tabla 1.** Detalle de los anticuerpos y controles usados para la evaluación de la presencia de células del sistema inmune en pacientes con cáncer de mama. Se indican las características, concentraciones y/o diluciones usadas según el protocolo, y los números de catálogo y fabricante de cada uno de los anticuerpos (Ac) y controles usados. Ig = inmunoglobulina/s.

Anticuerpo	Catálogo	Especie	Concentración	Dilución	Isotipo	Marca
CD1 $\alpha$	CellMarque (EP3622)	Conejo. Monoclonal	No específica	1/50	IgG1	Células dendríticas
CD83	Abcam (ab49324)	Ratón. Monoclonal	No específica	1/40	IgG1	Células dendríticas
CD4	Abcam (ab133616)	Conejo. Monoclonal	0.054 mg/ml	1/100	IgG	Linfocitos T
CD8	CellMarque (SP16)	Conejo. Monoclonal	No específica	1/30	IgG1	Linfocitos T
CD19	Abcam (ab134114)	Conejo. Monoclonal	No específica	1/500	IgG	Linfocitos B
CD64	Abcam (ab140779)	Ratón. Monoclonal	No específica	1/600	IgG1	Macrófagos M1
CD14	Abcam (ab49755)	Ratón. Monoclonal	No específica	1/50	IgG2a	Macrófagos M1
CD200R	Bioss (bs-1095R)	Conejo. Policlonal	1.000 mg/ml	1/500	IgG	Macrófagos M2a
CD163	CellMarque (MRQ-26)	Ratón. Monoclonal	No específica	1/100	IgG1	Macrófagos M2c
Controles	Catálogo	Especie	Concentración	Dilución	Isotipo	Isotipo
IgG1 de ratón	R&D System (MAB002)	Ratón	Equivalente al Ac primario		IgG1	
Ig de conejo	Dako (X0936)	Conejo	Equivalente al Ac primario		Ig	
IgG2a de ratón	Dako (X0943)	Ratón	Equivalente al Ac primario		IgG2a	

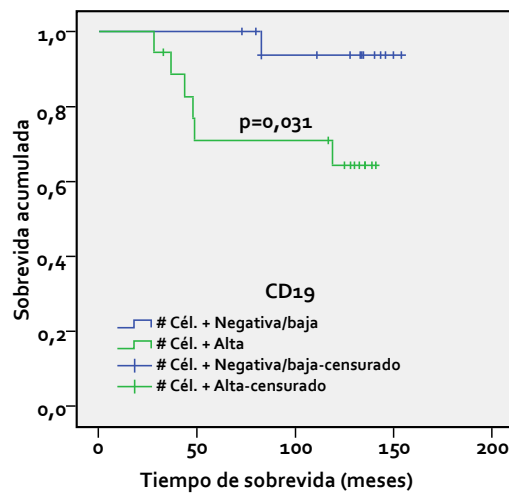
**Figura 1:** Ejemplificación representativa de la expresión de las distintas subpoblaciones del sistema inmune en cortes del estroma del tejido mamario tumoral de pacientes con cáncer de mama y no-neoplásico. **A)** Tinción inmunohistoquímica de CD19, CD4, CD8, CD1a, CD83, CD14, CD64, CD200R y CD163 en el estroma mamario tumoral, no-neoplásico y amígdala (control positivo). **B)** Controles de isotipo realizados sobre los cortes de tejido mamario tumoral, no-neoplásico y amígdala. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina (púrpura). Visualización en microscopio óptico (400X). Las barras de escala representan 50  $\mu$ m. Tinción: Peroxidasa-DAB/Hematoxilina.



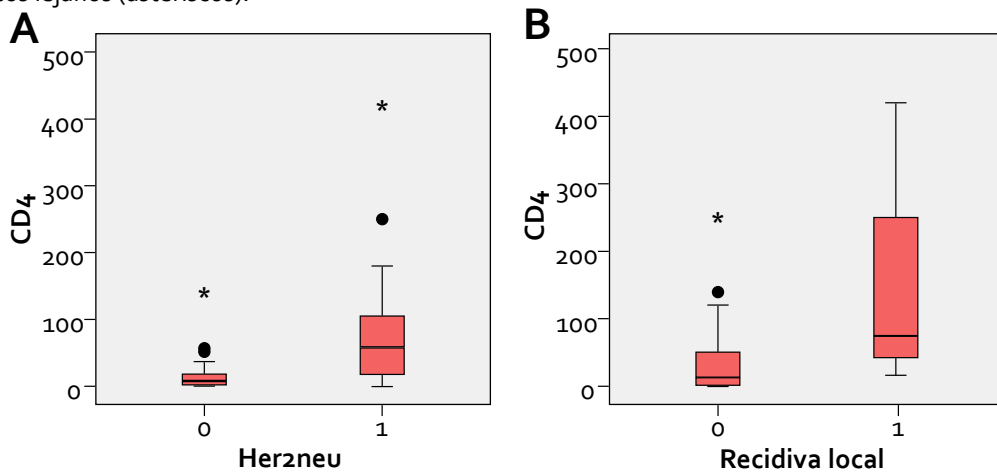
**Figura 2:** Asociación entre el número de células que expresan CD19/5 campos leídos con el tamaño tumoral y con nódulo linfático regional. Diagrama de cajas donde se muestra la distribución del número de células con expresión de CD19/5 campos leídos respecto de **A.** tamaño tumoral (**1** < 2cm, **2** > 2cm) y **B.** la ausencia (**o**) o presencia (**1**) de nódulos linfáticos regionales. Se grafica la mediana (línea negra), el rango intercuartilo (caja), los datos atípicos próximos (círculos negros) y los datos atípicos lejanos (asteriscos).



**Figura 3:** Estudio de la asociación del número de células que expresan CD19/5 campos leídos en el estroma del tejido tumoral mamario con el tiempo de supervivencia de las pacientes con cáncer de mama. Análisis estadístico de Kaplan Meier, analizado con el test estadístico de log-rank.

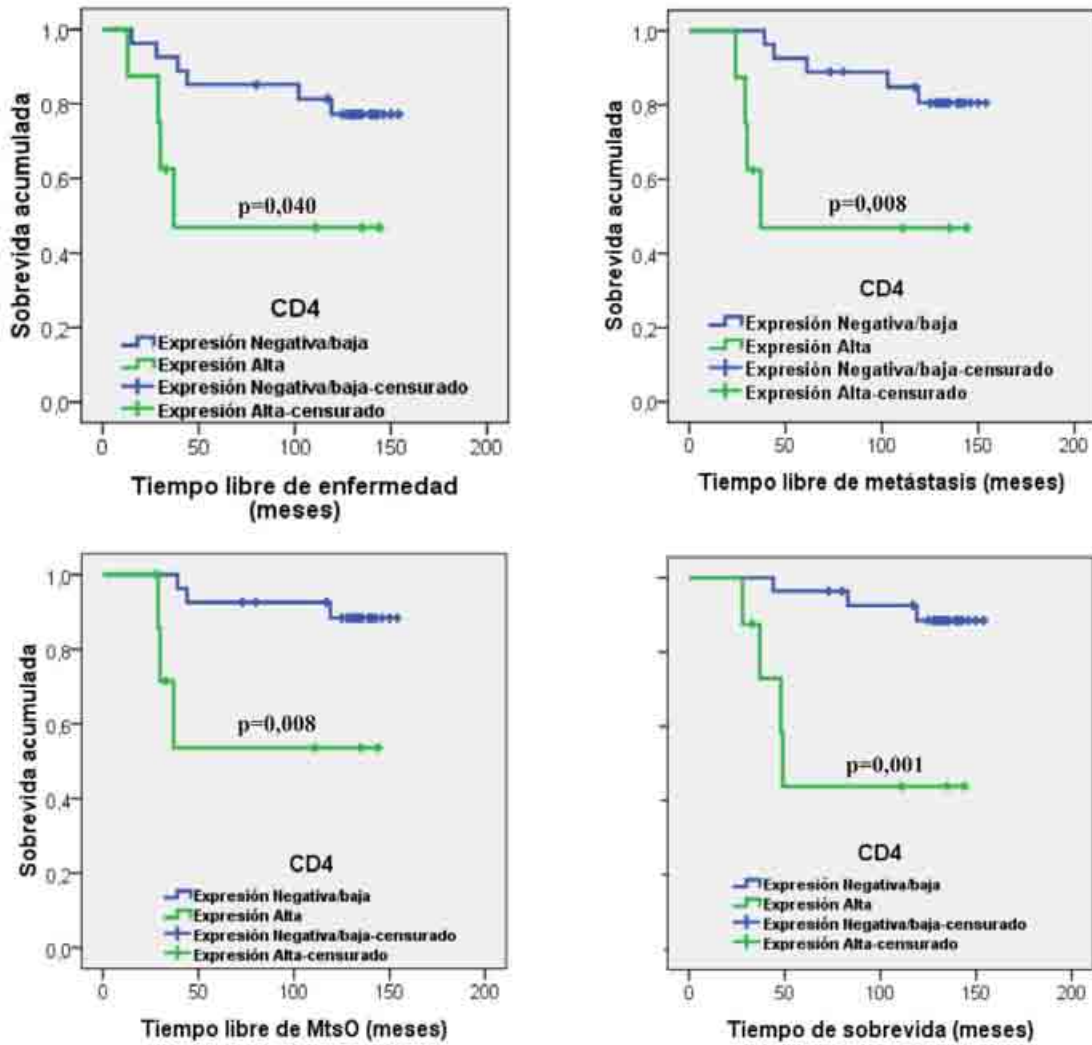


**Figura 4:** Asociación entre el número de células con morfología de linfocito que expresan CD4/5 campos leídos y la expresión de HER2/neu y con la recidiva local. Diagrama de cajas donde se muestra la distribución del número de células con expresión de CD4/5 campos leídos respecto de **A.** HER2/neu (0: negativo, 1: positivo) y **B.** la ocurrencia de recidiva local (0: negativo, 1: positivo). Se grafica la mediana (línea negra), el rango intercuartil (caja), los datos atípicos próximos (círculos negros) y los datos atípicos lejanos (asteriscos).

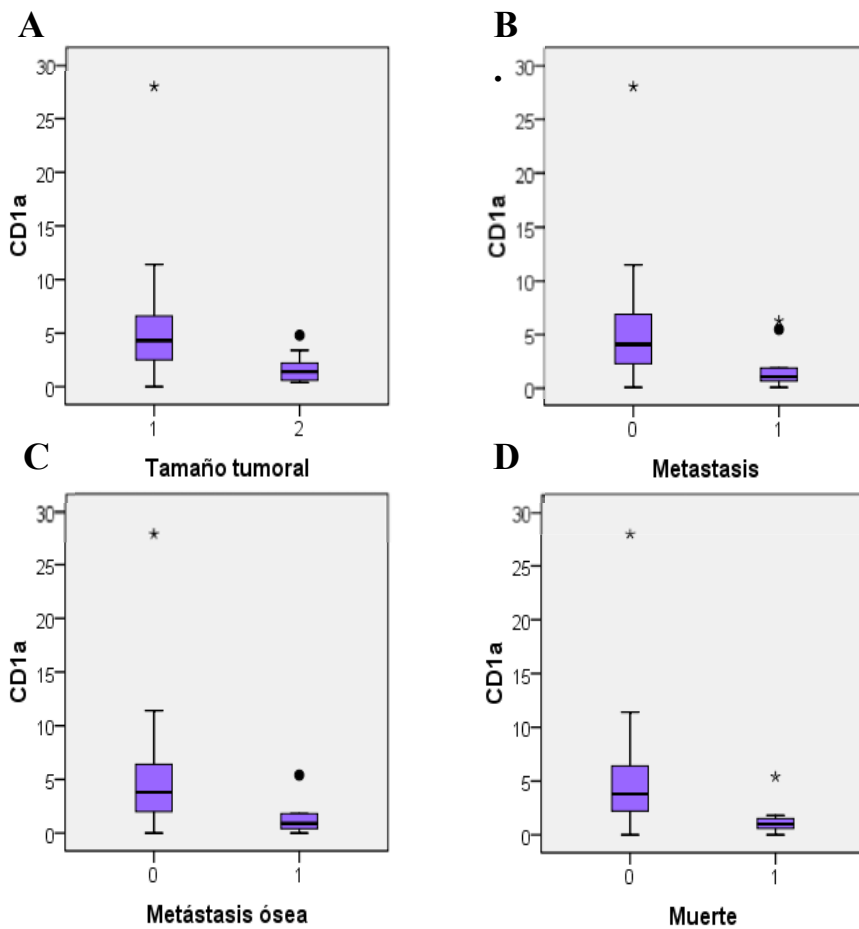




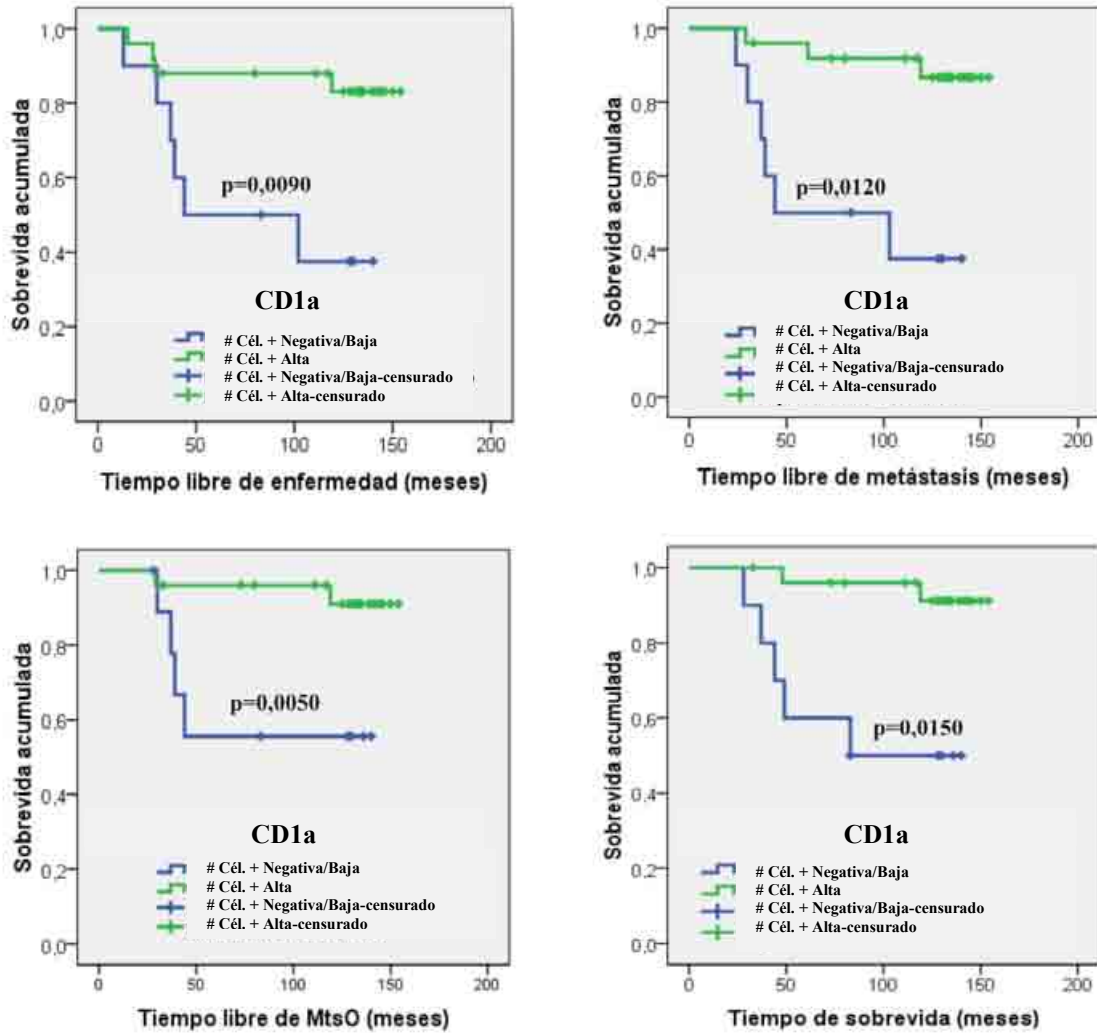
**Figura 5:** Estudio de la asociación del número de células que expresan CD4/5 campos leídos en el estroma del tejido tumoral mamario con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad, de metástasis, de MTsO y sobrevida de las pacientes con cáncer de mama. Análisis estadístico de Kaplan Meier, analizado con el test estadístico de log-rank.



**Figura 6:** Asociación entre el número de células que expresan CD1a/5 campos leídos con el tamaño tumoral, metástasis, metástasis ósea y muerte. Diagrama de cajas donde se muestra la distribución del número de células con expresión de CD1a/5 campos leídos respecto de **A.** tamaño tumoral (**1** < 2cm, **2** > 2cm); **B.** la ocurrencia de metástasis (**0**: negativo, **1**: positivo); **C.** la ocurrencia de metástasis ósea (**0**: negativo, **1**: positivo); y **D.** la ocurrencia de muerte (**0**: negativo, **1**: positivo). Se grafica la mediana (línea negra), el rango intercuartil (caja), los datos atípicos próximos (círculos negros) y los datos atípicos lejanos (asteriscos).



**Figura 7:** Estudio de la asociación del número de células que expresan CD1a/5 campos leídos en el estroma del tejido tumoral mamario con el tiempo transcurrido post-cirugía libre de enfermedad, de metástasis, de MTsO y sobrevida de las pacientes con cáncer de mama. Análisis estadístico de Kaplan Meier, analizado con el test estadístico de log-.rank.



## EFFECTOS DE NUTRIENTES LIPOSOLUBLES SOBRE CÉLULAS CANCEROSAS DE MAMA HUMANAS

Florencia Natalí Moreno Pascal

Instituto de Biología Celular. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Directora: Patricia Liliana Quiroga

### RESUMEN

Estudios epidemiológicos y experimentales indican que el ácido retinoico solo por un lado y ácidos grasos polinsaturados (PUFA) por el otro ejercen un rol modulador de algunas propiedades neoplásicas. El objetivo del trabajo fue evaluar la sinergia sobre algunos parámetros tumorales utilizando un inhibidor específico del PPAR $\gamma$  (GW9662) ligandos naturales de los ácidos grasos. Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de mama humana en cultivo (MCF-7 y T47-D) agregamos ácido retinoico (AR=ATRA) sólo o combinado con ácidos grasos:  $\omega$ 6 (AA:20:4, ácido araquidónico) y  $\omega$ 3 (EPA 20:5, ácido eicosapentaenoico) con un inhibidor específico de los PPAR $\gamma$ . Las células fueron tratadas durante 24-48 horas en las condiciones anteriormente mencionadas, se evaluaron: proliferación (resazurina), incorporación de lípidos (cromatografía de gas), grado de peroxidación lipídica y de estrés celular (GTTP). El perfil de ácidos grasos mostró una relación positiva entre el aporte exógeno y la incorporación de ácidos grasos. El ácido retinoico presentó actividad antitumoral propia, mientras que los PUFAs utilizados necesitan de AR para ser activos. La presencia de inhibidor específico produjo un incremento citotóxico en todos los tratamientos sin tener una actividad por sí mismo. Conclusión: Este estudio muestra que el ácido retinoico y ciertos ácidos grasos junto con GW 9662 responden independientemente en los diferentes tratamientos no mostrando efecto sinérgico.

### ABSTRACT

Epidemiological and experimental studies indicate that retinoic acid alone on one side and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on the other exert a modulatory role of some neoplastic properties. The aim of the study was to evaluate the combined action (synergy) of some tumor parameters using a specific inhibitor of PPAR $\gamma$  (GW9662) ligands natural fatty acids. Cancer cell line cultured human breast (MCF-7 and T47-D) was used, we added retinoic acid (RA = ATRA) alone or in combination with fatty acid:  $\omega$ 6 (AA: 20: 4 arachidonic acid) and  $\omega$ 3 (EPA 20: 5, eicosapentaenoic acid) with a specific inhibitor of the PPAR $\gamma$ . Cells were treated for 24-48 hours in the above conditions; it was evaluated: proliferation (resazurin), incorporation of lipids (gas chromatography), degree of lipid peroxidation and cellular stress (GTTP). The fatty acid profile showed a positive relationship between exogenous and the incorporation of fatty acids. Retinoic acid itself showed antitumor activity, whereas PUFAs used needed AR to be active. The presence of a specific inhibitor caused a cytotoxic increase in all treatments without having an activity itself. Conclusion: This study shows that retinoic acid and certain fatty acids with GW 9660 responds independently in the different treatments showing no synergistic effect.

### INTRODUCCIÓN

La salud es producto de complejas interacciones y está determinada por múltiples factores [14]. El cáncer, es la segunda causa de muerte en todo el mundo después de las enfermedades cardiovasculares y podría llegar a incrementarse en 15 millones de nuevos casos en 2020 de acuerdo al World Cancer Report [26]. Nuevas líneas de investigación han surgido en las últimas décadas con el fin de lograr tratamientos más adecuados y métodos de prevención cada vez más eficaces. Entre ellas, las que abarcan estudios orientados hacia el efecto de la dieta y del estrés oxidativo en oncología [1].

Dentro de los factores dietarios, la grasa juega un rol preponderante en el riesgo de padecer dicha enfermedad [11]. En este sentido, los ácidos grasos polinsaturados (PUFA) constituyen

componentes indispensables de la alimentación, ya sea por formar parte de fosfolípidos de membrana celulares o por algunas biomoléculas importantes que de ellos derivan [3]. Se conoce que los ácidos grasos esenciales de las familias  $\omega_3$  y  $\omega_6$  ejercerían un papel protector y antitumoral en algunos tipos de cáncer [2]. A su vez, el estrés oxidativo celular también tiene un rol en el proceso de carcinogénesis. El uso conjunto de compuestos con potencialidad diferenciadora y antiproliferativo como derivados de la vitamina A (ácido retinoico) y ciertos ácidos grasos insaturados de las familias  $\omega_3$ ,  $\omega_6$  se presentan como potenciales nutrientes quimiopreventivos y antitumorales [21;19]. Los mismos podrían modular el desarrollo tumoral y/o la respuesta orgánica asociada. Es conocido que los ácidos grasos son ligandos naturales de los PPAR disparando la regulación de importantes funciones celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación, apoptosis así como también respuesta al estrés [8,18].

Es por esto que teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto nos planteamos si compuestos bioactivos presentes en la dieta como la vitamina A y ciertos ácidos grasos insaturados de las familias  $\omega_3$  y  $\omega_6$ , tendrían una actividad moduladora favorable sobre el desarrollo tumoral que podría ser modificado por inhibidores de receptores nucleares (PPAR).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **a. Cultivo celular:**

Se dispusieron de las líneas celulares cancerosas humanas de mama, MCF-7 y T47-D American Type Culture Collection, EE.UU). Dichas líneas se mantuvieron bajo condiciones estándar de cultivo celular en medio RPMI (Sigma-Aldrich) completo con suero fetal bovino al 10% (SFB), penicilina (15 UI/mL) y estreptomycin (100 ug/mL).

### **b. Condiciones experimentales:**

Actividad in vitro: Las líneas celulares se trataron de 0-72 h con ácidos grasos insaturados de las familias  $\omega_3$  (20:5, ácido eicosapentaenoico) u  $\omega_6$  (20:4, ácido araquidónico) (50 uM), con adición de ácido retinoico (ATRA, 0-10 uM). Previo a los tratamientos mencionados las células se incubaron durante 4 h con un inhibidor farmacológico específico de PPAR $\gamma$  (GW 9662, 50 uM Sigma Inc.), a fin de establecer la importancia en el efecto sinérgico de estos ligandos naturales de ácidos grasos.

### **c. Determinaciones:**

**Perfil de ácidos grasos:** Para evaluar el impacto de los diferentes tratamientos sobre la incorporación de los ácidos grasos a las membranas celulares y dada la importancia que presentan sus biomoléculas derivadas, se utilizó GLC (cromatografía gaseosa) a partir de muestras celulares. Estas muestras se procesaron con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) para la extracción de lípidos totales de acuerdo a la técnica de Fölch [7]. La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se llevó a cabo en un equipo CLAUROS 500 (Perkin Elmer, Alemania) con detector de ionización de llama (detector FID), frente a testigos comerciales (NU-Chek-PREP Inc., EE.UU.), como es rutina en este laboratorio [10].

**Viabilidad Celular:** Dado que la principal característica de las células tumorales es un marcado desequilibrio entre muerte y proliferación celular, es importante evaluar la inhibición de la proliferación. Para ello se utilizó el ensayo de resazurina. La cantidad de células vivas en cultivo se determinó en virtud de la capacidad de éstas de reducir la resazurina colorante no fluorescente al colorante resazurina fuertemente fluorescente [13].

Se estimó el porcentaje de células viables en función del control por espectrofotometría a 540 nm.

**Actividad de gama-glutamiltanspeptidasa (GGTP):** Esta enzima de membrana es un buen marcador de estrés oxidativo ya que indica la capacidad de respuesta antioxidante de la célula dado que participa en la recuperación del glutatión intracelular, péptido clave en la resistencia celular al daño oxidativo. Por esto, GGTP se determinó usando 0,1 M glicil-glicina y 5 mM L-gama-glutamiltanspeptidasa como sustratos contenidos en el kit comercial de Wiener (Argentina). El producto p-nitroanilina se midió a

410 nm en condiciones de velocidad inicial, expresando su actividad específica en mIU/mg de proteínas [17].

***Nivel de hidroperóxidos:*** El estado oxidativo celular que afecta la proliferación (clave para el desarrollo tumoral) se valoró mediante la cuantificación de especies reactivas del oxígeno (ROS). El procedimiento que está basado en la capacidad de los hidroperóxidos (HP) de oxidar  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  en condiciones de pH bajo, formando luego un aducto coloreado a 560 nm con naranja de xilenol, se llevó a cabo sobre células tumorales en placas de 96 pozos (40000 células/pozo), después de descartar el medio de cultivo y lisarlas. Se estudiaron las fracciones de hidroperóxidos acuosas (HPA) y lipídicas (HPL) en cantidades micromolares [22].

***Apoptosis:*** Así como la proliferación celular es importante en el proceso carcinogénico la apoptosis es la contracara dentro del balance proliferación y muerte celular. Para visualizar la misma se utilizó la técnica de Hoescht.

#### ***d. Análisis estadístico:***

Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de por lo menos tres experimentos separados realizados por triplicado. Para su análisis, el efecto de los diferentes tratamientos se compararon por modelos de ANOVA seguidos por la prueba de Fisher, para un nivel de  $p < 0,05$  [9].

#### **RESULTADOS:**

##### ***Perfil de Ácidos Grasos de células tumorales MCF-7 y T47-D:***

Se determinó el perfil lipídico de las células tumorales a fin de confirmar la incorporación de cada uno de los ácidos grasos utilizados en cultivo. Se encontró una correlación razonable entre los ácidos grasos de membrana y el aporte exógeno de éstos (Tabla 1 y 2).

##### ***Viabilidad (%) de células tumorales MCF-7 por ensayo de resazurina.***

**Figura 1:** (Absorbancia por  $10^4$  a 540 nm  $\pm$  error estándar) el ácido retinoico presenta actividad antitumoral propia, mientras que los PUFA utilizados ya sea  $\omega_3$  u  $\omega_6$  necesitan de RA para ser activos.

##### ***Viabilidad (%) de células tumorales MCF-7 por ensayo de resazurina en ausencia o presencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662).*** (Absorbancia de $10^4$ CN/ a 540 nm $\pm$ error estándar).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre los tratamientos cuando se agregó el GW9662 con respecto a los respectivos C (Figura 2).

##### ***Viabilidad (%) de células tumorales T-47 D por ensayo de resazurina*** (Absorbancia de $10^4$ CN/ a 540 nm $\pm$ error estándar y Fluorescencia):

El Ácido Retinoico presenta actividad antitumoral propia.

##### ***Viabilidad (%) de células tumorales T-47 D por ensayo de resazurina en ausencia o presencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662).*** (Fluorescencia)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre los tratamientos cuando se agregó el GW9662 junto a Ácido Retinoico solo, Ácido Retinoico + EPA y Ácido Retinoico + Acido Araquidónico con respecto a los controles (Figura 3).

##### ***Formación de lipoperóxidos (%) en células tumorales MCF-7 en ausencia o presencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662).***

La determinación del daño oxidativo de los lípidos es de relevancia en la carcinogénesis, ya que compromete la integridad estructural de las membranas y por lo tanto su viabilidad. En nuestro estudio no hubo cambios oxidativos estadísticamente significativos de las células tumorales bajo ninguno de los tratamientos pero sí una tendencia al aumento en la producción de lipoperóxidos en presencia del antagonista GW con y sin tratamientos adicionales (Figura 4).

***Formación de hidroperóxidos (%) en células tumorales T-47 D en ausencia o presencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662):***

No se encontraron diferencias significativas en la formación de hidroperoxido en cultivos controles y en ausencia o presencia de GW 9662.

***Formación de lipoperóxidos (%) en células tumorales T-47 D en ausencia o presencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662):***

El Ácido Retinoico junto al Ácido Araquidónico mostraron actividad antitumoral a través de la formación de lipoperóxidos comprometiendo así la integridad de la membrana celular y por lo tanto la viabilidad de dicha célula cancerígena. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos cuando se agregó el GW9662 junto al Ácido Retinoico + Ácido Araquidónico con respecto a los controles (Figura 5 y 6).

***Actividad específica de  $\gamma$ - glutamil Transpeptidasa (GGTP).*** (Absorbancia por  $10^4$  a  $410$  nm  $\pm$  error estándar).

La actividad de esta enzima de membrana puede ser considerada como un marcador indirecto relacionado a la malignidad. En este ensayo se utilizó sólo la dosis de 50  $\mu$ M de GW. Los niveles enzimáticos de GGTP no presentaron variaciones entre los tratamientos. Si bien el GW no tuvo un efecto por sí mismo, las células C tratadas con GW presentaron niveles bajos de esta enzima mientras con AA+GW+AR hubo una tendencia a niveles altos de enzima comparados con sus respectivos controles (Figura 7).

***Apoptosis*** (Técnica de Hoescht). Figura 8

## DISCUSIÓN

Se sabe que en las células tumorales, el metabolismo de los ácidos grasos no responde adecuadamente a los mecanismos regulatorios requeridos para la homeostasis celular normal [15]. Las células cancerosas presentan perfiles lipídicos alterados, no comparables a una célula normal. La línea celular MCF-7 así como la T47-D muestra una incorporación adecuada al aporte exógeno del ácido graso que se trate sin modificación por la presencia de GW o de ácido retinoico.

Con relación a la viabilidad celular el ácido retinoico presenta actividad antitumoral propia, no así los PUFAs ya sean  $\omega_3$  u  $\omega_6$  que necesitan del AR para ser activos. Los efectos antitumorales de los retinoides son atribuidos a su influencia sobre la proliferación [16,25]. Los mecanismos moleculares por los cuales el AR actúa sobre los procesos de inhibición de crecimiento tumoral y diferenciación son aún poco claros, con vías de acción no del todo conocidas. Sin embargo sí se conoce que el AR induce la liberación de ácido araquidónico y que éste y sus metabolitos juegan un rol importante en la homeostasis celular [6, 5, 20].

A su vez, el ácido araquidónico mostró un efecto citotóxico dosis-dependiente, sin que lo afecte la presencia de ácido retinoico en ambas líneas celulares con efecto marcado en la línea T47-D (5). Este efecto puede disparar muerte celular por activación de las caspasas nucleares, produciendo fragmentación del ADN, sobre todo en una de las líneas celulares (T47-D). La oxidación se considera el mecanismo inicial que induce la translocación de la fosfatidilserina desde el dominio citosólico a la

superficie externa de la membrana plasmática, siendo un paso fundamental del proceso apoptótico [12, 23].

Al agregar el inhibidor específico de PPAR $\gamma$  (GW9662) se ve un aumento en la actividad citotóxica de todos los tratamientos, aunque el GW no tenga actividad por sí solo.

Con relación a la lipoperoxidación, la cual tiene un marcado rol antitumoral, aunque variable, se observaron diferentes respuestas dependiendo de la línea celular tumoral. Mientras MCF- 7 mostró diferencias significativas entre los tratamientos y una tendencia al aumento en la producción de lipoperóxidos en presencia del antagonista GW 9662 con y sin tratamientos adicionales; las T47-D mostraron un marcado aumento en la producción de lipoperóxidos. Este efecto podría deberse a que el GW 9662 puede inhibir la formación de tumor en un modelo animal e inducir la regulación de ROS (especies reactivas al oxígeno) intracelular inhibiendo la vía de la lipogénesis [27]. Y por otro lado la lipooxidación se vio incrementada por la presencia de ácido araquidónico, producto que también disparó la apoptosis.

Se puede considerar la GGTP como un marcador de estrés oxidativo. Una gran actividad enzimática indica una mayor resistencia al daño oxidativo. No hubo cambios en las células tratadas pero sí una tendencia a un aumento de la actividad en las células tratadas con AR+GW+AA.

## CONCLUSIÓN

De todos los factores ambientales la dieta jugaría un rol crítico en la prevención y patobiología del cáncer. En el presente trabajo se han aportado algunos datos originales al no observar un efecto sinérgico entre el ácido retinoico y los ácidos grasos propuestos en ausencia o presencia de antagonista de PPAR $\gamma$  a partir de estos datos se puede concluir en esta primera etapa de experimentación que:

Los nutrientes antitumorales, de manera dosis dependiente, fueron el ácido graso de la familia  $\omega_3$  (EPA eicosapentaenoico), el ácido retinoico (AR) y el antagonista específico para los PPAR $\gamma$  (GW 9662). El ácido Araquidónico actúa independientemente ante la presencia del AR, EPA o del inhibidor GW 9662. Cada nutriente tuvo un efecto propio no observándose interacciones entre los nutrientes antitumorales. El ácido araquidónico ( $\omega_6$ ) mostró una tendencia en el aumento de la producción de lipoperóxidos y los niveles de enzima GGTP. En base a lo expuesto no hubo un efecto sinérgico de los tratamientos en esta línea celular de cáncer mamario humano MCF-7 ni en la línea T47-D.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anisimov VN. Biology of aging and cancer. *Cancer Control* 2007 14:23-31.
2. Comba A, Maestri DM, Berra MA, García CP, Das UN, Eynard AR, et al. Effect of  $\omega_3$  and  $\omega_9$  fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipid Health Dis* 2010, 9:112-120.
3. Das UN Essential Fatty Acids. *Curr Pharm Biotechnol* 2006, 6:455-467
4. doi: [10.1016/j.bbadis.2011.02.014](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014).
5. Bell E, Ponthan F, Whitworth C, Westermann F, Thomas H, Redfern CP. Cell Survival Signalling through PPAR $\delta$  and Arachidonic Acid Metabolites in Neuroblastoma. Published online Jul 9, 2013 doi: [10.1371/journal.pone.0068859](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068859). Peiwen Fei, Editor.
6. Farooqui AA, Antony P, Ong WY, Horrocks LA, Freyzs I. Retinoic acid-mediated phospholipase A<sub>2</sub> signaling in the nucleus. *Brain Res Rev* 2004, 45: 179-195.
7. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957, 226:497.
8. Kuniyasu H (2008). The roles of dietary PPAR gamma ligands for metastasis in colorectal cancer. *PPAR Res* 2008- 529720
9. McCullagh P, Nelder JA (1989). Generalized linear models (2<sup>o</sup> ed.). London, UK: Chapman & Hall.
10. Medina Basso M, Eynard AR, Valentich MA. Dietary lipids modulate the epididymis fatty acids composition, gamma glutamyltranspeptidase and lipoperoxidation level of mice. *Anim Reprod Sci* 2006, 4:364-372.
11. Navarro A, Muñoz SE, Lantieri MJ, Díaz MP, Cristaldo PE, Fabro SP, et al. Meat cooking habits and risk of colorectal cancer in Cordoba, Argentina. *Nutrition* 2004, 20:873-877
12. Notarnicola M, Messa C, Refolo MG, Tutino V, Miccolis A, Caruso MG. Polyunsaturated fatty acids reduce fatty acid synthase and hydroxyl-methyl-glutaryl CoA-reductase gene expression and promote apoptosis in HepG2 cell line *Lipids Health Dis* 2011 18;10:10
13. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000; 267 (17): 5421-5426.
14. OPS. Planificación Local Participativa: Metodologías para la prevención de la Salud en América Latina y el Caribe. Serie Paltex 1999, nro. 41.
15. Pasqualini ME, Heyd VL, Manzo P, Eynard AR. Association between E-cadherin expression by human colon, bladder and breast cancer cells and the 13-HODE:15-HETE ratio. A possible role of their metastatic potential. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003, 68:9-16
16. Patel JB, Mehta J, Belosay A, Sabnis G, Khandelwal A, Brodie AMH, Soprano DR, Njar VCO. Novel retinoic acid metabolism blocking agents have potent inhibitory activities on human breast cancer cells and tumor growth. *Br J Cancer* 2007, 96:1204-1215
17. Quiroga A, Quiroga PL, Martínez E, Soria EA, Valentich MA. Anti-breast cancer activity of curcumin on the human oxidation resistant cells ZR-75-1 with  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase inhibition. *J Exp Ther Oncol* 2010, 8:261-266.
18. Quiroga PL, Eynard AR, Soria EA, Valentich MA. Interaction between retinoids and eicosanoids: Their relevance to cancer chemoprevention. *Curr Nutr Food Sci* 2009, 5:126-133.
19. Quiroga PL, Soria EA, Valentich MA, Eynard AR (en prensa, 2014). Synergistic anticancer effect of retinoic acid and different unsaturated fatty acids on human breast tumor cell lines, *Current Pharmaceutical Desing*, aceptado para su publicación
20. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta.* Aug 2007; 1771(8): 926–935. doi: [10.1016/j.bbalip.2007.02.013](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.02.013)
21. Ross SA Evidence for the relationship between diet and cancer. *Exp Oncol* 2010, 32(3):137-42
22. Soria EA, Goleniowski ME, Cantero JJ, Bongiovanni GA. Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Hum Exp Toxicol* 2008, 27:341-346.
23. Varga T, Zimmerman Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* Aug 2011; 1812(8): 1007–1022.
24. WHO, 2009
25. Wolf G. Retinoic acid as cause of cell proliferation or cell growth inhibition depending on activation of one of two different nuclear receptors. *Nutr Rev* 2008 66:55-59
26. World Cancer Research Fund(WCRF)/ American Institute for Cancer Research (AICR) Food, Nutrition, Physical Activity and the prevention of Cancer: A Global Perspective. AICR: Washington, DC, 2007
27. X Wang, Y Sun, J Wong, D S Conklin. PPAR $\gamma$  maintains ERBB2-positive breast cancer stem cells. *Oncogene* 2013 32(49): 5512–5521. 2013. doi: [10.1038/onc.2013.217](https://doi.org/10.1038/onc.2013.217)

ANEXO

Tabla 1

**PERFIL DE AGs DE CELULAS TUMORALES MCF-7**

Tratamientos	Acidos Grasos Saturados			Acidos Grasos Insaturados								
	14:0	16:0	18:0	ω-5	ω-7	ω-9	ω-6		ω-3			
C	2.6	25.16	13.1	0.95	3.51	29.96	6.44	7.43	0.91	0.87	2.49	2.32
AR	4.44	23.33	11.92	2.29	3.21	31.87	5.23	7.91	0.45	0.47	2.53	1.98
AR+AA	1.91	17.92	8.82	0.37	2.5	24.8	3.89	27.72	0.43	0.39	1.91	1.98
AR+EPA	4.71	31	5.71		3.64	21.43	6.94	4.99	0.15		1.63	0.47
C+GW	2.05	23.27	11.51	0.74	2.32	32.42	6.16	9.16	0.81	0.35	2.88	2.52
AR+GW	5.08	13.28	10.42	0.7	3.52	32.04	5.56	1.31	0.01	0.2	2.83	0.24
AR+AA+GW	2.42	16.8	9.76	0.1	1.92	21.88	0.19	21.28	0.35	0.01	1.22	1.15
AR+EPA+GW	1.85	20.35	11.32	0.5	1.38	34.37	4.08	5.95	0.26	10.27	1.91	6.36

Los valores respresentan la media en porcentaje de tres determinaciones de 10 8/mL CN en suspensión. El ESM fue menor al 6% en todos los casos

Tratamientos sin GW (sin inhibidor)

Tratamientos con GW (con inhibidor)

Tabla 2

**PERFIL DE AGs DE CELULAS TUMORALES T47-D**

Tratamientos	Acidos Grasos Saturados			Acidos Grasos Insaturados								
	14:0	16:0	18:0	ω-5	ω-7	ω-9	ω-6		ω-3			
C	2.6	25.34	13.1	0.95	3.51	29.96	6.44	6.65	0.91	0.87	2.49	2.23
AR	4.44	23.33	11.92	2.29	3.21	31.87	5.23	7.91	0.45	0.47	2.44	1.89
AR+AA	1.91	16.29	8.82	0.37	2.5	24.8	3.89	26.54	0.43	0.39	1.91	1.89
AR+EPA	4.71	31	5.71		3.64	22.1	6.94	4.99	0.15		1.23	0.47
C+GW	2.05	23.27	11.51	0.74	2.32	32.42	6.16	9.16	0.81	0.35	2.88	2.52
AR+GW	5.08	13.28	10.42	0.7	3.52	32.04	5.56	1.31	0.01	0.2	2.33	0.24
AR+AA+GW	2.42	16.8	9.76	0.1	1.92	21.88	0.19	22.15	0.35	0.01	1.22	1.1
AR+EPA+GW	1.85	20.35	11.32	0.5	1.38	34.37	4.08	5.95	0.26	10.27	1.91	6.63

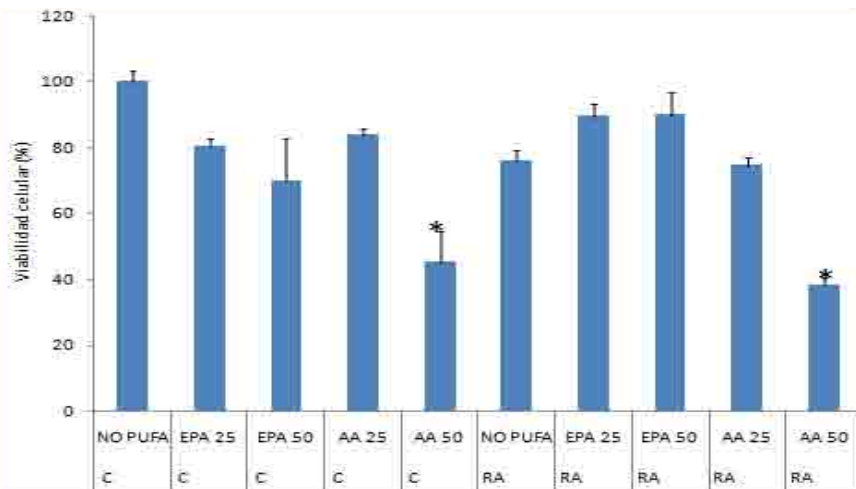
Los valores respresentan la media en porcentaje de tres determinaciones de 10 8/mL CN en suspensión. El ESM fue menor al 6% en todos los casos

Tratamientos sin GW (sin inhibidor)

Tratamientos con GW (con inhibidor)

Figura 1: Viabilidad (%) de células tumorales por ensayo de resazurina. (Absorbancia por 10<sup>4</sup> a 540 nm ± error estándar)

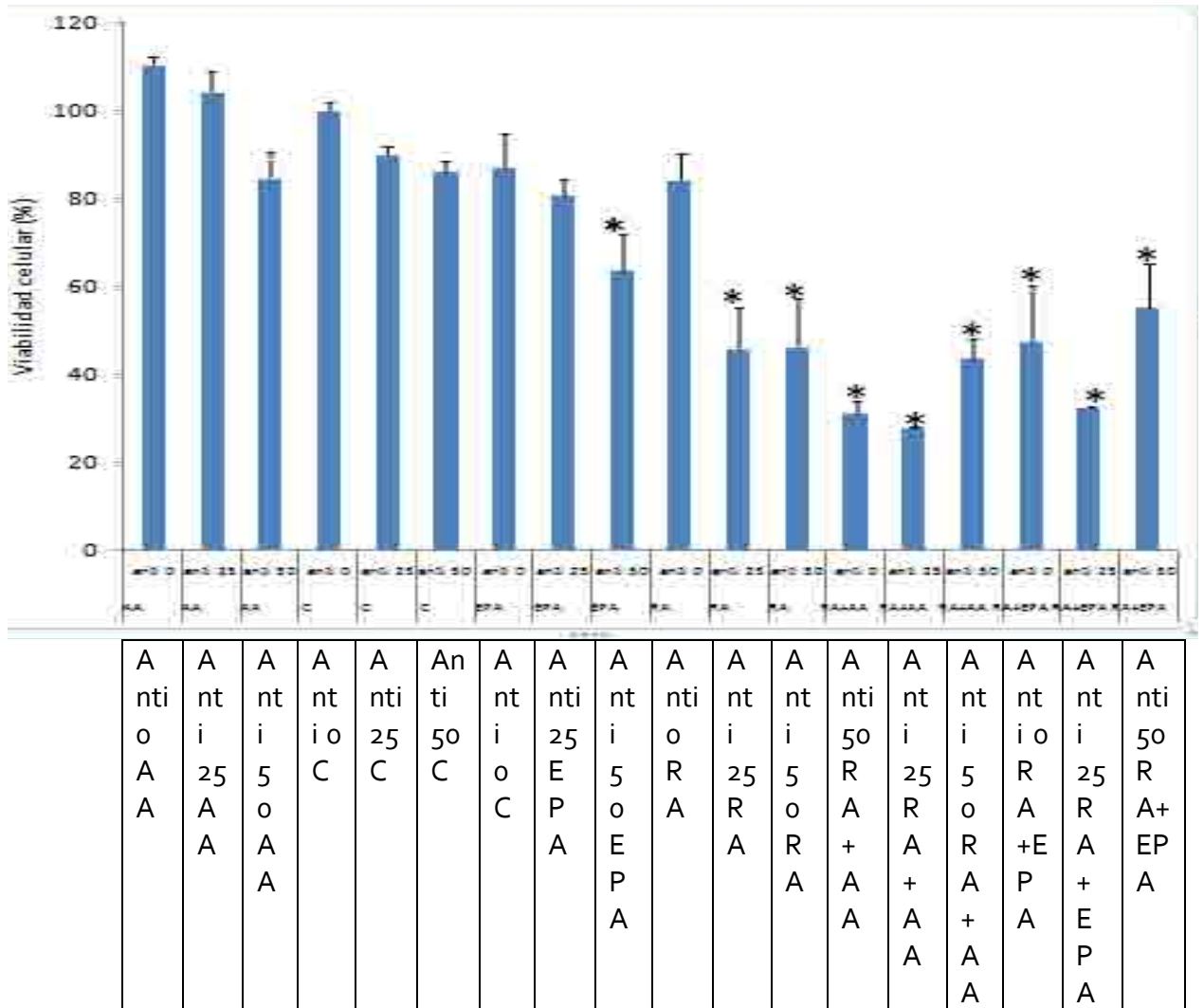
**LINEA CELULAR MCF-7**



Tratamientos: control (C), ácido retinoico sólo (RA), ácido eicosapentaenoico (EPA) (25 y 50 µM), ácido araquidónico (AA) (25 y 50 µM) y ácido retinoico con los respectivos ácidos grasos (RA+EPA; RA+ AA).

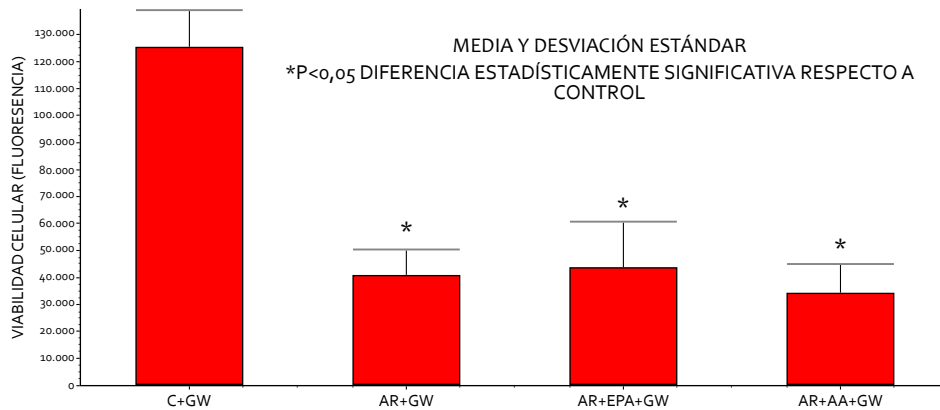
Expresión en inglés que se corresponde a ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Disminución significativa ( $p < 0,001$ ) respecto al control correspondiente (\*).

**Figura 2:** Viabilidad (%) de células tumorales por ensayo de resazurina en ausencia o presencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662). (Absorbancia por  $10^4$  a 540 nm  $\pm$  error estándar) LINEA CELULAR MCF-7



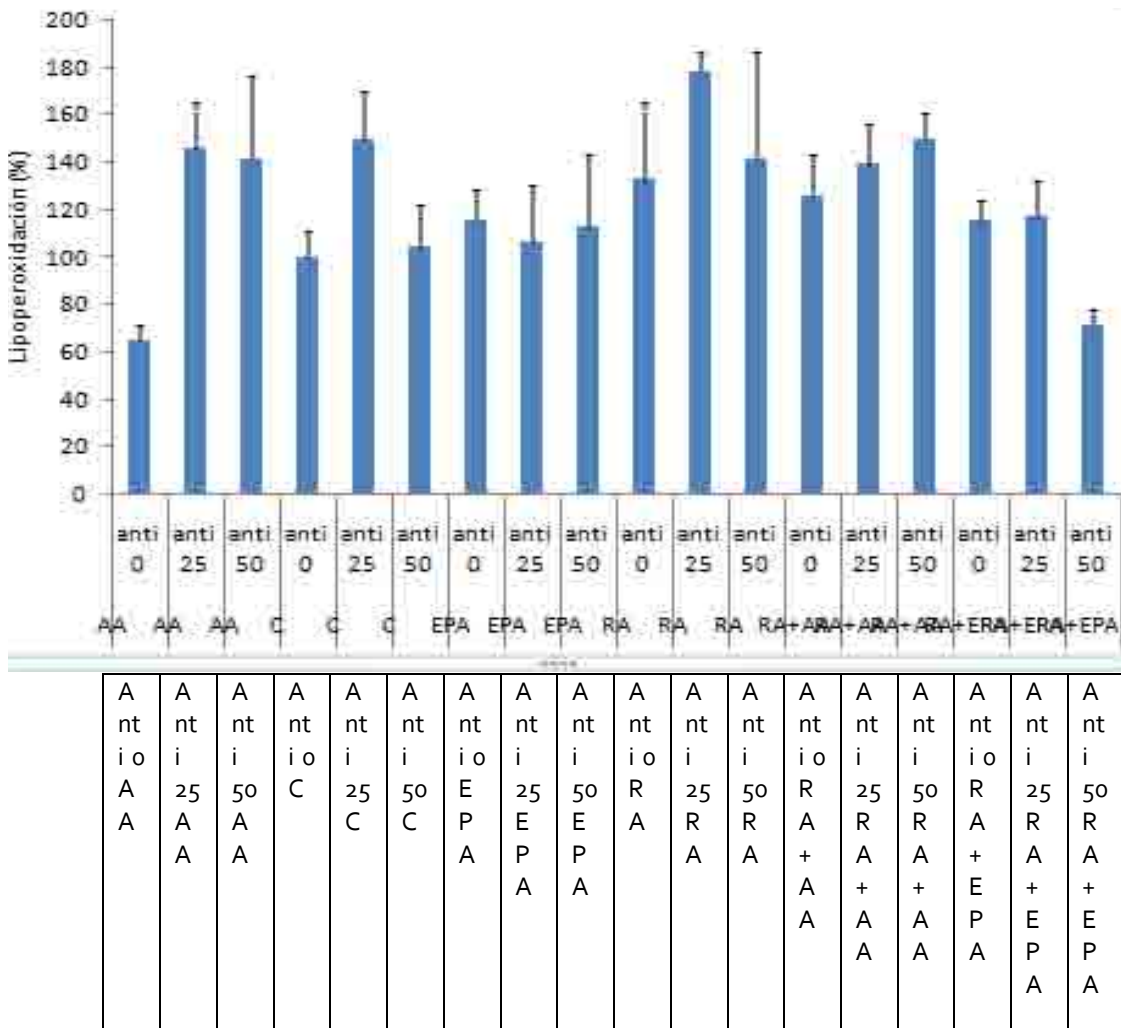
Tratamiento: control (C), ácido retinoico sólo(RA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (AA) y ácido retinoico con los respectivos ácidos grasos (RA+EPA; RA+ AA). A cada condición se le agregó 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M respectivamente de un antagonista de PPARs gamma (GW 9662). Disminución significativa ( $p < 0,001$ ) respecto al control correspondiente (\*).

Figura 3: Viabilidad (%) de células tumorales por ensayo de resazurina en ausencia o presencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662). (Fluorescencia)  
LINEA CELULAR T-47 D



Tratamiento: control (C), ácido retinoico (AR) 10 uM, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (AA) 50 uM. A cada condición se le agregó 50 uM de un antagonista de PPARs gamma (GW 9662). Disminución significativa ( $p < 0,001$ ) respecto al control correspondiente (\*).

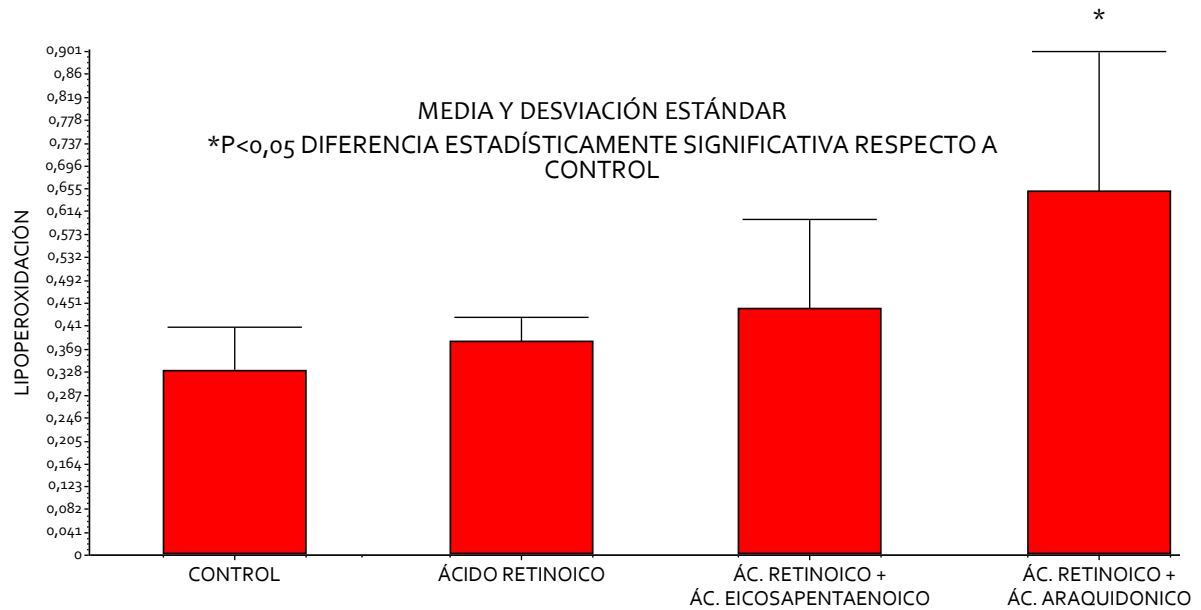
Figura 4: Formación de lipoperóxidos (%) en células tumorales MCF-7 en ausencia o presencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662).



Tratamiento: control (C), ácido retinoico sólo (RA) 10  $\mu$ M, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (AA) 50  $\mu$ M y ácido retinoico con los respectivos ácidos grasos (RA+EPA; RA+ AA). A cada condición se le agregó 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M respectivamente de un antagonista de PPARs gamma (GW 9662).

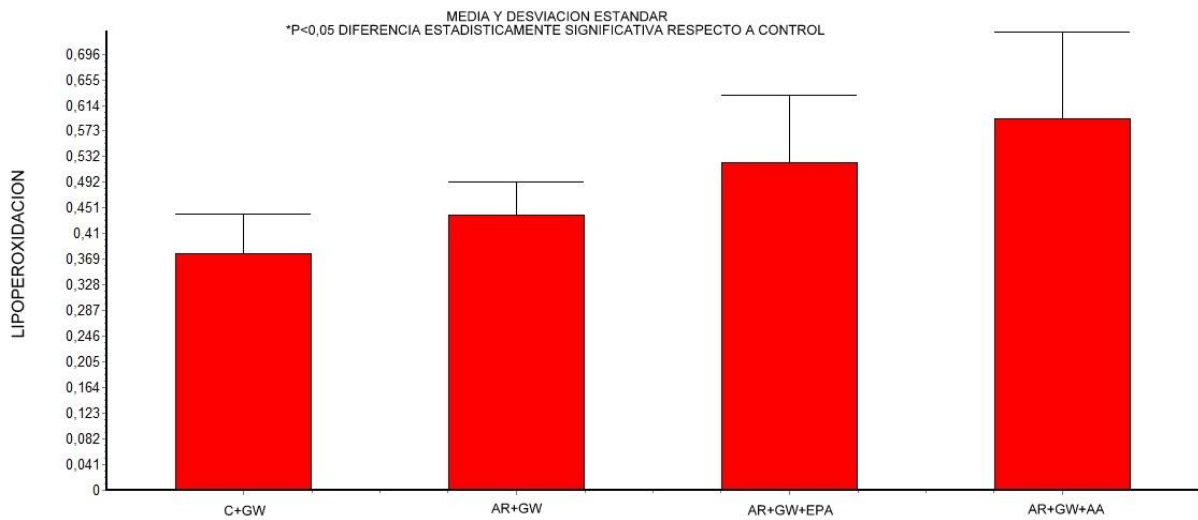
**Figura 5:** Formación de lipoperóxidos (%) en células tumorales tratadas con ácido retinoico, ac retinoico + ácido eicosapentaenoico, ácido retinoico + ácido araquidonico en ausencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662). Disminución significativa ( $p < 0,001$ ) respecto al control correspondiente (\*).

LINEA CELULAR T-47 D



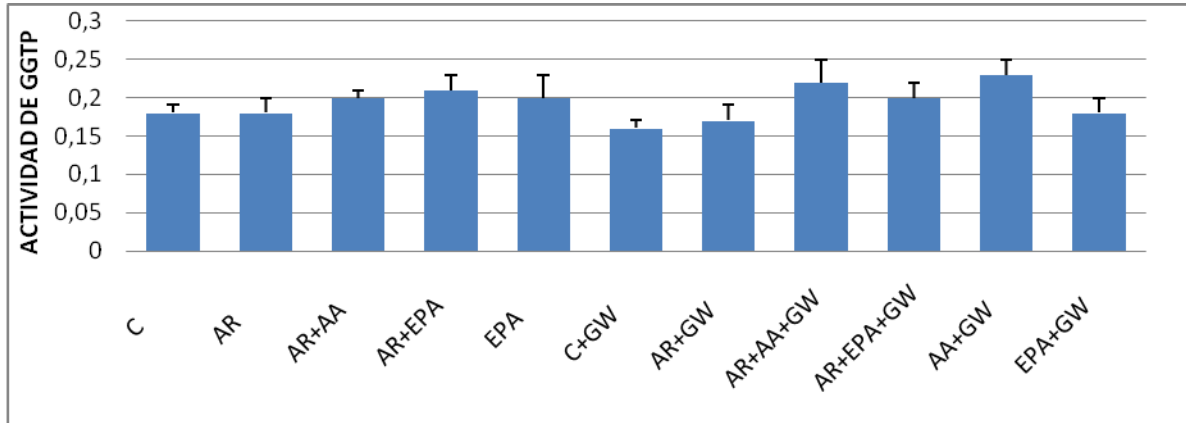
**Figura 6:** Formación de lipoperóxidos (%) en células tumorales tratadas con ácido retinoico, ac retinoico + ácido eicosapentaenoico, ácido retinoico + ácido araquidonico en presencia de antagonista específico de PPARs gamma (GW 9662). Aumento significativo ( $p < 0,001$ ) respecto al control correspondiente (\*).

LINEA CELULAR T-47 D



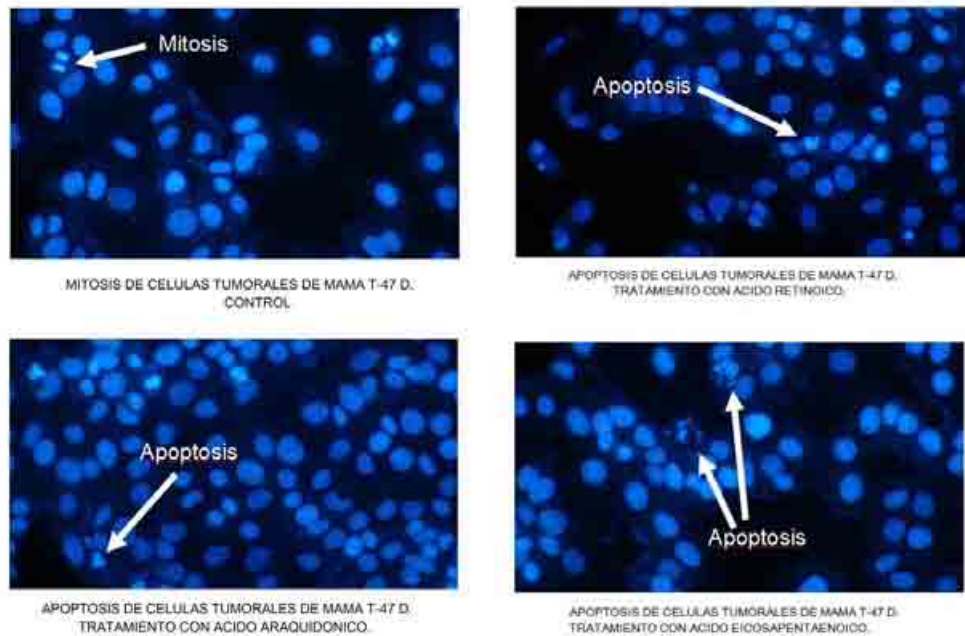
Tratamiento: control (C), ácido retinoico (AR) 10  $\mu$ M, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (AA) 50  $\mu$ M. A cada condición se le agregó 50  $\mu$ M de un antagonista de PPARs gamma (GW 9662).

Figura 7: Actividad específica de  $\gamma$ - glutamil Transpeptidasa (GGTP) (Absorbancia por  $10^4$  a  $410\text{ nm} \pm$  error estándar).



Tratamiento: control (C), ácido retinoico (RA)  $10\ \mu\text{M}$ , ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (AA)  $50\ \mu\text{M}$  y ácido retinoico con los respectivos ácidos grasos (RA+EPA; RA+ AA). A cada condición se le agregó  $50\ \mu\text{M}$  de un antagonista de PPARs gamma (GW 9662).

Figura 8: Observación de procesos de mitosis y apoptosis en células T 47-D con técnica de Hoescht. Células tratadas con ácido retinoico y ácidos grasos. Magnificación  $40\times$ . Microscopio de epifluorescencia.



# CONTROL DE LH SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA VÍA SRC/FAK/PAXILLIN Y CORTACTIN/CDC-42/N-WASP

Flavia Judith Neira

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo

Director: Ángel Matias Sanchez

## RESUMEN

El cáncer de mama es una problemática a nivel mundial. La elevada tasa de mortalidad por este tipo de cáncer se debe a su proceso de metástasis, ya que este evento es difícil de tratar y controlar. Por este motivo, la búsqueda de nuevas terapias tiene como objetivo, evitar el proceso de metástasis celular. La hormona luteinizante (LH) es sintetizada y secretada por la glándula pituitaria y sus efectos sobre el cáncer de mama son poco conocidos. La movilidad celular es un evento fundamental en la migración e invasión celular. Un elevado número de proteínas reguladoras son reclutadas para dirigir la dinámica funcional de estos procesos. Nuestros resultados previos han demostrado como LH regula la movilidad de células tumorales de mama, a través del remodelamiento rápido del citoesqueleto actínico mediante las proteínas ROCK-2 y moesin. Por ello, en este trabajo, se propuso continuar profundizando las bases moleculares de estos procesos. Los resultados indican que LH provoca un rápido remodelamiento actínico, a través de su receptor (LHR), que conduce hacia la activación de N-WASP, mediante una vía de señalización mediada por proteína G/Src/FAK/Paxillin/Cdc42/N-WASP/Arp2-3. Además, se pudo determinar una regulación adicional entre las proteínas Src/FAK/Cortactin hacia N-WASP/complejo Arp2/3, promoviendo la migración e invasión celular.

## ABSTRACT

Breast cancer is a worldwide problem. The high mortality rate by this type of cancer is due to the process of metastasis. Since this event is difficult to treat and to control, the search for new therapies aims to prevent cell metastasis. Luteinizing hormone (LH) is synthesized and secreted by the pituitary gland and its effects on breast cancer are poorly understood. Cell mobility is a key event in cell migration and invasion. A large number of regulatory proteins are recruited to direct the functional dynamics of these processes. Our previous results have shown that LH regulates breast cancer cell motility, through the rapid remodeling of the actin cytoskeleton through ROCK-2 and moesin proteins. Therefore, in this work it was decided to further deepen the molecular basis of these process. The results indicate that LH causes a rapid actinic remodeling, via LHR receptor. This leads to the activation of N-WASP, through a signaling pathway mediated by protein G/Src/FAK/Paxillin/Cdc42/N- WASP/Arp2-3. In addition, it was observed an additional regulation via Arp2/3 complex and Src/FAK/Cortactin proteins towards N-WASP promoting migration and cell invasion.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una problemática a nivel mundial. La detección temprana, el diagnóstico preciso, el tratamiento adecuado y oportuno, son las herramientas necesarias para la prevención y el control del cáncer de mama (Viniestra M., et. al., (2010). *Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control*).

Gran parte de los cánceres de mama son hormono-dependientes, y representan un desafío importante para la salud pública, ya que se encuentran entre los tipos más comunes, el cáncer mamario. Los esteroides sexuales, como estrógeno y progesterona, no sólo cumplen funciones críticas en la vida de un individuo, sino que además están implicados en el desarrollo y progresión de patologías en el cáncer de mama [1-2]. En el caso del estrógeno, existen inhibidores de la aromatasa (IA) que se han utilizado como una terapia adyuvante eficaz contra esta patología, especialmente en mujeres menopáusicas con cáncer de mama estrógeno receptor positivo o antagonistas del receptor de estrógeno, que logran disminuir los niveles circulantes de esta hormona, y de esta manera la progresión de la patología [3]. Por otro lado,



agonistas y/o antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), también son de uso oncológico en aquellos pacientes que presentan elevados niveles de gonadotropinas, como en mujeres posmenopáusicas o pacientes sometidos a inducción de la ovulación [4-5]. La finalidad de su utilización se basa en provocar indirectamente la supresión de la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). Estos eventos conducirían a una disminución en la producción de esteroides por parte de las gónadas, desfavoreciendo el desarrollo de cánceres sensibles a hormonas [6]-[7].

Las gonadotropinas LH y FSH, son hormonas glicoproteicas secretadas por la hipófisis y están reguladas por los factores hipotalámicos correspondientes. Estas hormonas están encargadas de regular la función gonadal masculina y femenina como así también la síntesis de hormonas sexuales [8-9]. La modulación de estos procesos biológicos promovidos por las gonadotropinas son mediados por sus respectivos receptores LHR (receptor de la hormona luteinizante) y FSHR (receptor de la hormona folículo estimulante) [10]. Sin embargo, recientes investigaciones demuestran que dichos receptores no sólo se expresan en las gónadas, sino también en otros tejidos, actuando de forma extragonadal, como en el mamario [11]. De acuerdo a estos recientes datos, donde se pone de manifiesto la expresión extragonadal del LHR, se ha postulado que la LH podría ejercer un rol directo en el desarrollo y en la patogénesis mamaria.

Recientes estudios han demostrado como la hormona luteinizante se encuentra implicada en diferentes procesos tumorigénicos. En el caso del cáncer de ovario, la LH estaría implicada en la proliferación, migración e invasión celular [12]. Recientemente, estudios previos llevados a cabo por este grupo de trabajo sugieren un rol extragonadal de LH, el cual a través del reclutamiento de diversas proteínas reguladoras de la motilidad celular, conduciría a un rápido remodelamiento del citoesqueleto actínico, promoviendo la migración e invasión celular.

La movilidad celular, no sólo es de gran importancia para el desarrollo normal de un individuo, sino también en el proceso metastásico del cáncer. La metástasis es un evento crucial, que torna una enfermedad local y en potencia curable, en una enfermedad generalizada, con pocas probabilidades de sobrevivida para el paciente ya que es difícil de tratar [13]. Por ello, evitar la metástasis, es el objetivo principal en la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer,

El movimiento celular, es un proceso de varios pasos que involucran la polarización y extensión de protrusiones de membrana en favor de la migración celular. Para la formación de estructuras de membrana, las células llevan a cabo reordenamientos del citoesqueleto de actina mediados por el reclutamiento de diversas proteínas reguladoras que promueven la migración, invasión y metástasis celular. Entre las proteínas destacadas que regulan la dinámica del movimiento celular se encuentran las proteínas quinasas *Src* y *FAK* (quinasa de adhesión focal). Estas proteínas, forman un complejo que interactúa física y funcionalmente para promover una variedad de respuestas celulares. La fosforilación de *FAK* en Tyr<sup>397</sup>, tras señales upstream, crea sitios de unión a dominios SH<sub>2</sub> que poseen diferentes proteínas, como la quinasa *Src*. La asociación de *Src* con *FAK* provoca cambios conformacionales que conducen a la activación de *Src*. La consecuente fosforilación de *FAK* por *Src*, en Tyr<sup>576/577</sup> en el dominio catalítico de *FAK* es importante para alcanzar la actividad total de la enzima [14]. La activación y formación del Complejo *Src/FAK* conduce a cambios sobre la reorganización de los filamentos de actina para la formación de estructuras especializadas de membrana. Luego de esta reestructuración, se forman los denominados complejos de adhesión focal; los cuales están compuestos de un gran número de proteínas estructurales y reguladoras. Aquí, las quinasas *Src/FAK* juegan un papel de gran relevancia como moduladores de la dinámica de estas adhesiones en favor de la migración. Se conoce, que la formación y activación del complejo *Src/FAK* promueve un fenotipo metastásico e invasivo en células tumorales [15].

Entre las proteínas estructurales se encuentra la proteína Paxillin. Esta misma, no solo cumple una función de andamiaje sino que su activación por la fosforilación en residuos específicos, es de gran relevancia en la formación de los complejos de adhesión focal. De esta manera, además de ser determinante en la dinámica de dichas adhesiones, es un punto de intersección y regulación de diversas vías de señalización intracelular [16-17]. Su estructura se encuentra conformada por múltiples dominios que median diversas interacciones proteína-proteína. Está compuesta por un dominio estructural denominado LIM, localizado hacia el extremo C-terminal, que interactúa con diversas proteínas que en forma conjunta regulan la dinámica de las adhesiones focales [18-19]. Desplazados hacia el extremo N-terminal se encuentran los motivos LD, los cuales son importantes en la regulación de diversas GTPasas, como así también, fundamentales en la interacción de paxillin con *FAK* [20]. Tras la señal desencadenada por un ligando, paxillin es fosforilada y activada, de manera dependiente, del complejo *Src/FAK* en los



residuos Tyr<sup>31/118</sup>, aumentando la unión con FAK quinasa y con ello, su impacto en la dinámica de las adhesiones focales [21]. Finalmente, desplazados hacia el extremo C-terminal se encuentran dominios ricos en residuos de prolina, los cuales interactúan con proteínas, como Src quinasa [22]. De esta manera, paxillin, a través de sus múltiples dominios, interactúa con diversas proteínas donde gran parte de dichas uniones están reguladas por procesos de fosforilación/desfosforilación. Así, paxillin funciona como una plataforma que recluta diversas proteínas reguladoras y estructurales, que juntas, controlan la dinámica de las adhesiones focales y la reorganización del citoesqueleto actínico promoviendo la migración celular [23-24-25].

Otra proteína reguladora es Cortactin. Cortactin, es otra de las proteínas scaffolding que forma parte del grupo de factores promotores de la nucleación actínica (NPF), la cual se encuentra regulando la dinámica de los filamentos actínicos en una variedad de procesos celulares como la migración, endocitosis y la adhesión celular [26]. Inicialmente se descubrió que era un sustrato directo de Src quinasa como así también una proteína de unión a la actina, pero posteriormente se demostró que cortactin también se une en forma directa a N-WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) y el complejo Arp 2/3, favoreciendo su activación [27-28]. La familia de proteínas WASP (WASP, N-WASP y WAVE) son proteínas formadora de andamios, que se encuentran reguladas por GTPasas y juegan un papel clave en la inducción de la ramificación de la actina y la formación de protrusiones de membrana [29]. El proceso de nucleación de la actina por el complejo Arp2/3, parece ser fundamental para una rápida formación de redes actínicas hacia la periferia de la superficie celular [30-31]. De esta manera, N-WASP, es una proteína expresada en células mamarias que se encuentra regulada por Cdc42 GTPasa, y su activación envía señales hacia Arp2/3 que inducen la ramificación de la actina y la formación de protrusiones de membrana a favor de la movilidad [29].

Cortactin se encuentra compuesta por un dominio ácido hacia el extremo N-terminal que se denomina región NTA, la cual se une y activa al complejo Arp 2/3. En el centro de la estructura proteica, se ubican regiones de repetición que se unen a F-actina y regiones centrales que son blancos de fosforilación. Hacia el extremo C-terminal se encuentra el dominio SH<sub>3</sub>, el cual interactúa con diversas proteínas entre las que se encuentra N-WASP [28]. En las adhesiones focales, cortactin interactúa con FAK, sin embargo su actividad está regulada por el complejo Src/FAK. Dicho complejo, fosforila a cortactin en los residuos de Tyr<sup>421/466/482</sup>, siendo la fosforilación de los dos primeros residuos los responsables de su activación [32]. En consecuencia, la fosforilación de los residuos de tirosina por el complejo Src/FAK, modula su interacción con FAK, aumentando la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de dichas adhesiones promoviendo la movilidad celular y favoreciendo los procesos de migración e invasión celular [33-34-35].

Es por ello, que en este trabajo se propuso estudiar los efectos extragonadales de LH que a través de rápidos mecanismos de señalización intracelular regulados por diversas proteínas moduladoras del citoesqueleto actínico, podrían modular la movilidad de células de cáncer de mama T-47D.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Cultivos de líneas celulares de cáncer de mamas***

Las células tumorales de mama T-47D se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (2 mM) y 10% de suero fetal bovino. Se utilizaron estas células con una confluencia del 80% aproximadamente para los experimentos planteados. Antes de los tratamientos, las células se mantuvieron 12-24 horas en un medio privado de esteroides, sin FBS. Las células fueron incubadas por un periodo de tiempo entre 15-30 min, con LH, y se determinó la activación de (FAK, Paxillin, Cortactin y N-WASP) mediante western blot (WB); y la aparición de indicadores de motilidad celular, por medio de Inmunofluorescencia. Para determinar las vías de señalización por las cuales LH induce la motilidad celular utilizamos los siguientes inhibidores: PP2 (inhibidor específico de c- Src), FAKi (inhibidor de FAK), PTX (inhibidor de proteína G) y CK666 (inhibidor del complejo Arp2/3); los cuales fueron añadidos 45 minutos antes de administrar el tratamiento con la hormona. Los compuestos a usar fueron obtenidos de: LH (Luveris 75 UI) de Serono; 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo (3,4-d) pyrimidine (PP2) de Calbiochem (EMD Biosciences, Germany) y Pertussis Toxin (PTX) de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO).

### ***Western blot (WB)***

Los lisados celulares fueron separados por SDS-PAGE (8-12%). Los blots fueron incubados con anticuerpos para las siguientes proteínas específicas: Paxillin (sc-31010), p-Paxillin (Tyr118), LHR, p-Cortactin (sc-101661), p-FAK Tyr397 (Santa Cruz Biotechnology); FAK (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA); N-WASP (ab32707), p-N-WASP (Ser484/485, AB1964, Chemicon International, Millipore). A continuación las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos y la inmunodetección se realizó mediante el uso de revelador quimioluminescente (ECL) a través del software Image Lab™ del equipo ChemiDoc™ XRS de BioRad (BioRad Laboratories, Inc., EEUU).

### ***Inmunofluorescencia***

Células de cáncer de mama fueron cultivadas en cubreobjetos, sometidas a los diferentes tratamientos, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, y fueron permeabilizadas con 0,1% de Tritón durante 5 minutos. Se realizó un bloqueo con BSA (PBS que contiene 3% de albúmina de suero bovino) durante 30 minutos. Luego, las células fueron incubadas con el anticuerpo respectivo durante toda la noche a 4°C, con el fin de determinar la localización intracelular de las proteínas reguladoras (redistribución hacia los sitios de formación de protusiones de membrana). A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado unido a fluoresceína en una dilución 1:200 (Vector Laboratories). Para analizar la localización intracelular de N-WASP, Paxillin y Cortactin, las células fueron incubadas con sus respectivos anticuerpos, (con o sin) el marcador de los filamentos de actina Texas Red-phalloidin (Sigma) durante 30 min; se lavaron e incubaron nuevamente con (DAPI) 4'-6-diamidino-2-phenylindole (Sigma) durante 10 minutos para determinar la marcación de los núcleos. Se montaron los cubreobjetos con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La inmunofluorescencia y la morfología de la célula fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia y se fotografió con cámara digital de alta resolución

### ***Silenciamiento génico con ARN de interferencia y uso de plásmidos.***

Se utilizaron pequeños ARN sintéticos (siRNA, sus siglas en inglés) versus el receptor de LH (SureSilencing shRNA Plasmid Human LHCGR, SuperArray Bioscience Corporation); Paxillin, Cdc42 y N-WASP (Santa Cruz Biotechnology, CA). Además, se utilizaron dos plásmidos con las secuencias codificantes, una para *Cortactin* con una mutación específica de Tyr en Phe sobre los residuos 416/466/482 (triple mutante 3YF). La misma impide la fosforilación de la proteína por Src, (otorgado por el Dr. John A. Cooper, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA): la otra mutante, hacia N-WASP fue sobre su región VCA de su extremo C-terminal truncada (N-WASP  $\Delta$ VCA), la cual impide la unión y la consecuente activación del complejo Arp2/3 (otorgado por el Dr. Alpha Yap, University of Queensland, Queensland, Australia). Tanto los plásmidos como los siRNA fueron usados en una concentración final de 5-10  $\mu$ g/ml y 50-75 nM, respectivamente. La transfección fue realizada empleando Lipofectamina® (Invitrogen, EEUU). Las células fueron tratadas con LH 48 horas posteriores a la transfección y la eficacia del silenciamiento de genes se comprobó por WB.

### ***Ensayo de migración celular***

El ensayo de migración celular se efectuó en placas de 35mm<sup>2</sup> con una confluencia celular del 70%, aproximadamente. Se presionó a través de la monocapa de células con un tip, marcando la línea de inicio. Luego se lavó con PBS estéril y se agregó 2 ml del medio sin suero fetal bovino. Un inhibidor selectivo de la síntesis de ADN, que no inhibe la síntesis de RNA (clorhidrato de Citosina  $\beta$ -D-arabinofuranoside 10  $\mu$ M (Sigma, ARA-C) fue usado 1 hora antes de la sustancia a estudiar. Se hizo un seguimiento de la migración durante 24 y 48 horas. Las células fueron fotografiadas digitalmente y la distancia de migración se midió con un microscopio 100X.

### ***Invasión Celular***

Los ensayos de invasión celular, se realizaron usando Matrigel Invasion Chambers (BD Biosciences, Palo Alto, CA). Luego de rehidratar los GRF Matrigel inserts, se realizaron los tratamientos en los pocillos. Un número igual de control inserts (no contienen GRF Matrigel) se prepararon como control. La suspensión de células T47-D (0,5 ml;  $2,5 \times 10^{-4}$  cel/ml) se agregó a la parte inferior de los insertos. Las cámaras fueron incubadas durante 24 hs, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, las células no invasoras se retiraron de la superficie superior de la membrana utilizando hisopos con punta de algodón.

Las células en la superficie inferior de la membrana se tiñeron con Diff-Quick. Las células se contaron en el campo central de las membranas por triplicado.

#### **Análisis estadístico**

Todos los valores se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism, InStat. Las diferencias estadísticas entre los valores medios se determinaron mediante ANOVA, seguido por Fisher. Se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos con  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### ***LH induce la fosforilación (activación) de N-WASP, a través del remodelamiento del citoesqueleto actínico en células de cáncer de mama.***

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, determinaron que en presencia de la hormona luteinizante LH, células T-47D inducían la fosforilación de la proteína N-WASP<sup>Ser484/485</sup>. Dicha activación se observó con un pico máximo de fosforilación tras 20 minutos de pulso con LH (5UI/ml), y retornó a los niveles basales luego de 60 minutos de tratamiento (Figura 1 A-B).

Posteriormente, mediante ensayos de inmunofluorescencia, se determinó que LH promueve una rápida reorganización del citoesqueleto, con un rápido remodelamiento del citoesqueleto de actina hacia la periferia de la membrana plasmática. Dicho engrosamiento de membrana prepara la célula para su desplazamiento (Figura 1 C). Paralelamente, se evidenció la translocación de N-WASP, mediante su fosforilación/activación en los residuos específicos en Ser484/485. Dicha redistribución fue dirigida hacia la periferia de la membrana plasmática, precisamente hacia los sitios de formación de estructuras especializadas de membrana, tras el tratamiento con LH (Figura 1-C).

### ***LH promueve la activación de N-WASP, a través de su receptor.***

Luego, se procedió al silenciamiento del receptor de la hormona luteinizante (LHR), mediante siRNA específicos. Se observó una significativa disminución en la fosforilación de N-WASP<sup>Ser 484/485</sup> acompañada de una reducción en la expresión del LHR debido al silenciamiento del mismo, en células T-47D, determinando que LH señala hacia N-WASP, a través del receptor LHR (Fig. 2A-C).

### ***LHR señala hacia Paxillin y Cortactin, a través de una vía dependiente de las proteínas quinasas c-Src y FAK.***

Profundizando el estudio de las proteínas reguladoras involucradas en la señalización de LH hacia la activación de N-WASP, nos propusimos evaluar la presunta vía de señalización intracelular desencadenada tras el efecto de la hormona luteinizante.

Células T47-D fueron tratadas en presencia de inhibidores y/o específicos siRNA hacia las proteínas en estudio, y tras el pulso de LH (5UI/ml) durante 20 minutos, se observó la fosforilación de las proteínas, mediante ensayos de western blot y la translocación de las mismas, a través de ensayos de inmunofluorescencia. Los resultados demuestran que LH promueve la activación de Paxillin a través de una vía dependiente de quinasas, Src y FAK (Figura 3 A-B). En forma paralela, pudimos elucidar una cascada de señalización paralela, que mediante este complejo quinasa Src/FAK, estaría modulando de manera independiente de paxillin, la proteína Cortactin (Figura 4 A-B). Dichos resultados nos permiten sugerir que LH estaría modulando la actividad de N-WASP a través de un complejo pivot central (Src/FAK), el cual, a través de control hacia Src/FAK/Paxillin y Src/FAK/Cortactin podría estar controlando la fosforilación específica de N-WASP y así, regulando el proceso de la ramificación actínica.

### ***LH estimula la migración de células tumorales de mama T47-D.***

Con el fin de evaluar y conocer la cascada de señalización que mediaría el efecto de LH sobre la migración celular, a través de diversas proteínas reguladoras del citoesqueleto actínico, se han usado inhibidores involucrados en la migración celular, con el fin de interferir la señal de LH hacia N-WASP. En esta figura se observa que LH incrementó la migración celular, pero este aumento resultó notablemente reducido mediante la inhibición de LHR, proteína G, c-Src, FAK, Paxillin, cdc42 y N-WASP (Figura 5 A-B). Estos resultados sugieren que LH promovería la migración celular a través de una cascada dependiente de LHR/proteína G/c-Src/FAK/Paxillin/cdc42 y N-WASP.

### ***LH promueve la invasión de células de cáncer de mama T-47D.***

Finalmente, nos propusimos determinar el rol de las proteínas Src, FAK, Paxillin, Cortactin, N-WASP y el complejo Arp2/3 en la invasión celular mediante el uso de Matrigel. Los resultados obtenidos demostraron que los tratamientos realizados en presencia de LH aumentaron la invasión de células T47-D. Sin embargo, observamos que este fenómeno fue notablemente reducido, cuando se utilizaron inhibidores específicos de las quinasas Src, FAK y del complejo Arp 2/3; como así también en los tratamientos de silenciamiento de las proteínas Paxillin, Cortactina, Cdc42 y N-WASP (Figura 6 A-B).

### **CONCLUSIÓN**

El objetivo de este proyecto fue identificar las bases moleculares de la acción extragonadal de LH sobre la regulación de la morfología en células de cáncer de mama. Quisimos identificar donde estas acciones pueden requerir la regulación del citoesqueleto actínico vía N-WASP, y caracterizar la cascada intracelular que podría estar involucrada durante esta señalización hacia la migración celular.

Este trabajo demuestra que existe un efecto de la gonadotropina LH en la regulación de la morfología de células tumorales mamarias. A través de una re-organización del citoesqueleto actínico, LH afectaría la formación de estructuras propias de membrana, fundamentales para la migración celular. Estas modificaciones sobre la arquitectura del citoesqueleto conllevan a promulgar un remodelamiento del citoesqueleto de actina hacia la periferia de la membrana plasmática, propagando la formación de ruffles, pseudopodios y filopodios, que median la migración celular.

Hemos estudiado que dichos mecanismos rápidos, inducidos por LH, están controlados mediante su receptor específico LHR, el cual conduce la señalización intracelular hacia N-WASP, a través de un complejo pivot central Src-FAK, conduciendo su señal hacia paxillin/cdc42/N-WASP e independiente Cortactin/N-WASP, controlando la ramificación actínica mediante el mecanismo de fosforilación/activación y redistribución celular en células tumorales de mama T-47D.

Este trabajo se concentró particularmente en el efecto de LH sobre las proteínas Paxillin y Cortactin hacia N-WASP, íntimamente relacionada con las bases moleculares del movimiento celular. N-WASP une señales upstream hacia la activación del complejo Arp2/3 provocando la polimerización actínica. De hecho, la señalización de GTPasas, como cdc42 hacia el complejo Arp2/3 mediante N-WASP, promueve la formación y ramificación de los filamentos de actina [26]. Este proceso es esencial para la formación de redes actínicas que se concentran en la periferia de la superficie celular. Una vez allí son capaces de producir las fuerzas de protrusión necesarias para promover el movimiento celular [29-31]. A través de nuestros experimentos hemos determinado que LH modula los procesos de migración e invasión celular hacia N-WASP, a través de una vía de señalización regulada por LHR/ proteína G/Src/FAK/Paxillin/Cortactin/cdc42/N-WASP.

Estos resultados demuestran que la acción extra-gonadal de LH se relaciona con un incremento en la progresión de la migración e invasión en células de cáncer mamario (Figura 5-6). Esto concuerda con estudios previos que también vinculan a las gonadotropinas con el incremento en la migración de células tumorales de ovario y endometrio [33, 34]. Por lo tanto es importante destacar que la identificación de estas acciones realizadas por las gonadotropinas podría promover al desarrollo de terapias que contrarresten la progresión de esta enfermedad, disminuyendo los niveles circulantes de esta hormona. El uso de drogas antagonistas y/o agonistas de GnRH podrían ser una herramienta útil para reducir los niveles de gonadotropinas con el fin de disminuir los procesos de migración e invasión en células tumorales de mama.

Concluyendo, estos resultados han proporcionado nuevos conocimientos sobre los mecanismos de señalización mediados por la gonadotropina LH hacia la migración e invasión celular. En base a los resultados obtenidos y al curso que sigue esta investigación, esperamos que constituyan una evidencia significativa a favor del posible efecto directo de estas hormonas sobre el cáncer de mama. Particularmente creemos que esto resulta más relevante en mujeres posmenopáusicas, donde los niveles de LH y FSH se encuentran elevados [9] y la tasa de incidencia de cáncer es mucho más alta [14]. Finalmente estos resultados han aportado una nueva base de conocimientos para investigaciones futuras, con finalidad terapéutica para la prevención y/o tratamiento del cáncer de mama.

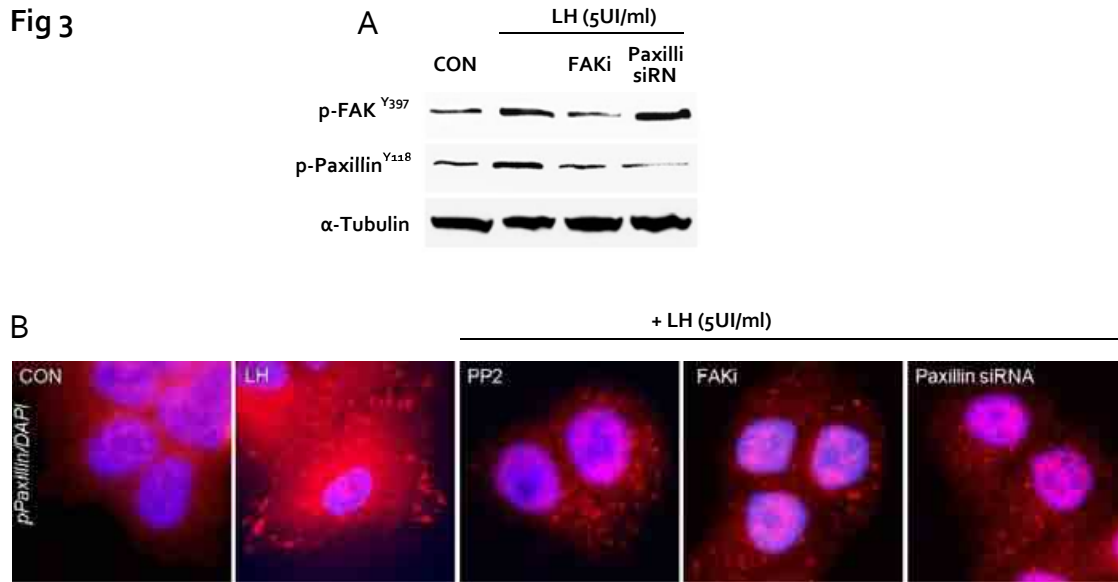
## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diep, C.H., et al., *Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers*. J Mol Endocrinol, 2015. 54(2): p. R31-53.
2. Clarke, R.B., Anderson E, Howell A, *Steroid receptors in human breast cancer*. Trends Endocrinol Metab, 2004. 15(7): p. 316-23.
3. Manavathi, B., et al., *Derailed estrogen signaling and breast cancer: an authentic couple*. Endocr Rev, 2013. 34(1): p. 1-32.
4. Brekelmans, C.T., *Risk factors and risk reduction of breast and ovarian cancer*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2003. 15(1): p. 63-8.
5. Venn, A., et al., *Risk of cancer after use of fertility drugs with in-vitro fertilisation*. Lancet, 1999. 354(9190): p. 1586-90.
6. Del Mastro, L., et al., *Luteinising hormone releasing hormone agonists (LH-RHa) in premenopausal early breast cancer patients: current role and future perspectives*. Cancer Treat Rev, 2011. 37(3): p. 208-11.
7. Emens, LA, Davidson NE, *Adjuvant hormonal therapy for premenopausal women with breast cancer*. Clin Cancer Res, 2003. 9(1 Pt 2): p. 486S-94S.
8. Andersen, CY, Ezcurra D, *Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins*. Reprod Biol Endocrinol, 2014. 12: p. 128.
9. Choi, J, Smitz J, *Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference*. Mol Cell Endocrinol, 2014. 383(1-2): p. 203-13.
10. Banerjee, AA, Mahale SD, *Role of the Extracellular and Intracellular Loops of Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Its Function*. Front Endocrinol (Lausanne), 2015. 6: p. 110.
11. Meduri, G., et al., *Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in breast cancer*. Cancer Res, 1997. 57(5): p. 857-64.
12. Mertens-Walker, I., R.C. Baxter, and D.J. Marsh, *Gonadotropin signalling in epithelial ovarian cancer*. Cancer Lett, 2012. 324(2): p. 152-9.
13. Duffy, MJ, *The war on cancer: are we winning?* Tumour Biol, 2013. 34(3): p. 1275-84.
14. McLean, GW, et al., *The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(7): p. 505-15.
15. Luo, M, Guan JL, *Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis*. Cancer Lett, 2010. 289(2): p. 127-39.
16. Schaller, MD, *Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein*. Oncogene, 2001. 20(44): p. 6459-72.
17. Zaidel-Bar, R, et al., *A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions*. J Cell Sci, 2007. 120(Pt 1): p. 137-48.
18. Efimov, A., et al., *Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites*. J Cell Sci, 2008. 121(Pt 2): p. 196-204.
19. Webb, DJ, et al., *FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly*. Nat Cell Biol, 2004. 6(2): p. 154-61.
20. Scheswohl, DM, et al., *Multiple paxillin binding sites regulate FAK function*. J Mol Signal, 2008. 3: p. 1.
21. Deakin NO, Turner CE, *Paxillin comes of age*. J Cell Sci, 2008. 121(Pt 15): p. 2435-44.
22. Brown MC, Turner CE, *Paxillin: adapting to change*. Physiol Rev, 2004. 84(4): p. 1315-39.
23. Deramaudt TB, et al., *Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes*. PLoS One, 2014. 9(3): p. e92059.
24. Digman MA, et al., *Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy*. Biophys J, 2008. 94(7): p. 2819-31.
25. Tumbarello DA, Brown MC, Turner CE, *The paxillin LD motifs*. FEBS Lett, 2002. 513(1): p. 114-8.
26. Ren G, Crampton MS, Yap AS, *Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions*. Cell Motil Cytoskeleton, 2009. 66(10): p. 865-73.
27. Weed SA, et al., *Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex*. J Cell Biol, 2000. 151(1): p. 29-40.
28. MacGrath SM, Koleske AJ, *Cortactin in cell migration and cancer at a glance*. J Cell Sci, 2012. 125(Pt 7): p. 1621-6.
29. Sanchez AM, et al., *Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP*. Mol Endocrinol, 2010. 24(11): p. 2114-25.
30. Higgs HN, Pollard TD, *Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex*. J Cell Biol, 2000. 150(6): p. 1311-20.
31. Pollard TD, Cooper JA, *Actin, a central player in cell shape and movement*. Science, 2009. 326(5957): p. 1208-12.
32. Wang W, Liu Y, Liao K, *Tyrosine phosphorylation of cortactin by the FAK-Src complex at focal adhesions regulates cell motility*. BMC Cell Biol, 2011. 12: p. 49.
33. Ammer AG, Weed SA, *Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics*. Cell Motil Cytoskeleton, 2008. 65(9): p. 687-707.



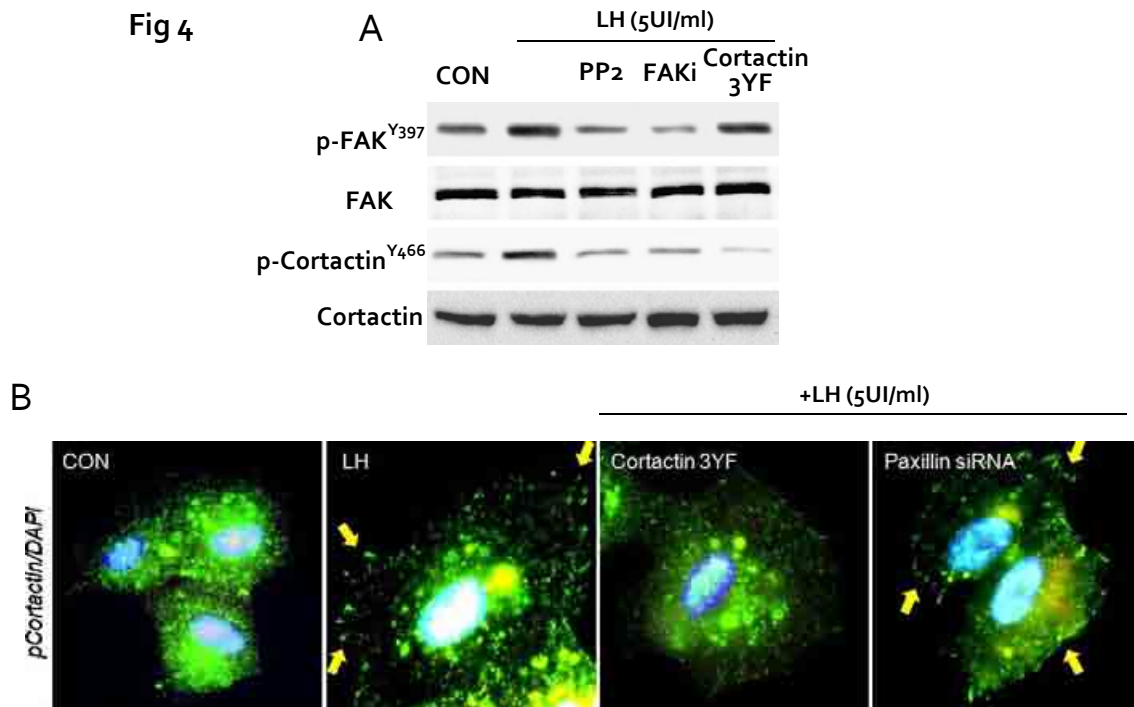
**Figura 2. LH activa N-WASP a través de su receptor (LHR).** Las células T47-D fueron transfectadas con siRNA LHR y analizadas por Western Blot con anti LHR, anti N-WASP y p-N- WASP<sup>Ser484/485</sup> tras el estímulo con LH (5UI) durante 20 minutos. Todos los experimentos se hicieron por triplicado y se muestran imágenes representativas de los mismos.

**Fig 3**

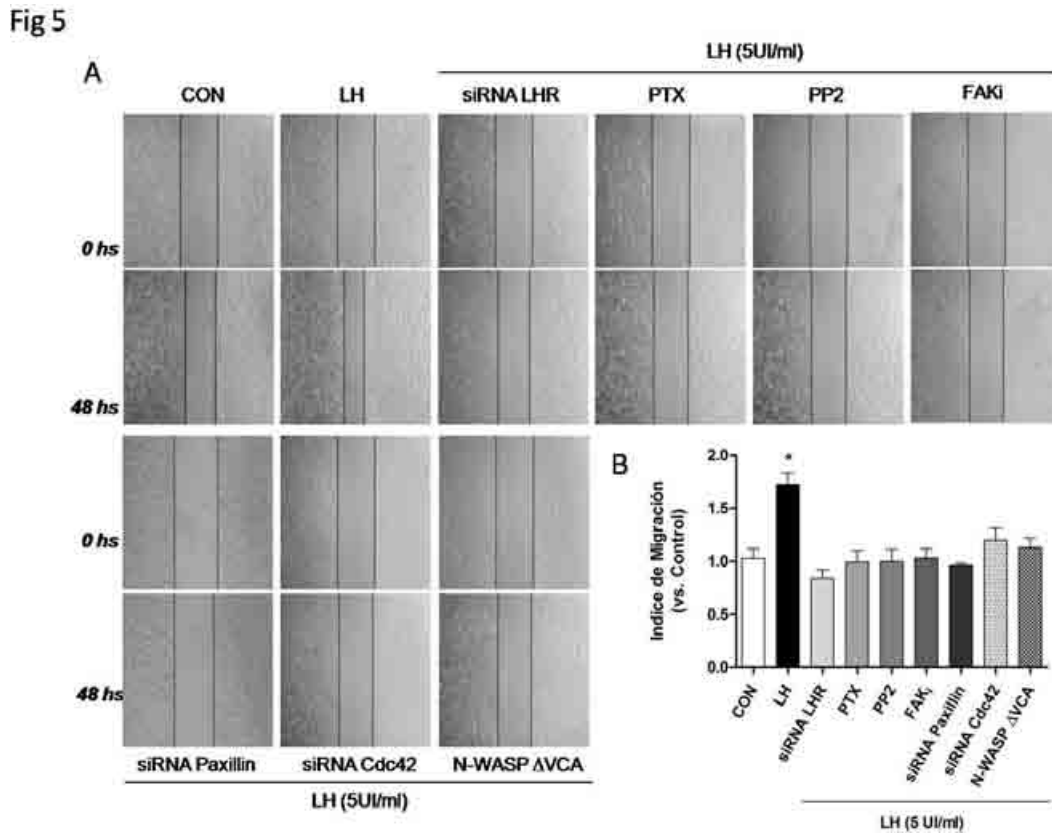


**Figura 3. LH desencadena la fosforilación de Paxillin, a través de las quinasas Src-FAK.** A) Las células fueron tratadas con inhibidores PP2 y FAKi y/o silenciadas con siRNA paxillin, y luego se trató las células con un pulso de LH (5UI) durante 20 minutos. Posteriormente fueron analizadas por Western Blot con p-FAK, p-Paxillin y tubulina. B) inmunofluorescencia Las fibras fueron teñidas con anti-pPaxillin (rojo) y con DAPI los núcleos (azul).

**Fig 4**



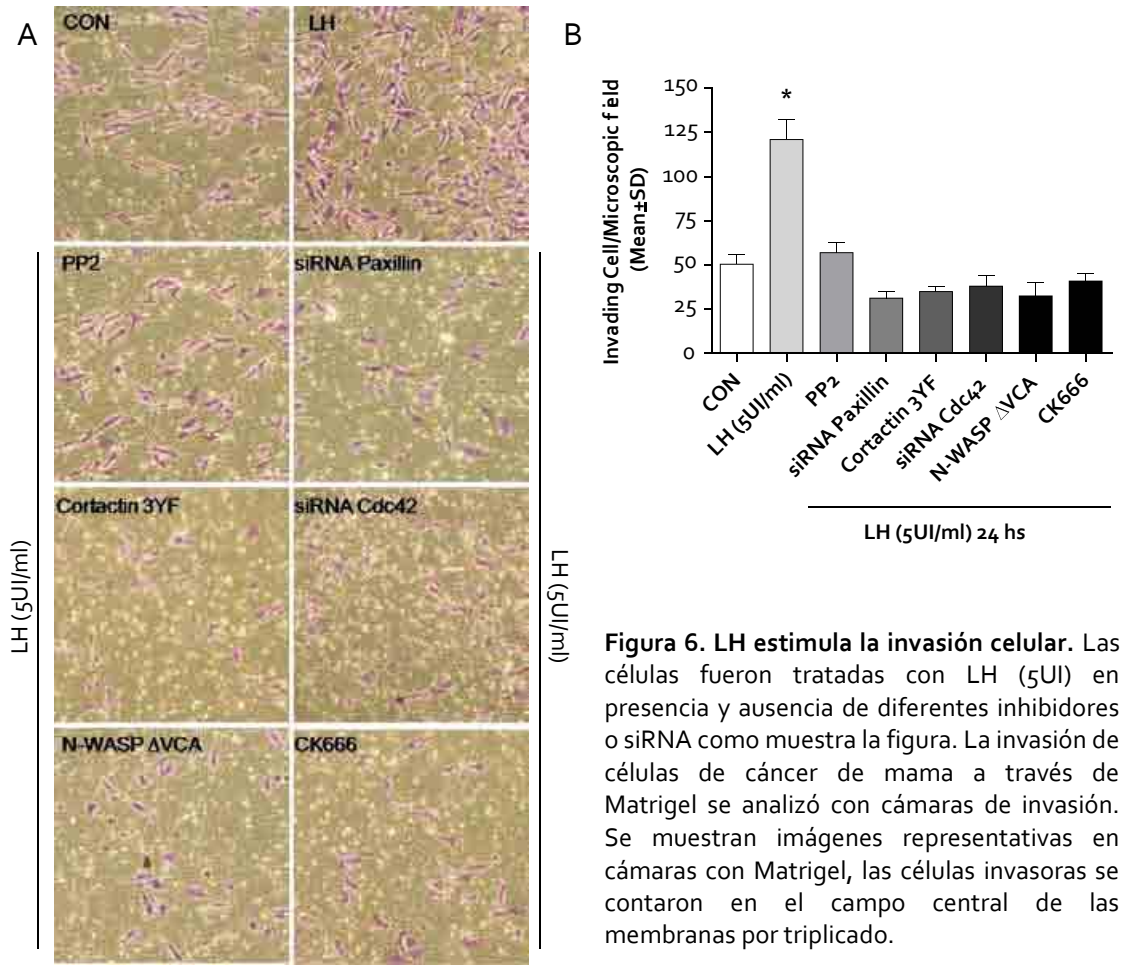
**Figura 4.** LH a regula la activación de Cortactina, a través del complejo Src-FAK quinasa. **A)** Las células fueron inhibidas con PP2, FAKi y/o silenciadas con el plasmido mutante de Cortactin, y luego tratadas con LH (5UI) por 20 minutos. Posteriormente fueron analizadas por Western Blot con anti p-Cortactin/cortactin y anti p-FAK/FAK. **B)** Mediante ensayos de inmunofluorescencia, se marcó a las células con el anticuerpo marcado de pCortactin (verde) junto con los núcleos celulares teñidos con DAPI (azul).



**Figura 5.** LH promueve la migración de células tumorales de mama T47-D. Las células fueron tratadas con inhibidores específicos PTX, PP2 y FAKi, y silenciadas con siRNA LHR, siRNA Paxillin, siRNA Cdc42 y N-WASP ΔVCA, y estimuladas con LH (5UI). Todos los experimentos se hicieron por triplicado y se muestran imágenes representativas de los mismos.



Fig 6



**Figura 6. LH estimula la invasión celular.** Las células fueron tratadas con LH (5UI) en presencia y ausencia de diferentes inhibidores o siRNA como muestra la figura. La invasión de células de cáncer de mama a través de Matrigel se analizó con cámaras de invasión. Se muestran imágenes representativas en cámaras con Matrigel, las células invasoras se contaron en el campo central de las membranas por triplicado.

## ESTUDIO DEL POTENCIAL EFECTO RADIOSENSIBILIZADOR DE LIGANDOS DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA HUMANO

**Melisa Beatriz Nicoud**

Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física, Departamento de Físico-matemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

**Directora:** Vanina A. Medina

### RESUMEN

El melanoma es un tumor derivado de los melanocitos y es el tipo de cáncer de piel más agresivo y letal. Se han reportado niveles elevados de histamina y la presencia de sus receptores RH<sub>1</sub>, RH<sub>2</sub>, RH<sub>3</sub> y RH<sub>4</sub> en diversas líneas celulares de melanoma humano.

El objetivo fue investigar el efecto de la histamina en combinación con la radiación gamma *in vitro* e *in vivo* sobre la radiosensibilidad de las células de melanoma humano 1205Lu, mediante la evaluación de supervivencia clonogénica, muerte celular, metabolismo de especies reactivas del oxígeno como también determinación del tamaño y marcadores de proliferación y apoptosis tumorales. Los resultados indican que la histamina (10 µM) reduce la fracción de supervivencia a 2 Gy (FS<sub>2</sub>Gy, 0.14±0.03 vs. 0.34±0.02 en células no tratadas, P<0.05 T-test), asociado a un aumento significativo de la apoptosis. Este efecto es simulado por un agonista del receptor RH<sub>3</sub>. El tratamiento *in vivo* con histamina (1 mg/kg.día, s.c.) de tumores inducidos en ratones *nude* con las células 1205Lu potencia el efecto antitumoral de la radiación ionizante (5 dosis de 2 Gy), reduciendo el tamaño tumoral y el índice mitótico. Se puede concluir que la histamina aumenta la radiosensibilidad de las células de melanoma.

### ABSTRACT

Melanoma arises from epidermal melanocytes and is the most aggressive and lethal type of skin cancer. It has been previously reported high levels of histamine and the expression of H<sub>1</sub>R, H<sub>2</sub>R, H<sub>3</sub>R and H<sub>4</sub>R in human melanoma cell lines. The aim of this work was to investigate the combined effect of histamine and gamma radiation *in vitro* and *in vivo* on radiosensitivity of human melanoma cells 1205Lu by evaluating clonogenic survival, death, reactive oxygen species and also tumor doubling time and markers of proliferation and apoptosis. Results indicate that treatment with histamine (10 µM) reduced the surviving fraction at 2 Gy (2Gy SF, 0.14±0.03 vs. 0.34±0.02 in untreated cells, P<0.05 T-test), effect that was associated with a significant increase in apoptosis and was mimicked by a H<sub>3</sub>R agonist. In addition, the *in vivo* treatment with histamine (1 mg/kg.day, sc) of tumors induced in nude mice with 1205Lu melanoma cells potentiated the ionizing radiation-induced antitumor effect (5 doses of 2 Gy), reducing tumor size and mitotic index. We conclude that histamine increases the radiosensitivity of melanoma cells.

### INTRODUCCIÓN

El melanoma maligno es un tumor derivado de los melanocitos y es el tipo de cáncer de piel más agresivo y letal. Alta capacidad invasiva, rápida progresión y pobre pronóstico son características distintivas de este tipo de tumor, cuya incidencia en la población caucásica del mundo se encuentra en aumento [5]. En las primeras fases de la enfermedad, la resección quirúrgica representa el principal tratamiento locoregional y ofrece excelentes posibilidades de curación. Una vez que logra metastatizar, se torna extremadamente difícil de tratar, ya que no responde eficientemente a las terapias oncológicas convencionales [20]. La supervivencia a 5 años para individuos con estadios de diseminación regional y a distancia es de 61.7% y 15.2% [18].

Históricamente, el melanoma fue considerado un tumor radiorresistente. Sin embargo, datos clínicos y radiobiológicos recientes sugieren que es un tipo de tumor muy heterogéneo en cuanto a la respuesta frente a la radiación ionizante (RI) y por lo tanto, no universalmente radiorresistente. Tal es así que la radioterapia adyuvante se suele indicar actualmente en pacientes de alto riesgo con ganglios

positivos donde puede mejorar los resultados [11]. La relación entre la respuesta del tumor y el daño a los tejidos normales se conoce como el índice terapéutico y puede ser manipulado mediante el uso de drogas que incrementen el daño en las células tumorales (radiosensibilizadores) o que reduzcan los efectos biológicos de la RI en los tejidos normales (radioprotectores). No obstante, el uso clínico de radioprotectores o radiosensibilizadores es limitado debido a su elevada toxicidad y baja especificidad por no presentar un efecto diferencial entre los tejidos tumorales y los normales.[10] Así, el desarrollo de agentes eficaces y no tóxicos sigue siendo un reto para oncólogos y radiobiólogos.[8,10] En este sentido se ha reportado recientemente que la histamina protege significativamente el intestino delgado, glándulas salivales y la médula ósea frente al daño producido por la RI, en dos modelos de roedores.[14] Por otra parte, se ha demostrado que la histamina aumenta la radiosensibilidad de las células tumorales mamarias MDA-MB-231 y MCF-7, mientras que no modifica los parámetros radiobiológicos de las células no tumorigénicas HBL-100.[15] Estas características sugieren que la histamina sería un candidato adecuado como radioprotector selectivo en aquellos pacientes sometidos a tratamiento radioterapéutico.

Es por tanto de interés en este trabajo contribuir con la optimización del índice terapéutico de la radioterapia para el tratamiento efectivo del melanoma cutáneo mediante el uso de la histamina y ligandos de sus receptores. Para esto se propone:

(1) Investigar *in vitro*, en la línea celular de melanoma humano altamente invasiva 1205Lu, el efecto de la RI en combinación con la histamina oligandos de sus receptores mediante la evaluación de la supervivencia clonogénica, proliferación y muerte celular y el estudio del metabolismo de especies reactivas del oxígeno.

(2) Determinar *in vivo* la respuesta al tratamiento combinado de la RI con histamina en tumores de melanoma invasivo desarrollados en ratones *nude* por inoculación subcutánea de células 1205Lu.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La mayor parte de la metodología se describe detalladamente en publicaciones realizadas previamente.[16,17,18]

### ***Cultivo celular***

La línea celular 1205Lu de melanoma humano (ATCC® CRL 2812TM) se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, glutamina 0.03%, fungizona 0.001% y gentamicina 0.004% (Gibco BRL, EE.UU.). Las células se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se subcultivaron semanalmente y se cosecharon con una solución de tripsina 0.25% / ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM.

### ***Western Blot***

Las muestras fueron procesadas y las proteínas se separaron mediante una electroforesis en gel como se ha descrito previamente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos (Ac) primarios específicos diluidos en PBS-T: anti-β-actina hecho en ratón (1:1000; Sigma Chemical Co., EE.UU.) y PCNA hecho en ratón (1:600; DakoCytomation, Dinamarca) por 24 horas a 4°C. Luego éstas se incubaron con los Ac secundarios específicos (anti-ratón) conjugados con peroxidasa de rábano diluidos en PBS-T (1:1000; Sigma Chemical Co., EE.UU.) Las bandas inmunorreactivas se detectaron por quimioluminiscencia incubando las membranas con una solución de ECL Plus (GE). Finalmente las membranas se digitalizaron para un posterior análisis densitométrico con el programa ImageJ 1.32J (NIH, EE.UU.). Los niveles de expresión de β-actina se utilizaron como control de carga.

### ***Ensayos de proliferación celular***

#### ***Método clonogénico***

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos en medio completo durante 24 horas. Luego éstas permanecieron sin tratamiento o se incubaron con histamina (HA), JNJ28610244 (JNJ28) y R-α-metilhistamina (Ralfa) (10 μM) durante 7-8 días. Luego, las células se fijaron con formaldehído 4% en PBS, se colorearon con azul de toluidina 1% y la proliferación clonogénica se determinó contando las colonias formadas por 50 células o más.

#### ***Incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU)***

Las células se sembraron sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro (Marienfeld, Alemania) colocados en placas de cultivo de 12 pocillos y se cultivaron en medio completo durante 24 horas. Las células se trataron con histamina (10  $\mu$ M) durante 48 horas o permanecieron sin tratar y se irradiaron o no con una dosis de 2 Gy a las 24 horas post-tratamiento, según corresponda. La cuantificación de la síntesis de ADN celular se realizó 24 horas más tarde por adición de BrdU 30  $\mu$ M, análogo de timidina (Sigma Chemical Co., EE.UU.), durante 2 horas. La observación se realizó utilizando el microscopio Axiolab Karl Zeiss (Göttingen, Alemania). El control negativo se realizó reemplazando el Ac primario específico por PBS, el cual no dio lugar a señal.

### **Análisis del ciclo celular**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, se cultivaron durante 24 horas y luego se sincronizaron por cultivo en medio RPMI sin SFB durante 24 horas. Pasado este tiempo se reestableció la concentración de suero (10%) y se realizaron los diferentes tratamientos con histamina (10  $\mu$ M) en combinación con una dosis de radiación de 2 Gy. La distribución del ciclo celular se determinó por citometría de flujo en un Citómetro BD Accuri C6 previa incubación con ribonucleasa A (0.2 mg/ml) y tinción con ioduro de propidio (IP, 50  $\mu$ g/ml). Se utilizó el programa FlowJo™ para el análisis de los datos.

### **Determinación de apoptosis**

#### **Ensayo de Anexina V**

La exposición de la fosfatidilserina sobre la superficie de las células apoptóticas se detectó mediante citometría de flujo luego de una incubación con Anexina V-FITC (BD Biosciences, USA) y IP (50  $\mu$ g/ml). Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo™.

#### **Ensayo de TUNEL**

El número de células apoptóticas se determinó mediante el ensayo de TUNEL (TdT-mediated UTP-biotin Nick Endlabeling) que evalúa la fragmentación del ADN. Se utilizó un kit de detección de apoptosis *in situ* (ApopTag Plus®, Millipore, EE.UU.). Se procedió según manual adjunto. Las células apoptóticas se visualizaron por microscopía óptica usando un microscopio Axiolab Karl Zeiss (Alemania).

### **Irradiación de las células y curvas de supervivencia**

Para determinar los parámetros de radiosensibilidad, las células se sembraron por triplicado en placas de 6 pocillos (1.2-3.0  $\times 10^3$  células/pocillo) y se trataron 24 horas después o se dejaron sin tratar y se irradiaron o no 24 horas después del tratamiento cubriendo un rango de Dosis de 0 a 5 Gray (Gy) usando una fuente de  $^{137}\text{Cs}$  (IBL 437C tipo H, CEBIRSA) de 189 TBq (tasa de dosis: 7 Gy/minuto). Luego de 8 días las células se fijaron, se colorearon con azul de Toluidina 1% y se evaluó la supervivencia mediante el método clonogénico que permite evaluar la capacidad reproductiva de las células, contando colonias con más de 50 células. Las curvas de supervivencia se ajustaron al modelo matemático lineal-cuadrático y se calcularon los parámetros de radiosensibilidad empleando la ecuación: fracción de supervivencia (FS) =  $e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ .

### **Determinación de los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ROS)**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos durante 24 horas y se trataron o no y se irradiaron o no con una dosis de 2 Gy a las 24 horas post-tratamiento. Las células se incubaron con diacetato de diclorodihidrofluoresceína 5  $\mu$ M (DCFH-DA, sonda fluorescente sensible a ROS) que se adicionó justo antes de la irradiación y luego durante 30 minutos a 37°C. El contenido intracelular de ROS se analizó mediante citometría de flujo empleando un citómetro de flujo Citómetro BD Accuri C6. Los datos se analizaron utilizando el FlowJo™. El control de autofluorescencia se realizó sin colorantes y como control positivo las células se trataron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu$ M.

### **Modelo experimental de melanoma humano**

#### **Estudios *in vivo***

Se utilizaron ratones *nude* macho (NIH nu/nu), libres de patógenos, adquiridos de 3-4 semanas de edad de la División de Producción de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Las condiciones fueron

las recomendadas por la "Guía para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio del Consejo Superior de Investigaciones (*Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8va. Ed., 2011). Los protocolos para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio se aprobaron por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (Exp. N°131211-2, 2011).

#### *Generación de tumores de melanoma humano 1205Lu*

Los tumores de melanoma humano se indujeron mediante inyección de las células humanas 1205Lu por vía subcutánea (sc.) en el flanco derecho de los ratones *nude*.

Descripción de grupos de trabajo: **Grupo Control** (n=5): animales que recibieron solución fisiológica (SF), sc.; **Grupo Histamina** (n=5): animales tratados con histamina 1 mg/kg.día, sc.; **Grupo Control 2 Gy** (n=5): animales que recibieron SF y una dosis total de 10 Gy repartida en 5 fracciones de 2 Gy cada una; **Grupo Histamina 2 Gy** (n=5): animales tratados con histamina 1mg/kg.día y una dosis total de 10 Gy repartida en 5 fracciones de 2 Gy cada una.

*Irradiación:* Se utilizó un equipo de irradiación con una fuente de  $^{60}\text{Co}$ , tipo Teradi (Departamento de Radiaciones. División Terapia Radiante. Unidad Alta Energía. Hospital Municipal de Oncología María Curie). Se inició el tratamiento radioterápico a partir del día 7 entregando una dosis fraccionada de 2 Gy. Se prosiguió con la irradiación cada día por medio hasta completar la dosis total.

*Volumen tumoral:* El largo y ancho del tumor se determinó utilizando calibre. De estas medidas se obtuvo el diámetro promedio. El tamaño tumoral se calculó utilizando la fórmula del volumen de una esfera, volumen tumoral [ $\text{cm}^3$ ] =  $4/3 \pi \times r$  [ $\text{cm}$ ] $^3$ . Las curvas de crecimiento tumoral se ajustaron por un programa de regresión no lineal según la ecuación:  $Y_t = Y_0 \times e^{kt}$ , donde  $Y_0$  es el volumen tumoral relativo inicial que aumenta exponencialmente con una tasa constante k. El tiempo de duplicación del tumor (t) se determinó como 0.69/k.

#### **Estudios ex vivo**

##### *Estudios histológicos e inmunohistoquímica*

Los tumores y tejidos se extirparon y se fijaron en formaldehído al 4% en PBS, luego se embebieron en parafina y cortaron en secciones de 3-4  $\mu\text{m}$ . Los cortes histológicos se evaluaron por tinción con hematoxilina-eosina (H&E) y tinción tricrómica de Masson. Para el estudio inmunohistoquímico, los preparados se incubaron con los Ac primarios diluidos en BSA 1% en PBS: anti-histamina hecho en conejo (1:100, Sigma Chemical Co., EE.UU.), anti-HDC hecho en conejo (1:100, Euro-Diagnostica, Suecia), anti-antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) hecho en ratón (1:100, DakoCytomation, Dinamarca); en cámara húmeda a 4°C durante 24 horas. Finalmente los cortes se revelaron con DAB (Sigma Chemical Co., EE.UU.) y contra-colorearon con hematoxilina.

El número de células apoptóticas se determinó mediante el ensayo de TUNEL. Se utilizó un kit de detección de apoptosis *in situ* (ApopTag Plus®, (ApopTag Plus Kit, Millipore, MA, EE.UU.) de acuerdo a manual adjunto. Las células apoptóticas en los cortes de tumor, se visualizaron por microscopía óptica usando un microscopio Axiolab Karl Zeiss (Alemania).

#### **Análisis estadísticos**

El análisis de la significación estadística de los resultados obtenidos se realizó con el programa GraphPadPrism versión 5 (California, EE.UU.). Las evaluaciones se efectuaron por ANOVA seguido del test de comparación de múltiple de Newman-Keuls, o mediante Test-T de Student como se indica en cada caso. Se consideró estadísticamente significativo un  $P \leq 0.05$  (dos colas).

## **RESULTADOS**

### ***La histamina y ligandos de los receptores a histamina modulan los parámetros radiobiológicos de la línea celular de melanoma humano 1205Lu***

Para evaluar la capacidad de la histamina de modificar la respuesta a la RI, se realizó el tratamiento combinado de histamina y radiación (0-5 Gy) en las células 1205Lu. Los parámetros radiobiológicos obtenidos de las curvas de supervivencia ajustadas al modelo matemático lineal-cuadrático mostraron que la histamina aumentó la radiosensibilidad de las células 1205Lu (FS<sub>2</sub>Gy para Histamina vs Control:  $0.14 \pm 0.03$  vs.  $0.34 \pm 0.02$ ). En concordancia, la histamina aumenta el parámetro  $\alpha$  que expresa la susceptibilidad del ADN a la radiación frente a lesiones letales. Este efecto se vio

simulado por el agonista del RH<sub>3</sub>, Ralfa ( $0.21 \pm 0.03$  vs.  $0.45 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ ), mientras que el tratamiento con JNJ28, agonista del RH<sub>4</sub>, no mostró diferencias significativas (Figura 1).

#### ***Efecto de la histamina en combinación con la radiación ionizante sobre la proliferación celular***

Se realizó el ensayo de incorporación de BrdU, análogo de la timidina que se incorpora en el ADN de células en fase de síntesis (fase S) y luego se detectó por inmunocitoquímica. Los resultados muestran que la radiación redujo la capacidad proliferativa de la línea celular 1205Lu. Dicho efecto se potenció cuando las células se trataron previamente durante 24 horas con histamina (Figura 2A). Asimismo, se evaluó la expresión del marcador de proliferación PCNA por Western Blot. El tratamiento con histamina y radiación disminuyó los niveles de expresión de PCNA (Figura 2B).

Por otro lado, se realizó el análisis del ciclo celular a partir de células previamente sincronizadas. El análisis realizado mediante citometría de flujo muestra que se indujo una reducción del porcentaje de células en la fase S a las 24 horas post-irradiación y el tratamiento con histamina en las células irradiadas produjo una acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M (Figura 3).

#### ***Efecto de la histamina en combinación con la radiación ionizante sobre la apoptosis celular***

Para determinar si la inhibición del crecimiento celular inducido por la radiación y los tratamientos era mediada en parte por un aumento en la muerte celular programada por apoptosis, se evaluó la misma mediante el ensayo de TUNEL y Anexina V.

Como se demuestra en la Figura 4, la histamina en combinación con RI indujo un aumento significativo en el número de células apoptóticas en la línea celular 1205Lu evaluada mediante el ensayo de TUNEL (Figura 4A). El aumento de células apoptóticas se confirmó mediante el ensayo de Anexina V (Figura 4B).

#### ***Papel de la radiación ionizante y la histamina sobre los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS)***

Los niveles intracelulares de ROS se determinaron inmediatamente luego de la irradiación mediante citometría de flujo. La RI produjo un aumento de ROS en las células 1205Lu no tratadas como así también en aquellas tratadas con histamina (Figura 5).

#### ***Efecto de la histamina y la radiación ionizante sobre tumores de melanoma humano 1205lu desarrollados en ratones nude***

##### ***Estudios in vivo***

La Figura 6 muestra los resultados pertenecientes a las curvas de crecimiento tumoral. Allí se observa que luego de 36 días de experimentación, aquellos ratones tratados diariamente con histamina (1 mg/kg de peso) en combinación con el tratamiento radioterapéutico presentaron volúmenes tumorales significativamente menores que aquellos animales tratados con solución salina (grupo control) (Figura 6A, B). Estos resultados concuerdan con el aumento del tiempo de duplicación exponencial del tumor observado en animales tratados e irradiados (Figura 6C).

##### ***Estudios ex vivo***

#### ***Características histológicas e inmunohistoquímicas de los tumores xenogénicos 1205Lu***

Los análisis mediante tinción con H&E y tinción tricrómica de Masson, revelaron que los tumores primarios del grupo control se caracterizaban por poseer en la periferia células con núcleos hiper cromáticos e indiferenciados. En su parte central, estos tumores presentaban una zona con grandes áreas de necrosis (Figura 7). Por el contrario, los tumores de los ratones tratados con histamina, presentaban una periférica más diferenciada que el control, una zona con una notoria capa fibroconectiva y una menor área de necrosis. El tratamiento disminuyó el tamaño de las células, contribuyó a una mayor diferenciación y generó un soporte conectivo-vascular (Figura 7). Los tumores de los ratones del grupo control irradiado presentaron en general un cordón tumoral con una capa de células hiper cromáticas similar al control y una inmensa área de necrosis. El grupo de ratones tratados con histamina y radiación presentaron tumores que mostraban células hiper cromáticas altamente indiferenciadas y aumento del tejido conectivo vascular. La zona de tumor sólido presentó una menor celularidad por campo y un incremento de la vacuolización difusa. Se observaron tabiques fibróticos semejantes al grupo histamina (Figura 7).

Los estudios de inmunohistoquímica revelaron que el tratamiento combinado de la radiación con histamina aumentó el número de células apoptóticas y disminuyó los niveles de expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (Figura 8). Además, se observó que el índice mitótico disminuyó en los tumores de los ratones tratados con histamina en combinación con la radiación (Tabla 1).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El melanoma es un tumor que puede presentarse en cualquiera de los tejidos a los que hayan migrado células derivadas de la cresta neural y de todos los tipos de cáncer de piel es el más agresivo y letal. En la actualidad el uso de la radioterapia en ésta patología está indicada en pacientes de alto riesgo, cuando no es posible la extirpación quirúrgica, en el tratamiento de metástasis en tránsito y ganglionar o como paliativo de metástasis sintomáticas.<sup>12</sup> El problema que viene aparejado con la radioterapia es que sus efectos no son selectivos y se manifiestan también sobre los tejidos normales ocasionando efectos adversos indeseados.<sup>21,22</sup> El índice terapéutico se define como la respuesta del tumor para un determinado nivel de daño al tejido normal y puede ser manipulado por radiosensibilizadores, radioprotectores y también con los regímenes de fraccionamiento de dosis que se utilizan convencionalmente en radioterapia, donde se obtiene una mejor tolerancia en los tejidos normales y un mayor efecto terapéutico en el tumor que con una dosis única mayor.

Resulta de suma importancia encontrar agentes que puedan aumentar la radiosensibilidad del tumor, para poder reducir la dosis de radiación de tratamiento y así disminuir la radiotoxicidad producida sobre los tejidos normales circundantes. Se sabe que diferentes agentes quimioterápicos convencionales aumentan la sensibilidad de las células tumorales a la RI. Sin embargo, cuando se combina con ésta, su toxicidad sobre los órganos normales es muy elevada [10,22]. De esta manera, el desarrollo de drogas atóxicas que sensibilicen a las células tumorales frente al tratamiento y protejan el tejido normal es actualmente un desafío para oncólogos y radiobiólogos [11]. En este sentido, se reportó previamente el uso de la histamina como radioprotector en diferentes modelos experimentales *in vivo*. [2,14,15,16,18] Asimismo, se ha reportado que la histamina aumenta la radiosensibilidad de las líneas celulares de cáncer mamario humano MDA-MB-231y MCF-7.[13]

Los resultados obtenidos a partir de las curvas de supervivencia mostraron que la histamina en una concentración de 10  $\mu$ M, administrada 24 horas previas a la entrega de una dosis de radiación (entre 0.6 y 5 Gy), es capaz de modificar los parámetros radiobiológicos en la línea celular 1205Lu, aumentando su radiosensibilidad. A su vez, mediante el ensayo de incorporación de BrdU, se observó que una dosis única de radiación gamma de 2 Gy produce una disminución de la proliferación celular y dicho efecto se ve intensificado cuando las células se tratan previamente con histamina. En esta línea observamos una reducción de los niveles de PCNA (marcador de proliferación celular) en las células tratadas con histamina e irradiadas. Este efecto podría estar mediado a través del RH<sub>3</sub> dado que el efecto radiosensibilizador de la histamina se ve simulado por un agonista del RH<sub>3</sub>.

Asimismo, se observó que la combinación de histamina y radiación (2 Gy) produce una reducción del porcentaje de células en la fase S a las 24 horas post-irradiación y el tratamiento con histamina en las células irradiadas induce una acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M. El final de G<sub>1</sub> es una fase radiosensible, luego las células devienen más radiorresistentes a medida que progresan en la fase S debido a la capacidad de reparación por recombinación homóloga de cromátides hermanas, mientras que la radiosensibilidad celular es máxima en la fase G<sub>2</sub>/M.<sup>10</sup>

Se ha descripto ampliamente que la apoptosis es un proceso involucrado en la inhibición del crecimiento celular causado por la RI.<sup>9</sup> Se decidió entonces, investigar el efecto sobre la apoptosis debido a la combinación de histamina con radiación. Los resultados mostraron que el tratamiento combinado tiene la capacidad de inducir un aumento en el número de células apoptóticas en la línea celular 1205Lu, confirmando el aumento de la radiosensibilidad.

Los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes son el resultado de la deposición de energía en el material irradiado. Las radiaciones interactúan con el medio produciendo ionizaciones y excitaciones al azar de los átomos y moléculas que lo componen, dando origen a cambios fisicoquímicos que finalmente culminan en un efecto biológico. Cuando las radiaciones se absorben en el material biológico es posible que interactúen directamente, produciendo ionizaciones y excitaciones en los átomos que forman las biomoléculas, generando por ejemplo ruptura de cadenas de ADN.

Alternativamente, la RI puede interactuar con otros átomos o moléculas en las células, particularmente agua, produciendo radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS), que son los responsables de producir el daño. Esto es conocido como acción indirecta de las radiaciones y es responsable de aproximadamente el 70% del daño inducido por fotones, radiaciones de baja transferencia lineal de energía.[6,10] Las ROS están directamente asociadas con la citotoxicidad producida por la RI y con la radiosensibilidad de los tejidos. Actúan pleitrópicamente causando daño celular de diferentes maneras ya sea desnaturalizando proteínas, afectando las membranas o dañando el ADN, estos daños si no son reparados correctamente pueden terminar induciendo, entre otros efectos, la apoptosis o la senescencia celular.[10,12,18] Por lo tanto se decidió evaluar si los niveles de ROS se modifican en estas células ante el tratamiento de histamina y radiación ionizante. Los resultados muestran que la radiación aumenta los niveles de ROS en las células 1205Lu. Sin embargo en combinación con la histamina el efecto no se ve modificado.

Estos resultados obtenidos del modelo *in vitro* de melanoma humano indican que la histamina en combinación con la RI modula la radiosensibilidad de la línea celular 1205Lu. El efecto radiosensibilizador se asocia a una disminución en la proliferación celular y a un aumento de la apoptosis.

Por otra parte, el modelo *in vivo* de melanoma humano desarrollado según el modelo propuesto de Czubayko y col., mediante inyección subcutánea de células 1205Lu en ratones *nude* macho,[4] permitió profundizar el estudio del papel que desempeña la histamina combinada con la radiación en la progresión maligna del tumor logrando reproducir el microambiente en el cual se desarrollan estos tumores, lo que posibilita la interacción entre las células tumorales y las del estroma circundante para así evaluar los fenómenos de angiogénesis, invasión local, sensibilidad al tratamiento y la formación de metástasis.

Los resultados muestran que el tratamiento diario con una dosis de 1 mg/kg.día de histamina en combinación con una dosis total de 10 Gy impartida en 5 fracciones de 2 Gy cada una, provoca la disminución de la progresión del melanoma, registrándose menores volúmenes tumorales luego de 36 días de tratamiento.

Los tumores desarrollados en el grupo control exhiben un patrón de crecimiento nodular dentro de la dermis de los ratones. Histológicamente se caracterizan por ser altamente indiferenciados con presencia de zonas necróticas en la parte central. Por el contrario, los tumores de los ratones del grupo tratado con histamina y radiación se caracterizaron por poseer una zona de tumor sólido con menor celularidad por campo y zonas con tabiques fibróticos. Además, se observó que tanto el índice mitótico, como la expresión de PCNA se encontraban disminuidos en los tumores de los ratones de los grupos tratados con histamina, ambos pronóstico de supervivencia.[1,3]

Por otra parte, estos estudios no revelaron la aparición de efectos tóxicos en los órganos analizados de los ratones de los grupos tratados indicando que la histamina podría ser administrada con seguridad a la concentración empleada (resultados no mostrados).

En esta línea, es importante resaltar que la histamina como dihidrocloruro (desarrollada como una formulación para administración subcutánea conocida como *Ceplene*), está siendo usada en numerosos ensayos clínicos como un adyuvante de la terapia con interleuquina 2 e interferón  $\alpha$  para el potencial tratamiento de varios tipos de cáncer como melanoma metastático, leucemia mieloide aguda y carcinoma renal. En todos los casos, la histamina fue generalmente bien tolerada y no se observaron efectos adversos inesperados o irreversibles, demostrando que puede ser administrada con seguridad.[7]

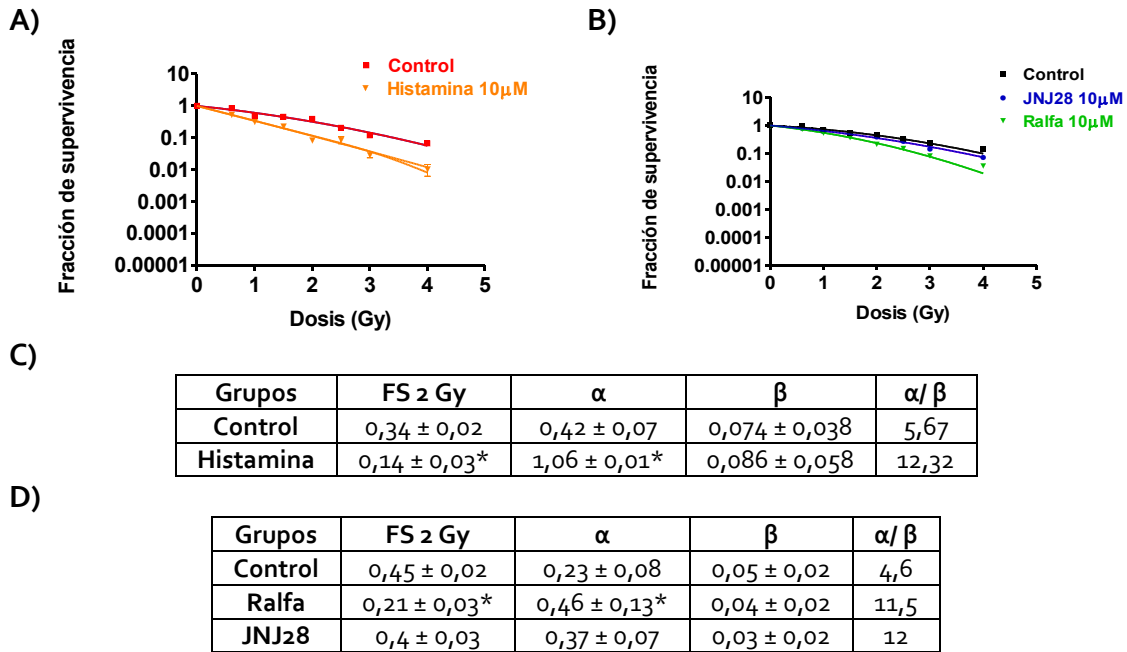
*Las observaciones experimentales apoyan la hipótesis que postula a la histamina como agente radiosensibilizador. Podemos concluir que el uso de histamina en combinación con RI in vitro, disminuye la proliferación y aumenta la apoptosis de la línea celular 1205Lu, mientras que in vivo reduce el tamaño tumoral asociado a la disminución de los niveles de proliferación celular. Mayores estudios serán necesarios para confirmar el potencial terapéutico del uso combinado de la histamina con la radiación en vías de aportar una estrategia que aumente la eficacia de la radioterapia para el tratamiento del melanoma.*



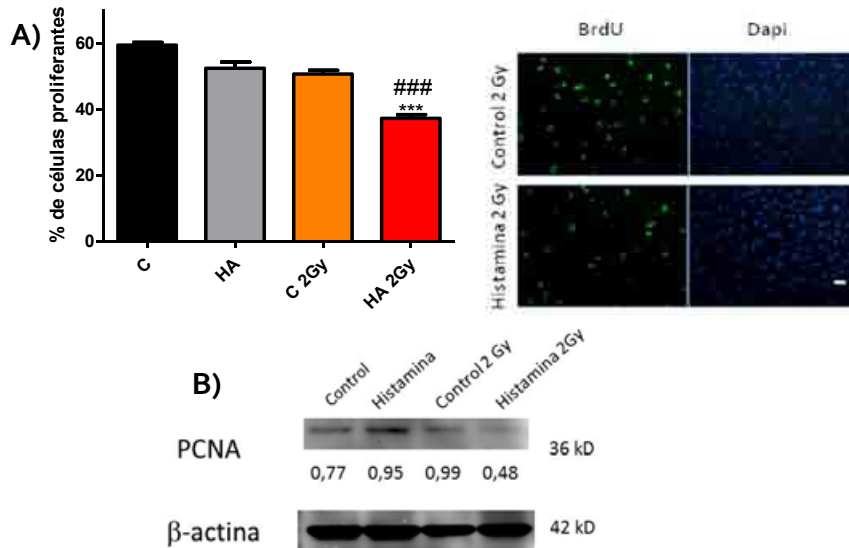
## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ben-Izhak O y col. K167 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology* 2002; 41:519–525
2. Carabajal E y col. Radioprotective potential of histamine on rat small intestine and uterus. *Eur J Histochem* 2012; 56:e48.
3. Cianfrocca and Goldstein. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004; 9(6):606-16.
4. Czubayko F y col. Melanoma angiogenesis and metastasis modulation by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:14753-14758.
5. Ferlay J y col. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10. GLOBOCAN 2008
6. Friedland PJ y col. Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiation and Environmental Biophysics*. Volume 38, Issue 1, pp 39-47.
7. Galmarini CM. Histamine dihydrochloride (subcutaneous) Maxim. *Curr Opin Investig Drugs*. 2004; 5:1298-310.5.
8. Grdina DJ y col. Radioprotectants: current status and new directions. *Oncology* 2002; 63: 2-10
9. Gewirtz DA. Autophagy as a mechanism of radiation sensitization in breast tumor cells. *Autophagy* 2007; 3:249-50.
10. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the radiologist*. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
11. Khan MK, Khan N, Almasan A, Macklis R. The evolving role of radiation therapy in the management of malignant melanoma. *Onco Targets Ther* 2011; 4:137-48.
12. Kim R, Emi M, Tanabe K. Role of apoptosis in cancer cell survival and therapeutic outcome. *Cancer Biol Ther* 2006; 5, 1429-1424.
13. Martinel Lamas DJ y col. Enhancement of ionizing radiation response by histamine in vitro and in vivo in human breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 16:1, 137-148.
14. Medina VA y col. Role of histamine H<sub>4</sub> receptor in breast cancer cell proliferation. *Front Biosci*. 2011;18:1042-1060.
15. Medina VA y col. Histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1462-71
16. Medina VA y col. Histamine protects bone marrow against cellular damage induced by ionising radiation. *Int J Radiat Biol*. 2010; 86(4):283-90.
17. Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. *Br J Pharmacol* 2010; 161(4):755-67.
18. Medina VA y col. Mechanisms underlying the radioprotective effect of histamine on small intestine. *Int J Radiat Biol* 2007; 83: 653-63.
19. Saha GP. *Radiation Biology*. En: Saha GP, editor. *Physics and radiobiology of nuclear medicine*. 2º edición. Nueva York: Springer-Verlag Inc, 2003.
20. Siegel R y col. *CA Cancer J Clin* 2012;62(4):220-41.
21. Viniegra, Paolini y Arrosi. Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud de la Nación INC - OPS 2010
22. Yang, TJ y Ho, AY. Radiation therapy in the management of breast cancer. *Surg Clin North Am* 2013; 93(2):455-71

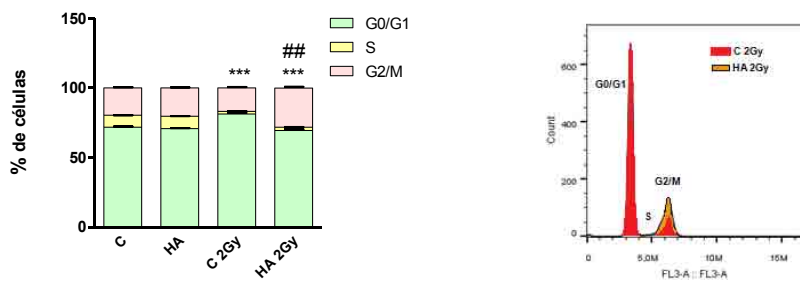
ANEXO



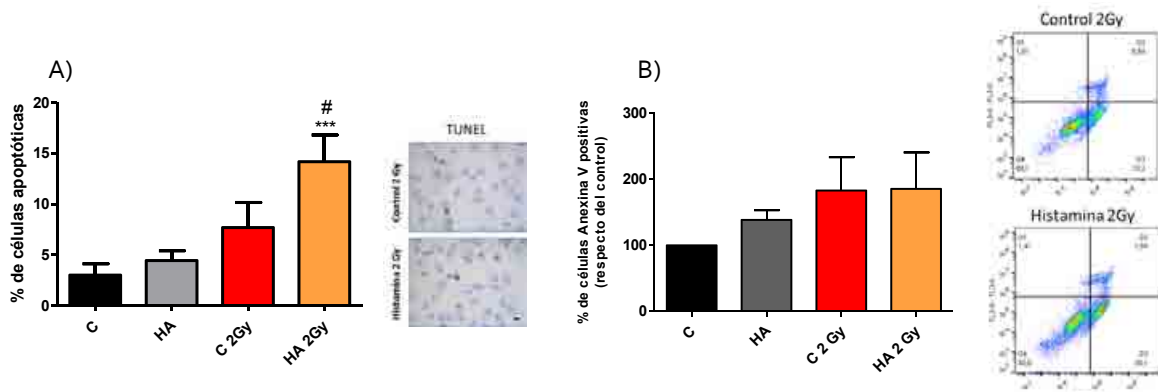
**Figura 1:** Efecto radiosensibilizador de la histamina sobre las células 1205Lu. Curvas de supervivencia para las células 1205Lu tratadas con **A)** histamina y **B)** JNJ28, agonista del receptor RH<sub>4</sub> y Ralfa, agonista del receptor RH<sub>3</sub> en combinación con RI ajustadas al modelo lineal-cuadrático [ $FS=e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ ]. **C- D) Parámetros radiobiológicos.** FS<sub>2Gy</sub>: Fracción de supervivencia tras una dosis de 2 Gy. Indica pérdida de la capacidad reproductiva de una célula frente a la radiación.  $\alpha$ : susceptibilidad del ADN a la radiación frente a lesiones letales.  $\beta$ : probabilidad de reparar daños subletales del ADN (\*P<0.05 vs. Control. Test de Student).



**Figura 2:** Efecto antiproliferativo de la histamina y la radiación ionizante en la línea celular 1205Lu. **A)** La incorporación de BrdU se evaluó por inmunocitoquímica 24 horas post-irradiación. Las barras representan la media ± ESM de tres experimentos independientes (\*\*\*P<0.001 vs. Control, ###P<0.001 vs. Control 2 Gy. ANOVA y post test de Newman-Keuls). La incorporación de BrdU se evaluó por inmunofluorescencia (verde). Los núcleos se tiñeron con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (Dapi) como contracolor (azul). Las microfotografías se tomaron a un aumento de 400x. Barra de escala= 20 μm. **B)** Expresión de PCNA por Western blot. Como control de cargase utilizó  $\beta$ -actina.



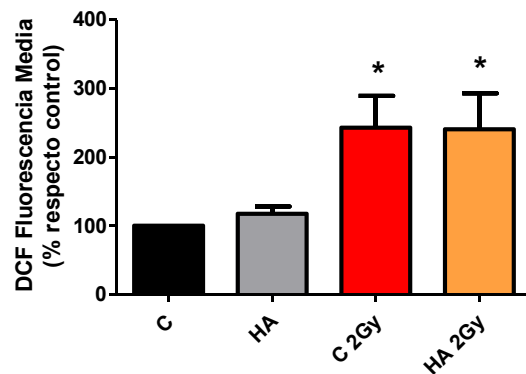
**Figura 3. Efecto de la histamina y la radiación ionizante sobre la distribución del ciclo celular de la línea 1205Lu.** El porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular se monitoreó por citometría de flujo a las 24 horas post-irradiación. Los resultados representan la media  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes (\*\* $P < 0.001$  vs. % de fase S en Control; ## $P < 0.01$  vs. % de fase G2/M en Control 2 Gy. ANOVA y post test de Newman-Keuls). Inserto: se muestra el histograma obtenido para las células no tratadas (C 2 Gy) y tratadas con histamina 10  $\mu$ M, 24 horas post-irradiación (HA 2 Gy).

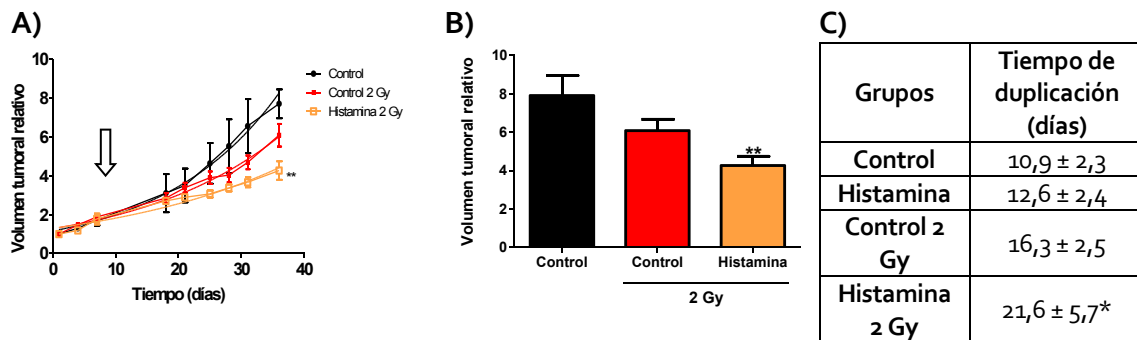


**Figura 4. Efecto de la radiación ionizante combinada con histamina sobre la apoptosis celular.** A) Se evaluó la apoptosis celular mediante el ensayo de TUNEL en células 1205Lu irradiadas y no irradiadas previamente tratadas con histamina (HA, 10  $\mu$ M) o no tratadas (Control, C). Las barras representan el valor medio  $\pm$  ESM de tres experimentos independientes (\*\* $P < 0.001$  vs. Control; # $P < 0.05$  vs. Control 2 Gy. ANOVA y post test de Newman-Keuls). Se muestran fotografías representativas a un aumento de 630x. Barra de escala= 20  $\mu$ m. B) Se evaluó la apoptosis celular en células irradiadas y no irradiadas previamente tratadas con histamina (HA, 10  $\mu$ M) o no tratadas (Control, C) mediante el ensayo de Anexina V por citometría de flujo. Las barras representan el valor medio  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes. Se observa un aumento de muerte celular aunque no resultó significativo. Se muestran los gráficos de puntos, las células Anexina V positivas son aquellas de los cuadrantes derechos (superior e inferior).

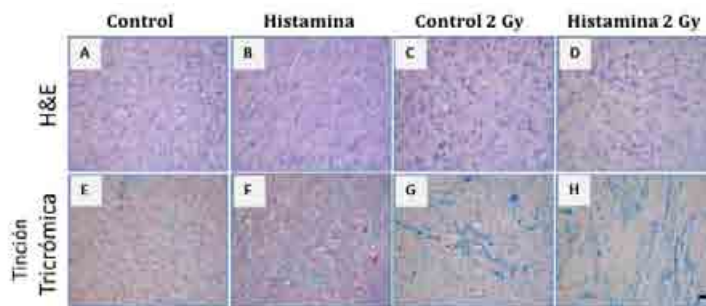
**Figura 5: Determinación de los niveles de ROS.**

Los niveles de ROS se evaluaron por citometría de flujo mediante la tinción con el colorante fluorescente DCFH-DA en células irradiadas y no irradiadas previamente tratadas con histamina (HA, 10  $\mu$ M) o en células no tratadas (Control, C). Las barras representan el valor medio  $\pm$  ESM de cuatro experimentos independientes (\* $P < 0.05$  vs. Control. ANOVA y post test de Newman-Keuls).



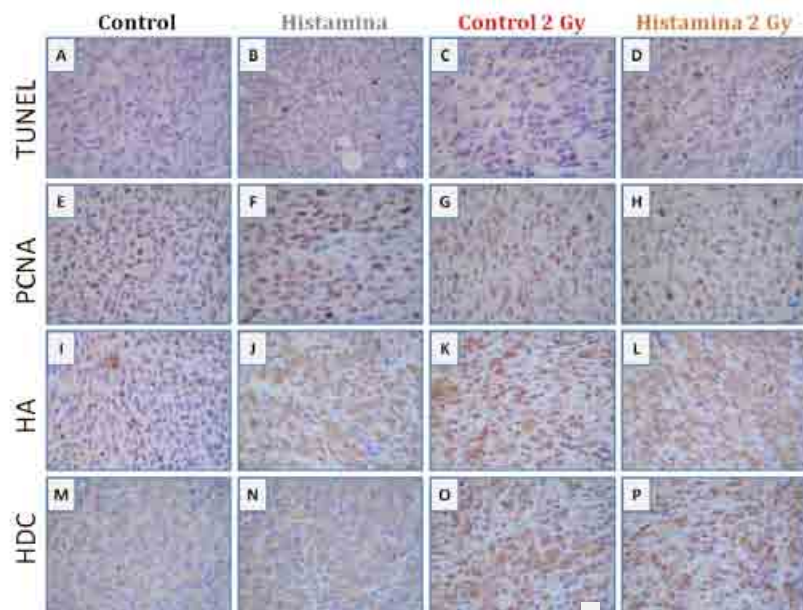


**Figura 6: Efecto antitumoral de la histamina sobre los tumores humanos 1205Lu desarrollados en ratones *nude*.** **A)** El tamaño tumoral se determinó día por medio y con los datos se realizaron curvas de regresión no lineal para determinar el crecimiento exponencial del tumor. La flecha indica el inicio de la terapia radiante (\*\* $P < 0.01$  vs. Control, ANOVA y post test de Newman Keuls). **B)** Los ratones del grupo control mostraron tumores con mayor volumen al final del experimento (36 días) (\*\* $P < 0.01$  vs. Control, ANOVA y post test Newman-Keuls). **C)** Tiempo de duplicación tumoral. Se muestran los tiempos promedio de duplicación exponencial del tumor  $\pm$  DS (\* $P < 0.05$  vs. Control, ANOVA y post test de Newman-Keuls).



**Figura 7: Análisis histológico de los tumores 1205Lu desarrollados en ratones *nude*.** **A-D)** Tinción con hematoxilina-eosina (H&E). **E-H)** Tinción tricrómica de Masson. Fotografías representativas tomadas a un aumento de 630x. Barras de escala= 20  $\mu$ m.

**Figura 8: Estudio de marcadores de proliferación y apoptosis en tumores provenientes de células 1205Lu por inmunohistoquímica.** Los tumores tratados con histamina y radiación exhibieron alto porcentaje de células apoptóticas determinadas por el ensayo de TUNEL (A-B) y niveles bajos del antígeno nuclear de células proliferantes (E-H), también se observaron niveles intracelulares elevados de histamina (HA, I-L) y de la enzima histidina decarboxilasa (HDC, M-P). Fotografías representativas tomadas a un aumento de



630x. Barra de escala= 20  $\mu$ m.

Grupos	Índice Mitótico
Control	2,4 $\pm$ 0,5
Histamina	1,4 $\pm$ 0,5
Control 2 Gy	2,0 $\pm$ 1,0
Histamina 2 Gy	1,2 $\pm$ 0,8*

**Tabla 1: Evaluación del índice mitótico.** Se muestra el número promedio  $\pm$  DS de células con los cromosomas visibles mediante análisis de 15 campos al azar a un aumento de 630x (\*P<0.05 vs. Control. ANOVA y post test de Newman Keuls).

# ABORDAJE PROTEÓMICO Y BIOINFORMÁTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

## ABORDAJE BIOINFORMÁTICO DEL INTERACTOMA DE HEMOXIGENASA-1 (HO-1)

**Emiliano Germán Ortiz**

Laboratorio de Inflamación y Cáncer, IQUIBICEN-CONICET.  
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad de Buenos Aires.

**Directora:** Geraldine Gueron

### RESUMEN

La proteómica representa una importante herramienta para la identificación de nuevos blancos moleculares para el diseño de terapias contra el cáncer de próstata (PCa). Se realizó un estudio proteómico y bioinformático basado en espectrometría de masa para construir el interactoma de Hemoxigenasa 1 (HO-1) en PCa, dado el fuerte efecto antitumoral de HO-1 en PCa. HO-1 y sus interactores pueden reprogramar a la célula del PCa modificando el microambiente tumoral y favoreciendo el establecimiento de un fenotipo menos agresivo. El análisis de ontología génica y de red de interacciones proteicas de las proteínas interactoras de HO-1 reveló que el 71% del interactoma de HO-1 se conforma de proteínas nucleares. Estos resultados imponen su función regulatoria en el compartimento nuclear de las células, más allá del rol en la degradación del grupo hemo. Interesantemente en la categoría de procesamiento del ARN, HO-1 interactúa con TRIM28, reportado de desestabilizar a p53 en asociación con miembros de la familia de antígenos testiculares de cáncer MAGE (antígenos de melanoma). Nuestros resultados muestran que MAGE A11 está presente en células de PCa y que la inducción de HO-1 disminuye la expresión de la proteína MAGE A11, favoreciendo un fenotipo menos agresivo. Nuestro análisis bioinformático de genes regulados y proteínas interactoras de HO-1 (Oncomine), reveló que los genes estudiados se sitúan en el percentil 15 de los genes con más alta o baja expresión en el PCa, reflejando su relevancia como potenciales blancos terapéuticos en el PCa.

### ABSTRACT

Proteomics represents an important tool for the identification of new molecular targets for prostate cancer (PCa) tailored therapy. An in-depth mass spectrometry-based proteomics and bioinformatics study was performed to build the Heme-oxygenase 1 (HO-1) interactome in PCa, given the strong anti-tumoral effect of HO-1 in PCa. HO-1 and its interactors reprogram PCa cells and modify the tumoral microenvironment, favoring a less aggressive tumor phenotype. Protein interaction network and gene ontology (GO) analyses of HO-1 interacting proteins revealed that 71% of the HO-1 interactome is conformed of nuclear proteins. This result enforces its regulatory function in the nuclear compartment of cells, a role beyond heme degradation. Interestingly, within RNA processing categories HO-1 interacts with TRIM28, reported to destabilize p53 in association with members of the MAGE (melanoma antigen) family of cancer testis antigens. Our results show that MAGE A11 is present in PCa cells and that HO-1 induction decreases MAGE A11 protein expression, favoring a less aggressive phenotype. Our bioinformatics screening of HO-1 interacting proteins and regulated genes (Oncomine), revealed that the genes studied lie within the 15 percent of most high or low-expressed genes in PCa, showcasing their relevance as potential targets for therapeutic intervention in prostate carcinogenesis.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (PCa) es una de las principales causas de muerte en los hombres occidentales [1]. La incidencia aumenta con la edad y representa uno de los factores de riesgo más

importantes. El PCa localizado puede curarse en la mayoría de los casos, pero cuando la enfermedad escapa los confines de la glándula, la perspectiva de cura decrece drásticamente. La ablación de andrógenos es la terapia más efectiva para frenar el desarrollo del PCa, pero en algunos casos la enfermedad se convierte en resistente a la castración (CRPC) [9]. La incidencia del PCa refleja una tasa más alta en los países desarrollados, debido a la mayor frecuencia de biopsias y al análisis rutinario del PSA y no a una diferencia real en la aparición de casos [6]. Se estima que solo el 8% del PCa se presentará con síntomas y signos clínicos, y la mayoría de los casos con enfermedad localizada llegará hasta los 5 años de supervivencia. Por el contrario, en la enfermedad metastásica la tasa de supervivencia caerá un 30% [10,22,24]. La divergencia entre las tasas de incidencia y mortalidad impone el desafío de poder distinguir la enfermedad indolente de la enfermedad agresiva con el objetivo de estratificar y tratar adecuadamente a los pacientes con enfermedad avanzada. Los factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo del PCa, y evidencias crecientes sugieren la participación de la inflamación crónica en la progresión de la enfermedad. La presencia de mediadores inflamatorios en el microambiente tumoral, nos hacen preguntar si los eventos genéticos que participan en el desarrollo del cáncer y su progresión son responsables del medio inflamatorio dentro y alrededor del tumor.

El receptor de andrógenos (AR) es un factor de transcripción que posee un rol crítico en el desarrollo y la progresión del PCa. Los aumentos en los niveles de mRNA y proteína del receptor son ambos necesarios y suficientes para convertir un PCa hormona-dependiente a un estado refractario, y este proceso depende de la funcionalidad del dominio de unión al ligando del AR [2].

El AR se encuentra en el citoplasma unido a las proteínas HSP90, HSP70, HSP56 y HSP23 en una conformación que facilita la unión con el andrógeno [19]. Esta unión resulta en la disociación de las HSP causando la dimerización del AR, su fosforilación de tirosina quinasa y translocación al núcleo [4]. Una vez dentro del núcleo, el AR se une a elementos respondedores de andrógenos (ARE) localizados en los promotores de los genes blanco, reclutando proteínas co-reguladoras y la formación del complejo de transcripción activo [23]. Entre los genes regulados por el AR se encuentra el PSA. Los andrógenos también pueden señalar a través de su acción en el citoplasma mediada por la cascada de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) [14].

Los co-reguladores (co-activadores y co-represores) emergen como el hilo conductor para la acción de todos los receptores nucleares. La potencia y selectividad de la subreacción de transcripción reside en los co-reguladores, los cuales son críticamente importantes para la función génica tejido-específica. Cada tejido tiene su huella cuantitativa ("*quantitative finger print*") de co-reguladores basada en las concentraciones de dichas moléculas. Cuando la concentración celular de un co-regulador se encuentra alterada, la disfunción génica subsecuente lleva a un fenotipo patológico [15].

La evaluación de los niveles y estado de co-reguladores está siendo aplicada al diagnóstico y prognosis de cánceres humanos [18]. La ventaja de identificar co-reguladores y utilizarlos como nueva terapia proviene del hecho de que al alterar la expresión de dichos co-reguladores se modifica simultáneamente una cascada de genes río abajo de los mismos, los cuales en conjunto son responsables del crecimiento aberrante de la célula tumoral. De esta forma es claro el potencial que los co-reguladores tienen en el campo de la medicina y la farmacología como una nueva alternativa terapéutica para el cáncer.

La isoforma inducible de la hemo oxigenasa (HO-1) confiere citoprotección contra el estrés oxidativo y la inflamación en varios modelos animales. Esta proteína ejerce funciones metabólicas vitales manteniendo la homeostasis celular. Varias moléculas de señalización están implicadas en la citoprotección conferida por HO-1, incluyendo la vía de MAPK, NFκB, PI3K/AKT y otros [17]. HO-1 es reconocida como una proteína integral de membrana del retículo endoplásmico liso; sin embargo, estudios recientes la han identificado en otros compartimentos subcelulares [3, 11, 12, 13, 21], incluyendo el núcleo [20, 12]. Se ha sugerido que HO-1 sufre degradación proteolítica en su extremo carboxi-terminal hidrofóbico, lo que facilitaría su ingreso al núcleo [12]. Se ha propuesto que HO-1 posee en el núcleo una función no catalítica canónica participando en la regulación de la actividad de factores de transcripción nucleares e incluso regulando su propia expresión. Previamente se documentó que HO-1 se expresa en carcinomas primarios prostáticos humanos y posee localización nuclear y citoplasmática [20]. En líneas celulares de PCa se comprobó que la inducción farmacológica y genética de su expresión induce su localización nuclear e inhibe la proliferación, migración e invasión y modula negativamente la expresión de genes pro-inflamatorios y pro-angiogénicos [8]. Adicionalmente, HO-1

retarda el crecimiento de tumores *in vivo* y disminuye la angiogénesis. Comprobamos que HO-1 reprime la vía de NF- $\kappa$ B e inhibe la señalización de STAT3, interrumpiendo su asociación con el receptor de andrógenos (AR) y en consecuencia la actividad transcripcional de AR [5, 7, 8]. Estos datos, sugieren claramente que HO-1 cumple una función celular, más allá de la degradación del hemo.

En este trabajo se utilizó un **abordaje proteómico y bioinformático para la construcción del interactoma de HO-1 (proteínas asociadas a HO-1), y evaluamos la relevancia clínica de dichas proteínas en los distintos estadios de la enfermedad.**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Cultivo celular y clonado.** Para identificar las proteínas que están interactuando con HO-1 se llevó a cabo un GST-pull down. Para purificar los complejos proteicos asociados a HO-1, se subclonó HO-1 en un vector de expresión eucariota (pEBG) fusionado por su extremo amino terminal a un tag de GST, para luego purificarla por columna de afinidad (pull down). Con esta construcción, se transfectó la línea celular PC3. Las células transfectadas fueron luego cultivadas en presencia/ausencia de agentes inflamatorios y oxidantes (IL6, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los extractos de las células que sobre-expresaron HO-1GST (PC3HO-1GST) y los de células transfectadas con el vector vacío (control) se prepararon bajo condiciones que minimizaron la disrupción de las interacciones (baja concentración de sales y detergentes). La metodología pull-down permitió purificar a las proteínas de interés evitando la contaminación con IG que usualmente se observa con las técnicas de inmunoprecipitación.

**Pull-down de HO-1.** Se realizaron macro purificaciones para obtener suficiente material y así optimizar la detección de los péptidos por espectrometría de masas. Para purificar HO-1 y sus interactores, los extractos celulares fueron incubados con esferas de glutatión Sepharosa 4B, y luego las fracciones eluidas con las proteínas que co-precipitaron junto a HO-1 fueron sembradas en geles SDS-PAGE y posteriormente teñidas con Coomassie coloidal. Las bandas fueron escindidas del gel, y las proteínas fueron reducidas con DTT, alquiladas con iodoacetamida y digeridas con proteasas sitio-específicas (ej. tripsina). Para el análisis por MALDI-TOF/TOF, los péptidos fueron desalados y concentrados con una resina C18 (Zip-Tips. Waters Cooperation).

**Análisis por espectrometría de masa.** Las proteínas asociadas a HO-1 se analizaron por MALDI-TOF/TOF (Bruker Ultraflex II) y tecnología Orbitrap (Thermo scientific Q Exactive). Se realizó la fragmentación de varios péptidos para verificar las secuencias aminoácidas y para determinar las modificaciones post-traduccionales. Los espectros MALDI MS y MSMS se analizaron con Flex Analysis y Biotoools Software (Bruker Daltonics). Las listas de picos obtenidas fueron procesadas y comparadas con las bases de NCBI utilizando Protein Prospector o Mascot Software. Las búsquedas se realizaron contra el genoma humano, permitiendo una tolerancia de 200ppm y una tolerancia de fragmento de 0,7 Da. Se contemplaron las alteraciones de masa producidas por las modificaciones esperadas como la carbamidometilación, la oxidación de metionina y la acetilación N-terminal.

**Consideraciones estadísticas.** Las búsquedas por Mascot fueron realizadas con una tolerancia de 150 ppm para la identificación de péptidos por MS y de 0.7 Da para los espectros MS/MS. También se consideró indispensable que los "expectation values" obtenidos para los péptidos fueran menores a 0,05 y que la calidad de los espectros pertenecientes a esos péptidos fuera buena, con series "y" casi completas y serie "b" presente, sin una alta cantidad de picos intensos sin asignar. También se le dio importancia al hecho de que las masas teóricas de las proteínas tuvieran coherencia con la altura de la banda del gel de la cual provino esa muestra.

**Análisis Bioinformático del interactoma de HO-1.** Una vez que la lista de proteínas que interactúan con HO-1 fue verificada, se utilizó esta información en combinación con la información de meta-data disponible en bases de datos públicas (Biogrid, DAVID, HRPD, IntAct, Human protein atlas, Peptide Atlas, UniprotGene Expression Omnibus (GEO), PFAM, Gene Ontology (GO) y KEGG para analizar el **interactoma de HO-1**. La plataforma GeneMania se utilizó para la visualización y el análisis del interactoma.



**Data Mining:** Se utilizaron los data sets de expresión génica para tejidos prostáticos humanos disponibles en la base de datos pública Oncomine y TCGA para analizar la expresión de moléculas interactoras de HO-1 y su relevancia en la clínica.

## RESULTADOS

### **Construcción del interactoma de HO-1 en la línea celular PC3 de cáncer de próstata**

La evidencia sugiere que HO-1 puede tener un rol regulatorio independiente de su actividad catalítica. Cuando HO-1 transloca al núcleo de las células de PCa, ésta podría requerir la asociación de otros factores de transcripción o co-reguladores de la transcripción para ejercer su función reguladora, dado que esta no posee motivos de unión al ADN. Para el análisis de proteínas asociadas a HO-1 que pudieran participar en la co-regulación de la transcripción génica, se utilizó un abordaje proteómico. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de *pull-down* con GST a partir de lisados de células PC3 transfectadas de manera transiente con GSTHO-1 o el vector vacío GST, y tratadas con IL-6 (10 ng/ $\mu$ l, 24 h). IL-6 es conocido por ser el principal mediador de inflamación, normalmente elevado en pacientes con cáncer de próstata. El tratamiento con IL-6 plantea un escenario similar a las condiciones inflamatorias presentes en el PCa, permitiendo identificar posibles interactores de HO-1, dado que HO-1 disminuye el daño oxidativo e inflamatorio. Los complejos proteicos obtenidos fueron analizados por espectrometría de masa. Se obtuvieron 46 proteínas diferenciales, interactoras de HO-1, definiendo así el interactoma de HO-1. Para este set de proteínas se realizó un análisis de red de interacciones. (Fig. 1A) y un análisis de ontología génica (Fig. 1B y C). Los resultados revelaron un enriquecimiento de proteínas asociadas a varias subcategorías relacionadas entre las cuales se destacan, proteínas relacionadas con el proceso de transcripción e interacción con el DNA (rojo), proteínas relacionadas al procesamiento post-transcripcional del RNA (azul), proteínas relacionadas al transporte en el citoesqueleto actina (amarillo) y otras proteínas (verde). La detección de proteínas nucleares asociadas a HO-1, principalmente relacionadas con los procesos de transcripción y procesamiento del RNA sugieren que el interactoma de HO-1 funciona como una maquinaria transcripcional y/o de procesamiento del RNA, que sería responsable de la modulación de los genes efectores de HO-1.

### **Sub categoría regulación del metabolismo del ARN.**

Realizamos análisis de redes de interacciones entre HO-1 y las proteínas diferencialmente asociadas a ella que pertenecen a esta categoría. Como resultado, se observó una asociación entre HO-1 y TRIM28, además se observó que esta última mantiene interacciones físicas con tres miembros de la familia de antígenos testiculares de cáncer MAGE (Fig 2). Dado que un miembro de la sub familia MAGE-I ha sido reportado de interactuar con el receptor de andrógenos (AR), se construyó una red secundaria, incluyendo a las proteínas MAGE y al AR. Se hallaron interacciones entre el AR y MAGEA-11 (Fig 3A). Por último, se realizó una red terciaria, incluyendo a los co-activadores de receptores nucleares (NCoA), proteínas asociadas al AR y a MAGEA-11, y se halló que estos co-activadores del AR funcionan como un enlace molecular entre MAGEA-11 y otras proteínas de la regulación del metabolismo del RNA (Fig 3B). Luego, se evaluó la expresión de la proteína MAGEA-11 en la línea celular PC3. Se comprobó que MAGEA-11 se expresa en células de PCa, y la inducción farmacológica de HO-1 disminuyó la expresión de esta proteína co-activadora del AR (Fig.4), favoreciendo un fenotipo menos agresivo.

### **Análisis y selección en Oncomine de los genes efectores y las proteínas interactoras de HO-1.**

Se comenzó el análisis de los genes efectores y las moléculas asociadas a HO-1, utilizando la base de datos de perfiles de cáncer Oncomine. Esta herramienta permitió, a través de análisis pre computarizados, identificar si estos genes tienen una alta significancia estadística para sobre expresión o sub expresión comparando la próstata normal vs. adenocarcinoma de próstata y también a través de los diferentes grados de Gleason; validando así la relación entre la transcripción y la enfermedad. Las proteínas de interés fueron: (HO-1), metalopeptidasa 9 (MMP9), anexina 2 (ANXA2), fetuina A (AHSG) y zinc finger protein 589 (ZNF589). El perfil de expresión de HO-1 en los arrays de expresión génica muestra que esta proteína está sobreexpresada en adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal (p-value 0,01). A cada gen se le asigna un "gene Rank" (un valor para su expresión dentro de dicho array directamente asociado a una posición dentro del ranking de expresión de dicho array). A su vez, se establece un "median rank", que es la mediana de dicho ranking génico para el gen de interés

comparando los distintos arrays. HO-1 presenta un median Rank de 2673 y lo posiciona entre 10 % de los genes más sobreexpresados en adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal. (Fig. 5B) Sin embargo, el perfil de expresión según el *Human Protein Atlas* el nivel proteico de HO-1 no muestra diferencias por análisis de IHC entre adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal (Fig. 5D).

Otro target de interés fue MMP9. Esta proteína está asociada a un peor pronóstico y al comportamiento metastásico en PCa y es un blanco de HO-1 [19]. Otro target es una zinc finger protein (ZFP) escasamente caracterizada, conocida por su rol en la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas. A causa de que las ZNF son conocidas por correlacionarse con procesos antioxidantes, esta nueva interacción aquí reportada podría estar implicada en el control del estrés oxidativo.

Utilizando una comparación de seis (6) y tres (3) análisis de MMP9 y ZNF589 respectivamente, de próstata normal vs. Adenocarcinoma, se observó que ambos genes estaban sobre expresados dentro de las mismas comparaciones y tenían una median Rank de 1528 y 871 (Fig. 6B y 7B) respectivamente. Ambos genes se encontraron entre el 15 % de los genes más sobreexpresados en el adenocarcinoma. Sin embargo, según el *Human Protein Atlas* el nivel proteico de MMP9 no muestra diferencias por análisis de IHC entre adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal (Fig. 6D).

También se analizó la expresión de AHSG y ANXA2. AHSG está implicada en la adhesión y el crecimiento celular. La ANXA2 juega un rol significativo en la adhesión celular interactuando con AHSG. Las anexinas tienen una unión preferencial con la fetuina de un modo dependiente de Calcio. ANXA2 juega un rol significativo en la adhesión de las células tumorales a fetuina A. La comparación de catorce (14) y trece (13) análisis de ANXA2 y AHSG para próstata normal vs. Adenocarcinoma mostró que ambos estaban desregulados dentro de las mismas comparaciones y tenían una median Rank de 133 y 1758 respectivamente (Fig. 8B y 9B) Ambos genes se encontraron entre el 3 % de los más sub expresados en el adenocarcinoma. ANXA2 estaba entre los 13 genes más subexpresados con un P-value de 0,003 (Fig. 8B)

## DISCUSIÓN

La integración de la proteómica junto con las nuevas herramientas bioinformáticas provee resultados muy promisorios que pueden efectivamente trasladarse a la clínica. El objetivo del campo de la proteómica es permitir la caracterización del flujo de información a través de caminos proteicos que interconectan el microambiente extracelular con el control de la transcripción génica. La aplicación clínica de este campo comprende el uso de esta tecnología para la detección temprana, el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos y finalmente la terapia personalizada. Por lo tanto, la aplicación de la proteómica para evaluar el tejido tumoral prostático puede ayudar en la búsqueda de biomarcadores nuevos para la enfermedad. Por otro lado, la bioinformática cambia la perspectiva de la proteómica, creando una plataforma adecuada para el almacenamiento de datos, el análisis y su posterior integración. El análisis funcional de los datos obtenidos por estudios proteómicos se divide en dos tipos: el primero consiste en evaluar las proteínas definidas como entidades (análisis ontológico) y el segundo consiste en estudiar las interacciones proteína-proteína. El primer tipo de análisis permite identificar cómo los diferentes caminos, procesos o biomarcadores de la enfermedad están representados en los perfiles proteómicos (listas, *hits*, etc) [3]. El segundo tipo de análisis evalúa la funcionalidad de una proteína representada como las interacciones con las proteínas en la lista de interés. La conjetura fundamental recae en que la conectividad relativa de una proteína refleja su importancia funcional para el fenotipo [11]. El escrutinio bioinformático de los datos proteicos permite un análisis minucioso de las muestras (algoritmos para determinar los valores (*scores*) y la significancia de los *hits* obtenidos), pero también permite la depuración de la base de datos para la búsqueda automatizada de la identificación de proteínas y más aún, para el análisis ontológico [12]. En este proyecto empleamos un abordaje proteómico y bioinformático para la identificación de proteínas que conforman el proteoma de HO-1 en PCa, se ha sugerido que HO-1 sufre degradación proteolítica en su extremo carboxi-terminal hidrofóbico, lo que facilitaría su ingreso al núcleo. En este trabajo, se identificaron 46 proteínas asociadas a HO-1, de las cuales, 20 de ellas son proteínas nucleares. El análisis ontológico de todas las proteínas asociadas a HO-1 reveló que la mayoría de ellas están involucradas a procesos vinculados al ADN y la cromatina. Esto podría concordar con la propuesta de

que HO-1 en el núcleo posee una función no catalítica canónica participando en la regulación de la actividad de factores de transcripción nucleares e incluso regulando su propia expresión.

Con respecto a la categoría de procesamiento del RNA. Se realizó un análisis de redes de interacciones entre HO-1 y las proteínas diferencialmente asociadas a ella que pertenecen a esta categoría. Los resultados muestran una asociación entre HO-1 y TRIM28, un modulador de las vías de señalización durante la carcinogénesis también reportado de ubiquitar y desestabilizar a la proteína p53 en asociación con miembros de la familia de antígenos testiculares de cáncer MAGE (antígenos de melanoma). La familia MAGE está dividida en dos sub familias (tipo-I y -II). Mientras que las proteínas de la sub familia MAGE-II se encuentran expresadas constitutivamente en células somáticas, los miembros de la subfamilia MAGE-I están expresados diferencialmente en células tumorales, lo que los convierte en interesantes target terapéuticos y potenciales marcadores diagnóstico y pronóstico del cáncer. Comprobamos que MAGEA-11 se expresa en células de PCa, y la inducción farmacológica de HO-1 disminuyó la expresión de esta proteína co-activadora del AR, favoreciendo un fenotipo menos agresivo.

Adicionalmente, se realizó un análisis bioinformático de los genes efectores y las proteínas interactoras de HO-1 utilizando la plataforma Oncomine. Las proteínas de interés fueron: (HO-1), metalopeptidasa 9 (MMP9), anexina 2 (ANXA2), fetuina A (AHSG) y zinc finger protein 859 (ZNF589). La selección de este primer set de proteínas analizadas se basó en los procesos biológicos a los que se las relaciona. Como se ha mencionado anteriormente MMP9 es una metalopeptidasa de matriz extracelular asociada al comportamiento metastásico en PCa y su presencia se asocia a un peor pronóstico para los pacientes. En el caso del factor ZNF589, si bien no hay una caracterización detallada de éste, se sabe que pertenece a una familia de proteínas conocidas por ejercer un rol antioxidante frente a procesos de estrés oxidativo, los cuales son una firma del microambiente tumoral. Por otro lado AHSG es una de las principales proteínas del plasma con 63-kDa que compone aproximadamente el 45% de las glicoproteínas no colágenas sintetizadas por el hígado y secretadas en el suero. Entre las funciones fisiológicas que han sido asignadas a fetuina A está la de inhibición de la calcificación ectópica y remodelación de hueso. Muchos grupos han reportado la presencia de sitios de unión de AHSG sobre las células tumorales, y proponen que la habilidad de AHSG para interactuar con un número de receptores celulares clave y factores de crecimiento sugiere que puede promover o atenuar las vías de señalización del crecimiento. Las células tumorales metastásicas pueden tener una preferencia por AHSG como una plataforma de adhesión y crecimiento. Se ha reportado que fetuina A está concentrada en la matriz extracelular, y podría ser una de las razones por la que este órgano es considerado un "buen suelo" para el crecimiento del tumor prostático. Recientemente se ha mostrado que líneas celulares metastásicas de cáncer de próstata y muestras de metástasis de hueso exhibieron una fuerte expresión de fetuina [16], y el suero tiene una reactividad inmune a fetuina A con un concomitante desarrollo de la enfermedad metastásica resistente a la castración en una larga cohorte de pacientes de cáncer de próstata; ANXA2 juega un rol significativo en la adhesión de las células tumorales a fetuina A. De todas las proteínas de la superficie celular en estas células, las anexinas tienen una interacción de unión preferencial con la fetuina inmovilizada de un modo dependiente del calcio. ANXA2 está expresada sobre las superficies extracelular de la membrana de las células de próstata. El análisis de estas proteínas reveló que HO-1, MMP9 y ZNF589 están sobre expresados en Adenocarcinoma de próstata Vs. Próstata normal y ANXA2 y AHSG están disminuidos y que tanto los genes sobre o sub expresados se encuentran en el percentil 15 o menor, de los genes más consistentemente expresados, reflejando su relevancia como potenciales blancos terapéuticos en la carcinogénesis prostática

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society (2012)
2. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, et al. (2004). *Nat Med* 10: 33-9.
3. Converso DP, Taille C, Carreras MC, Jaitovich A, Poderoso JJ, Boczkowski J (2006). *FASEB J* 20: 1236-8.
4. Dehm SM, Tindall DJ (2005). *Expert Rev Anticancer Ther* 5: 63-74
5. Elguero B., Gueron G., Giudice J., et al. (2012). *Neoplasia*, 14(11): 1043–1056
6. Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., et al. (2010). *Int J Cancer*, 127: 2893–2917
7. Ferrando M., Gueron G., Elguero B., Giudice J., et al. (2011). *Angiogenesis*, 14: 467-479
8. Gueron G., De Siervi A., Ferrando M., Salierno M., et al. (2009). *Mol Cancer Res*, 7: 1745-1755.
9. Gueron G., De Siervi A., Vazquez E., Prostate Cancer and Prostatic Diseases (2012) 15, 213–221.
10. Jemal A., Siegel R., Xu J. and Ward E. (2010). *CA Cancer J Clin*, 60: 277–300.
11. Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW, Choi AM (2004). *FASEB J* 18: 1080-9.
12. Lin Q, Weis S, Yang G, Weng YH, Helston R, Rish K, et al. PA (2007). *J Biol Chem* 282: 20621-33.
13. Lin QS, Weis S, Yang G, Zhuang T, Abate A, Dennery PA (2008). *Free Radic Biol Med* 44: 847-55.
14. Lobenhofer EK, Bennett L, Cable PL, Li L, Bushel PR, Afshari CA (2002). *Mol Endocrinol* 16: 1215-29.
15. Lonard DM, O'Malley B W (2007). *Mol Cell* 27: 691-700
16. Mintz P, Rietz A, Cardó-Vilab M, Ozawa M. et al. (2015) Proc. Natl Acad. Sci. USA
17. Morse D, Lin L, Choi AM, Ryter SW (2009). *Free Radic Biol Med* 47: 1-12.
18. O'Malley BW, Kumar R (2009). *Cancer Res* 69: 8217-22
19. Pratt WB, Toft DO (1997). *Endocr Rev* 18: 306-60.
20. Sacca P., Meiss R., Casas G., Mazza O., et al. (2007). *Br J Cancer*, 97: 1683-1689.
21. Slebos DJ, Ryter SW, van der Toorn M, Liu F, Guo F, Baty CJ, et al. (2007). *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 409-17.
22. Stamey T.A., Freiha F.S., McNeal J.E., Redwine E.A., et al. (1993). *Cancer*, 71: 933–938.
23. Shang Y, Myers M, Brown M (2002). *Mol Cell* 9: 601-10
24. Thompson I.M., Pauler D.K., Goodman P.J., Tangen C.M., et al. (2004). *N Engl J Med*, 350: 2239–2246.

ANEXO

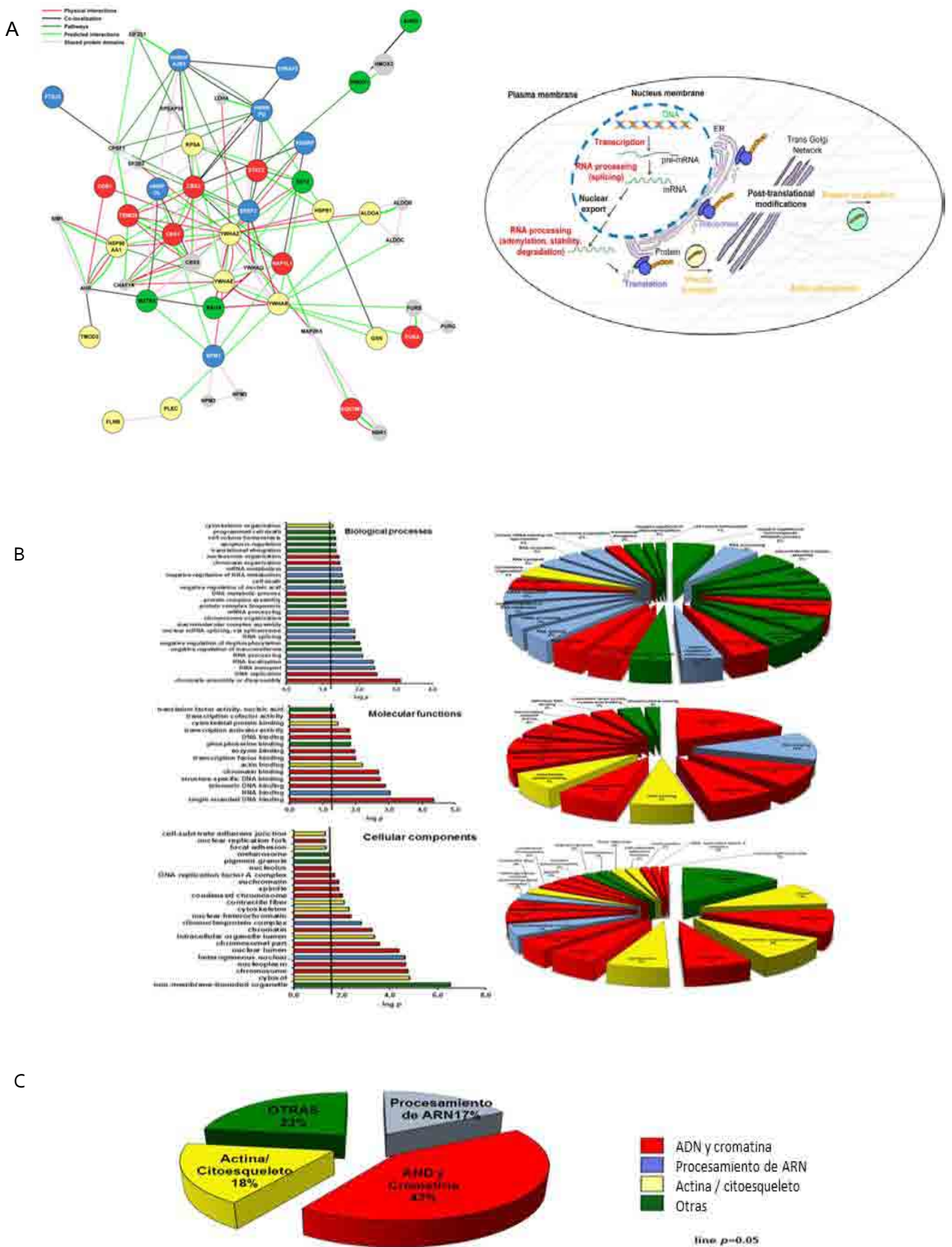


Figura 1





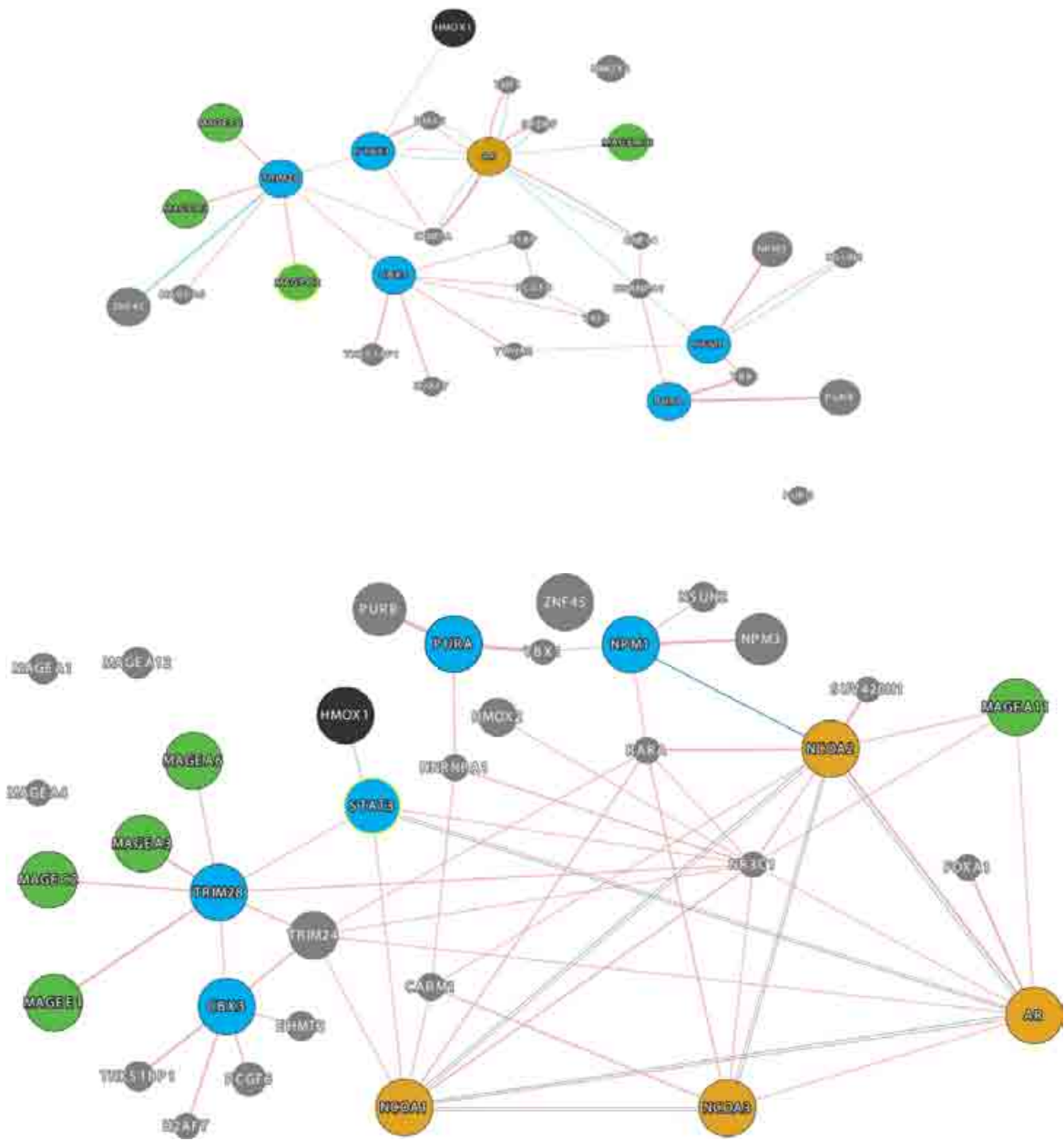


Figura 3

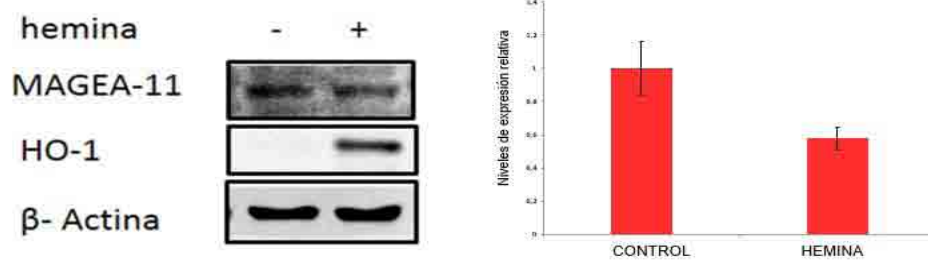


Figura 4

# Análisis de la expresión de HMOX1 en Adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal

## Lista de trabajos mostrando sobre expresión de HMOX1

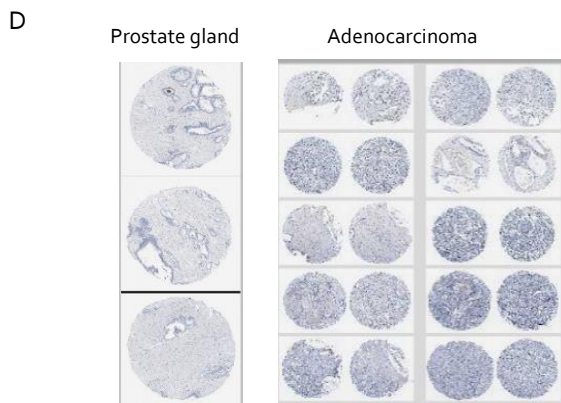
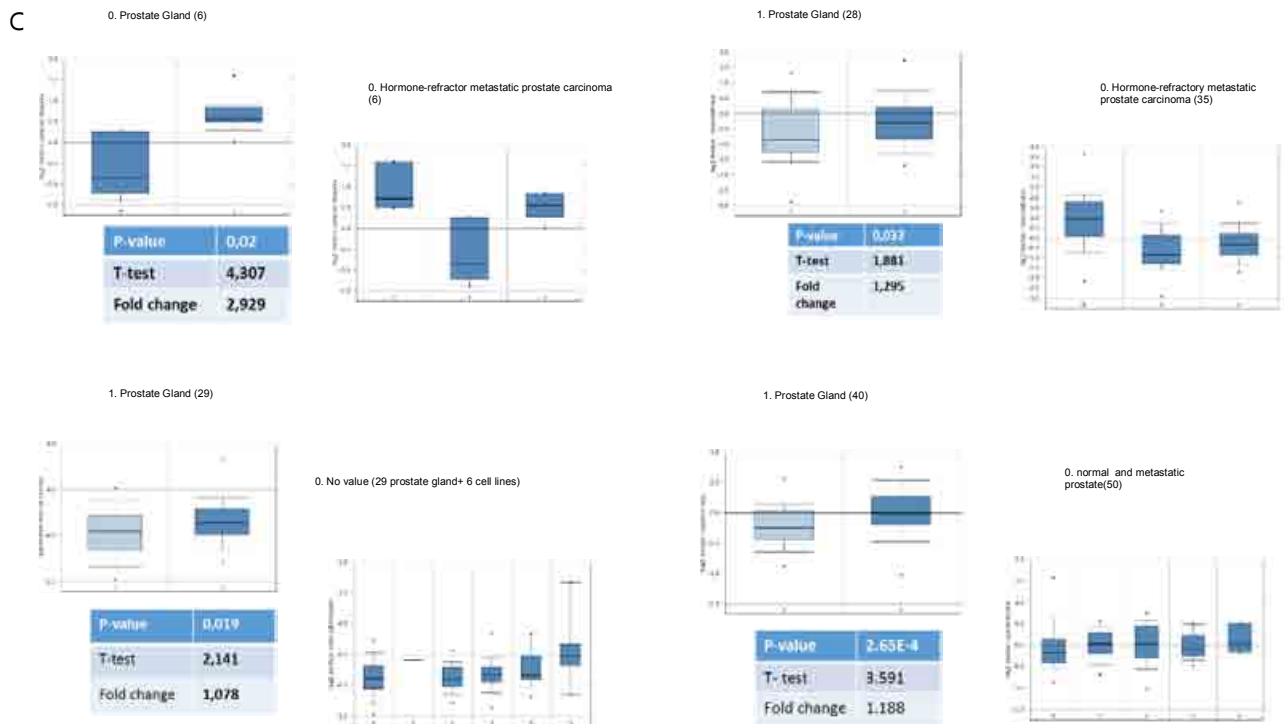
A

	Gene Rank	P-value	Human simple size mRNA	Measured genes
1	4730	0.033	122	19,189
2	1266	2.65E-4	112	10,166
3	4080	0.019	185	22,238
4	509	0.002	19	19574

B

Median Rank	p-Value	Gene
2673.0	0.010	HMOX1

1	2	3	4
---	---	---	---



HMOX1	INMUNOHISTOQUÍMICA
Prostata normal	(-)
Adenocarcinoma de próstata	(-)

Figura 5



# Análisis de la expresión de MMP9 en Adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal

Lista de trabajos mostrando sobre expresión de MMP9

**A**

	Gene Rank	P-value	Human sample size mRNA	Measured genes
1	4226	0.031	21	19,574
2	1629	2.65E-4	122	19,189
3	1092	0.001	102	8,603
4	769	3.58E-5	185	22,238
5	2085	0.028	19	19,574
6	1427	0.007	112	8,603

**B**

Median Rank	p-Value	Gene
1528.0	0.003	MMP9

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

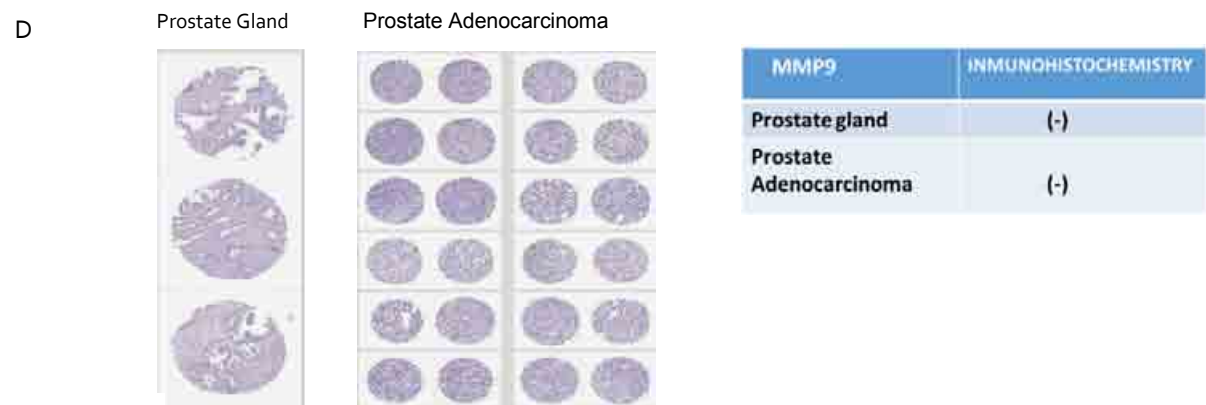
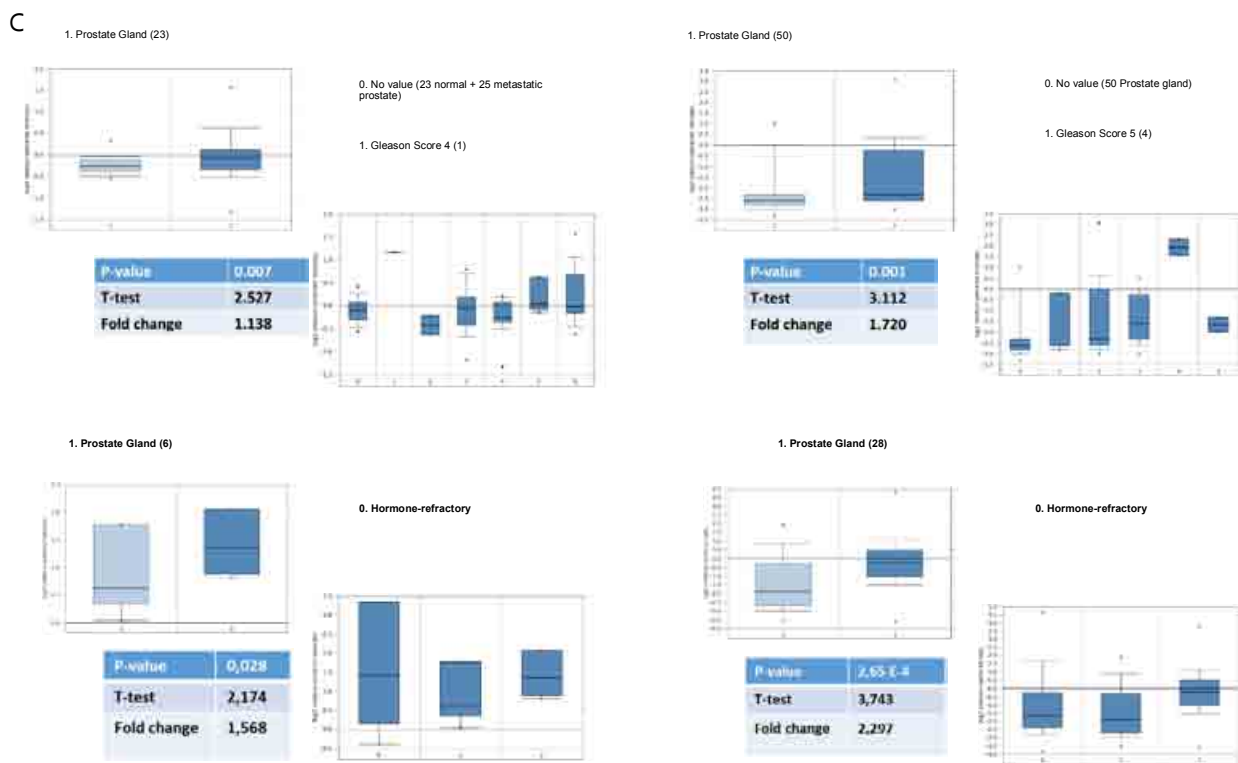


Figura 6

# Análisis de la expresión de ZNF589 en Adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal

Lista de trabajos mostrando sobre expresión de ZNF589

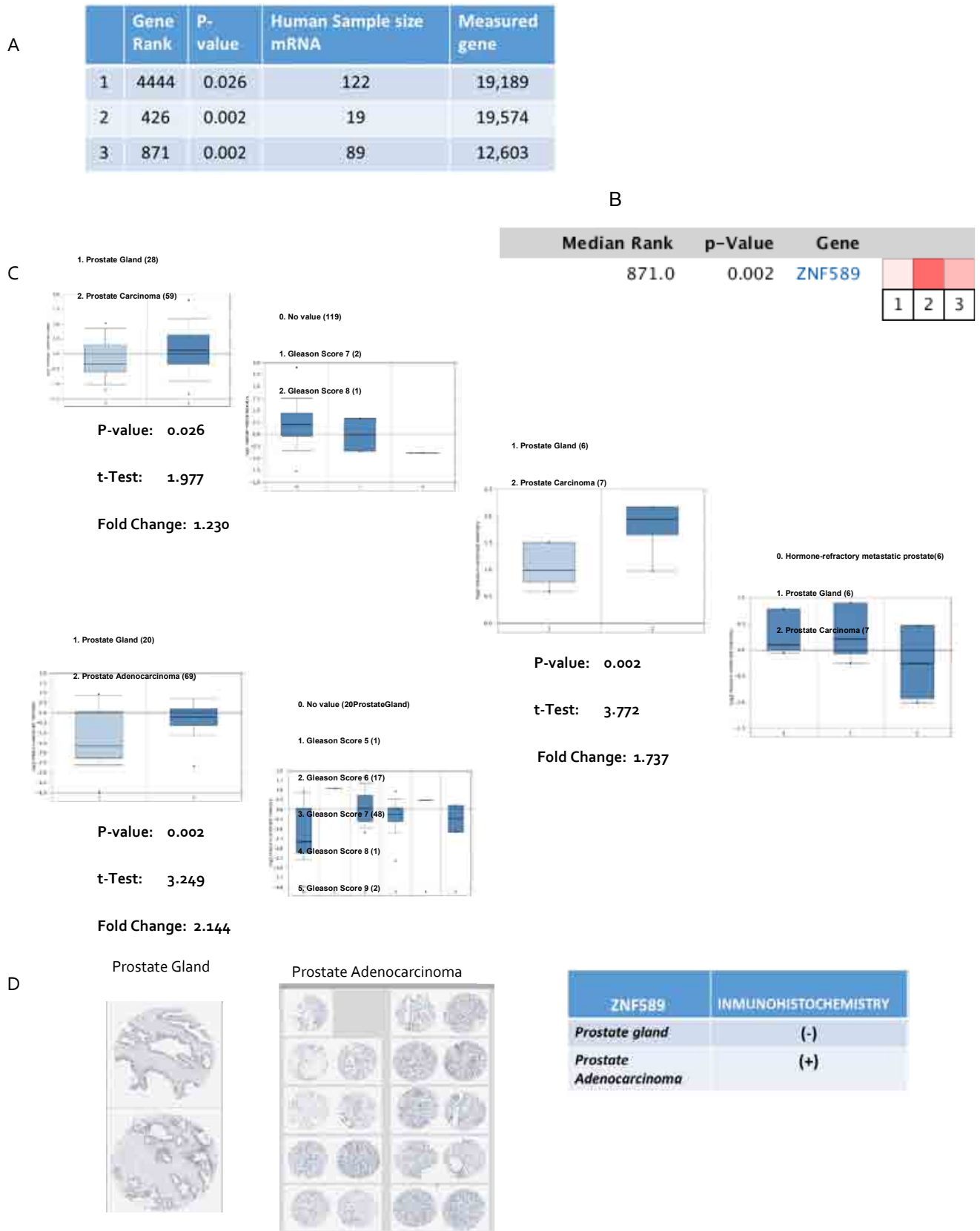


Figura 7

# Análisis de la expresión de ANXA2 en Adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal

Lista de trabajos mostrando sub expresión de ANXA2

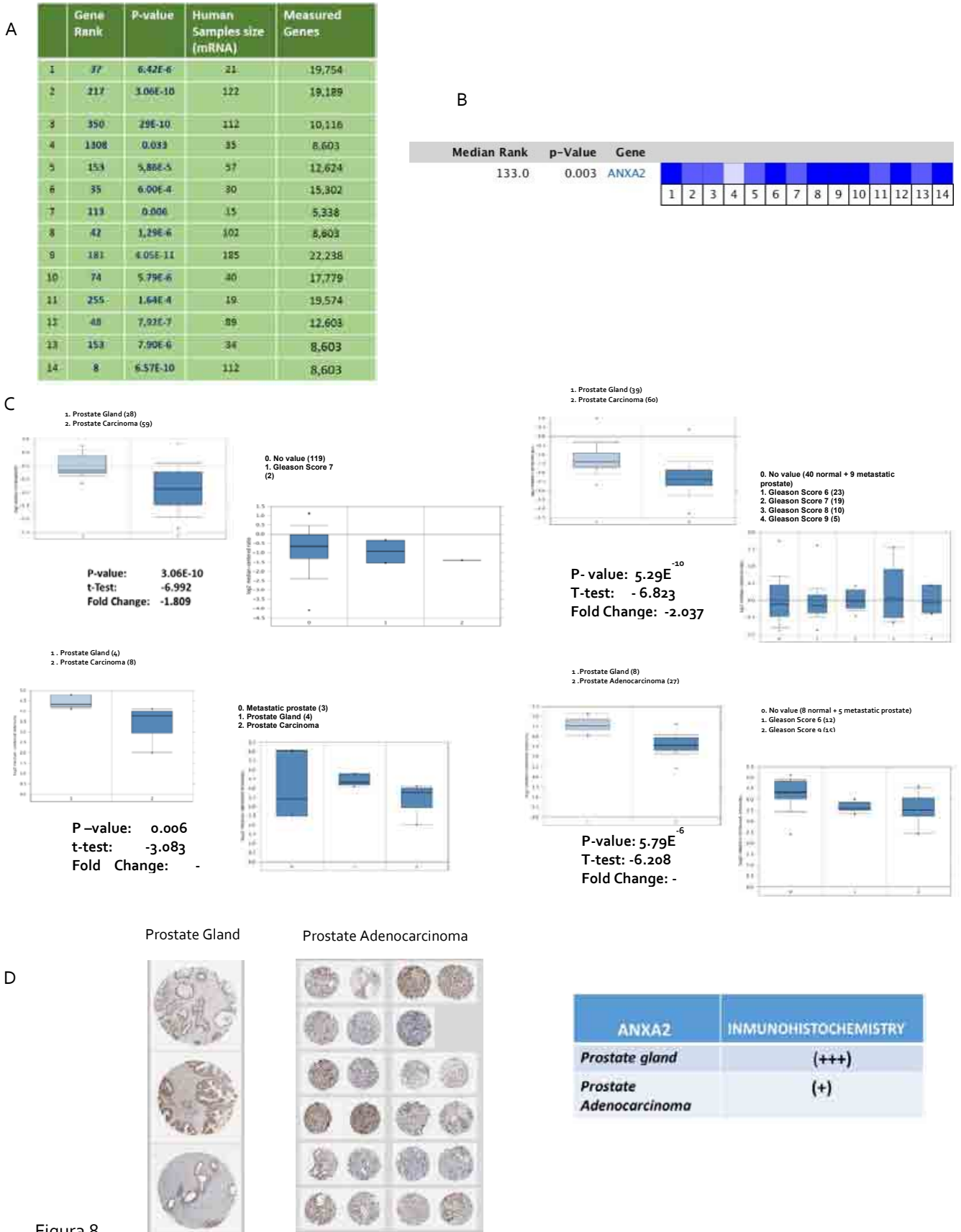


Figura 8

# Análisis de la expresión de AHSG en Adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal

Lista de trabajos mostrando sub expresión de AHSG

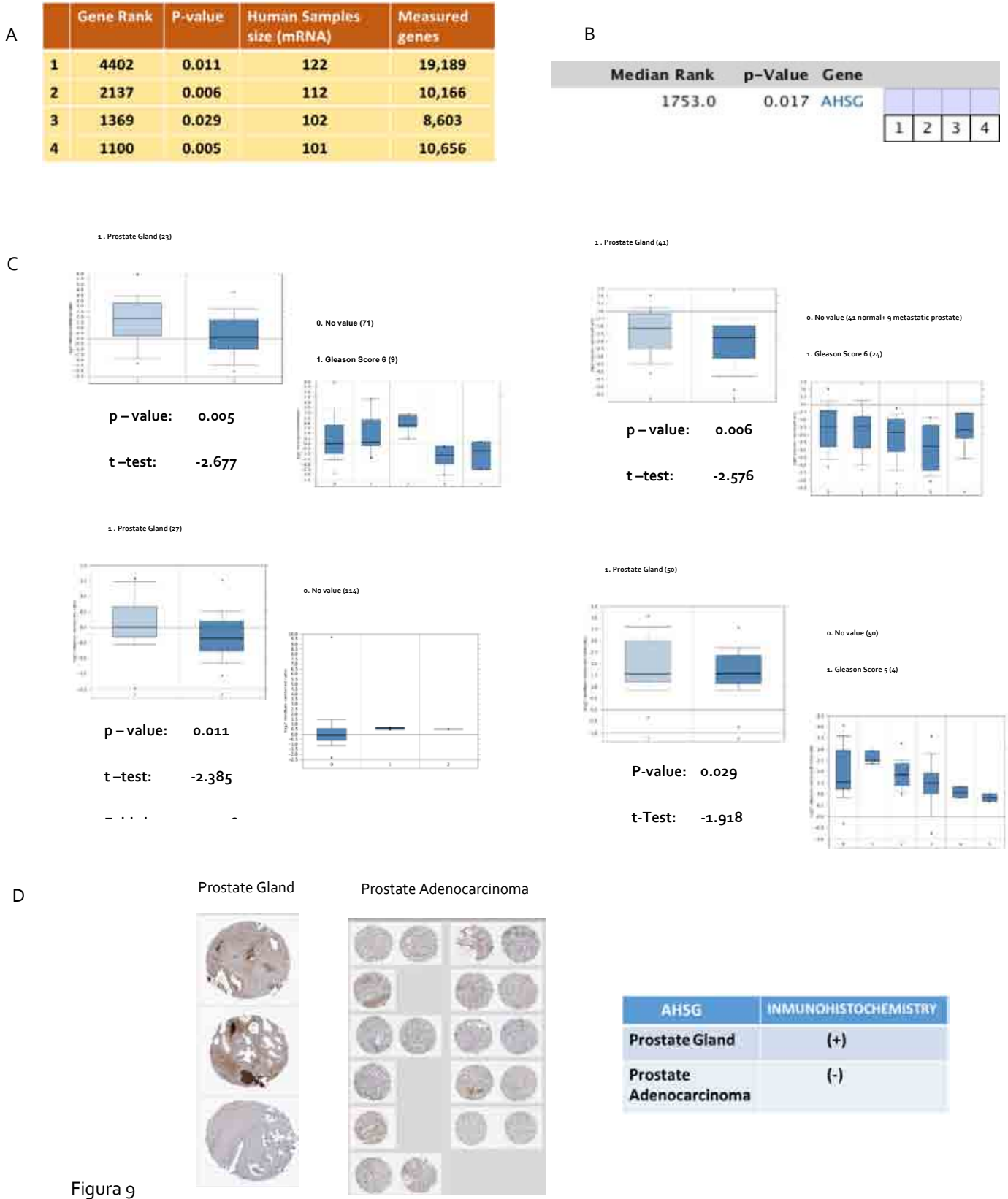


Figura 9

## Leyendas de Figura

**Tabla 1.** Genes sujetos al análisis bioinformático y sus respectivas categorías ontológicas, en el recuadro se destaca la categoría regulación del metabolismo del ARN la cual fue analizada a través de GeneMANIA.

**Figura 1.** A) Con las proteínas unidas a HO-1-GST, que se obtuvieron del ensayo de inmunoprecipitación, se realizó un análisis de red de interacciones y B) de ontología génica (GO). C) Un gran porcentaje de las proteínas detectadas está asociado a procesos que involucran al ADN y al ARN.

**Figura 2.** Utilizando el software GeneMANIA se estudiaron las interacciones entre las proteínas diferencialmente asociadas a HO-1. El análisis se llevó a cabo evaluando las relaciones entre data sets de proteínas de grupos específicos de acuerdo a la Ontología Génica. A) En este caso, se muestra una red obtenida a partir de la evaluación de proteínas diferenciales correspondientes al subgrupo *Regulación del Metabolismo de ARN*. En la misma se observan interacciones físicas, de co-expresión y de vías de señalización compartidas. Se destacan las interacciones físicas encontradas entre la proteína TRIM28 y tres miembros de la familia de genes antígenos de melanoma (MAGE). B) Resultados del motor de búsqueda Mascot verificándose la presencia de HO-1 en el eluido de la purificación y la presencia de TRIM 28.

**Figura 3.** A) Red secundaria que muestra interacciones entre las proteínas asociadas a HO-1 y proteínas obtenidas a partir de la red de interacciones de la figura 2. B) Red terciaria construida a partir de las anteriores que muestra interacciones físicas y de vías de señalización compartidas, las cuales representan el 75% de las interacciones existentes.

**Figura 4.** Las células PC3 se trataron con o sin hemina (inductor específico de HO-1, 80  $\mu$ M, durante 24 h), y se extrajeron las proteínas totales que fueron analizadas por western blot.  $\beta$ -actina se usó como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos independientes.

**Figura 5.** Análisis de expresión de HMOX1 en Adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal. A) Lista de trabajos mostrando sobre expresión de HMOX1. B) Comparación de la expresión de HMOX1 entre 4 dataset de la plataforma Oncomine. Se puede observar que la proteína se encuentra sobreexpresada en cáncer de próstata. C) Cuatro análisis que muestran el nivel de expresión de HMOX1 en adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal y en los diferentes grados de Gleason. D) Imagen representativa de Inmunohistoquímica (IHC) para HMOX1 en muestras de Adenocarcinoma vs. Próstata normal, en la cual hubo marcación negativa para HMOX1 en todas las muestra

**Figura 6.** Análisis de expresión de MMP9 en Adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal. A) Lista de trabajos mostrando sobre expresión de MMP9. B) Comparación de la expresión de MMP9 entre 6 dataset de la plataforma Oncomine, en la cual encontramos sobreexpresión de la proteína en Adenocarcinoma de próstata. C) Seis análisis que muestran el nivel de expresión de MMP9 en adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal y en los diferentes grados de Gleason. D) Imagen representativa de Inmunohistoquímica (IHC) para MMP9 en muestras de Adenocarcinoma vs. Próstata normal, en la cual hubo marcación negativa para MMP9 en todas las muestras.

**Figura 7.** Análisis de expresión de ZNF589 en Adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal. A) Lista de trabajos mostrando sobre expresión de ZNF589. B) Comparación de la expresión de ZNF589 entre 3 dataset de la plataforma Oncomine, en la cual encontramos sobreexpresión de la proteína en Adenocarcinoma de próstata. C) Tres análisis que muestran el nivel de expresión de ZNF589 en adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal y en los diferentes grados de Gleason. D) Imagen representativa de Inmunohistoquímica (IHC) para ZNF589 en muestras de Adenocarcinoma vs. Próstata normal, en la cual hubo marcación positiva para ZNF589 en las muestras de adenocarcinoma.

**Figura 8.** Análisis de expresión de ANXA2 en Adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal. A) Lista de trabajos mostrando sub expresión de ANXA2. B) Comparación de la expresión de ANXA2 entre 14 dataset de la plataforma Oncomine, en la cual encontramos sub expresión de la proteína en Adenocarcinoma de próstata. C) Cuatro análisis que muestran el nivel de expresión de ANXA2 en adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal y en los diferentes grados de Gleason. D) Imagen representativa de Inmunohistoquímica (IHC) para ANXA2 en muestras de Adenocarcinoma vs. Próstata normal, en la cual hubo menor marcación para ANXA2 en adenocarcinoma.

**Figura 9.** Análisis de expresión de AHSR en Adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal. A) Lista de

trabajos mostrando sobre expresión de AHSB. B) Comparación de la expresión de AHSB entre 4 dataset de la plataforma Oncomine, en la cual encontramos sobreexpresión de la proteína en Adenocarcinoma de próstata. C) Cuatro análisis que muestran el nivel de expresión de AHSB en adenocarcinoma de próstata vs. próstata normal y en los diferentes grados de Gleason. D) Imagen representativa de Inmunohistoquímica (IHC) para AHSB en muestras de Adenocarcinoma vs. Próstata normal, en la cual hubo marcación negativa para AHSB en adenocarcinoma.

# INESTABILIDAD CROMOSÓMICA INDUCIDA POR ETOPÓSIDO EN CÉLULAS HUMANAS DEFICIENTES EN ATM: IMPLICANCIA DE LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN EN LA INICIACIÓN DE UN PROCESO TUMORIGÉNICO

**Micaela Palmitelli**

Laboratorio de Mutagénesis. Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET  
Academia Nacional de Medicina

**Director:** Marcela Beatriz González Cid

## RESUMEN

La droga antitumoral Etopósido (ETO) estabiliza los complejos ADN-Topoisomerasa II generando rupturas de doble cadena (RDC) persistentes. Las células humanas reparan las RDC mediante: recombinación homóloga (HR) y reunión de extremos no-homólogos (NHEJ) dependiente (D-NHEJ) o independiente (B-NHEJ) de DNA-PKcs. HR es regulada por la proteína-quinasa ATM y requiere de la cohesina Rad21. Este trabajo evaluó la participación de HR, D-NHEJ y B-NHEJ en la acumulación y progresión del daño inducido por ETO en la fase G<sub>2</sub> de células humanas deficientes en ATM (ATM<sup>kd</sup>) o en Rad21 (Rad21<sup>kd</sup>). La deficiencia simultánea de ATM y DNA-PKcs (por inhibición química) afecta la reparación de las RDC por HR y D-NHEJ, acumulando la proteína recombinogénica Rad51 en los sitios de daño y favoreciendo la formación de cromosomas dicéntricos. Además, se observó que HR y ATM funcionan juntas en el mismo proceso facilitando la reparación eficiente de las RDC inducidas por ETO para mantener la integridad cromosómica. Finalmente, la vía de reparación B-NHEJ (células Rad21<sup>kd</sup> con inhibición de DNA-PKcs) está involucrada en la progresión de células altamente dañadas y en la generación de rearrreglos cromosómicos del gen MLL. Este gen está asociado a la aparición de neoplasias secundarias luego del tratamiento quimioterapéutico con ETO.

## ABSTRACT

Antitumor drug Etoposide (ETO) stabilizes DNA-Topoisomerase II complexes generating persistent DNA double strand breaks (DSB). Human cells repair DSB by: homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) dependent (D-NHEJ) or independent (B-NHEJ) of DNA-PKcs. HR is regulated by the protein kinase ATM and the cohesin subunit Rad21 is required for sister chromatid cohesion. This study evaluated the participation of HR, D-NHEJ and B-NHEJ in the accumulation and progression of DNA damage induced by ETO in the G<sub>2</sub> phase of human cells deficient in ATM (ATM<sup>kd</sup>) or in Rad21 (Rad21<sup>kd</sup>). Simultaneous deficiency of ATM and DNA-PKcs (by chemical inhibition) affects DSB repair by HR and D-NHEJ, which accumulate the recombinogenic protein Rad51 at sites of damage and stimulate the formation of dicentric chromosomes. Furthermore, it was observed that HR and ATM play a role in the same process facilitating efficient repair of ETO induced DSB to preserve chromosomal integrity. Finally, B-NHEJ repair pathway in Rad21<sup>kd</sup> cells with chemical inhibition of DNA-PKcs is involved in the progression of highly damaged cells and in the generation of chromosomal rearrangements involving the MLL gene. This gene is associated with the occurrence of secondary malignancies after chemotherapeutic treatment using ETO.

## INTRODUCCIÓN

Las rupturas de doble cadena (RDC) son lesiones severas que afectan la estabilidad del genoma y pueden originarse por procesos endógenos o por factores exógenos como las drogas quimioterapéuticas [12]. Entre ellas, se encuentra la epipodofilotoxina Etopósido (ETO), droga ampliamente utilizada en el tratamiento del cáncer, que actúa como veneno de las ADN-Topoisomerasas de tipo II (Topo II) en células humanas [5].

Las Topo II resuelven problemas topológicos del ADN durante la replicación, transcripción, segregación y condensación cromosómica. Son enzimas que catalizan la liberación de torsiones sobre el

ADN a través de la introducción de rupturas transitorias en la doble cadena del mismo [24]. ETO se caracteriza por estabilizar los complejos ADN-Topo II, conocidos como complejos de clivaje, previniendo la religación de los extremos rotos. Los complejos de clivaje estables son reversibles si se remueve la droga, en cambio, su presencia conduce a la formación de RDC persistentes [23].

Las células eucariotas cuentan con dos mecanismos de reparación de las RDC: la vía de reunión de extremos no-homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) y la vía de recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR) para evitar que estas lesiones se perpetúen. La diferencia principal entre ambas, es que NHEJ actúa en forma rápida, aunque está sujeta a cometer errores y HR opera en forma lenta pero es una vía segura. HR utiliza una molécula de ADN homóloga no dañada, generalmente la cromátida hermana, para restaurar la información original, y NHEJ junta y une extremos de ADN produciendo la pérdida de unos pocos nucleótidos alrededor de la lesión [6]. En base a esto, la contribución relativa de una u otra vía dependerá de la fase del ciclo celular donde se haya originado la RDC: HR participa durante S tardía/G<sub>2</sub> y NHEJ interviene a lo largo del ciclo celular [16].

La actividad de HR está restringida por el complejo multiproteico cohesina. Este complejo rodea al ADN formando una estructura anular para que ambas células hijas posean el mismo material genético luego de la división mitótica y participa desde la fase S hasta anafase del ciclo celular [20]. De este complejo forma parte la subunidad Rad21 (también llamada Scc1 o Mcd1), la cual es reclutada alrededor de la RDC y es esencial para la reparación por HR [18].

Por su lado, NHEJ actúa restaurando la integridad estructural del cromosoma, que de otro modo, resultaría en la falta de varios cientos de genes debido a la pérdida de segmentos cromosómicos enteros [14]. Esta vía depende de la actividad de la proteína DNA-PKcs (subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN). Iliakis y col.[10] definieron a esta vía clásica de reparación como D-NHEJ. Cuando DNA-PKcs está mutada o inhibida químicamente, se modifica la actividad de NHEJ. A pesar de lo cual, las células procesan y remueven la mayoría de las RDC usando una vía alternativa caracterizada por una cinética más lenta que opera como *backup* de D-NHEJ, denominada B-NHEJ [11]. Este es un mecanismo que introduce errores y que funciona principalmente en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular [27].

La reparación del ADN es un fenómeno fisiológico esencial para el mantenimiento de la integridad genómica en las células eucariotas. Los mecanismos de respuesta al daño en el ADN (DDR) han evolucionado para constituir un sistema complejo, sensible, altamente integrado e interconectado con el fin de preservar la estabilidad en células normales.

Durante la progresión tumorigénica, alguno de los mecanismos de DDR muta generando inestabilidad genómica, un rasgo característico de las células tumorales. En este sentido, la proteína *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) tiene una función crítica en la señalización ante la presencia de RDC y promueve la movilización, modificación y el aumento de la expresión de proteínas involucradas en reparación, activación de los puntos de control (G<sub>1</sub>/S, intra-S y G<sub>2</sub>/M) del ciclo celular y/o en la apoptosis en células dañadas para impedir la progresión de las mismas.

Golding y col.[9] han reportado que ATM se une a las RDC y regula su reparación por HR. La relación entre ATM y HR se basa en que, factores involucrados en HR son sustratos de ATM, en especial, la fosforilación de estas proteínas por ATM puede regular la reparación por HR. Además, las células deficientes o inhibidas químicamente en ATM muestran defectos en HR en células humanas.

Por otro lado, diversos estudios han señalado que existe una estrecha interrelación entre las funciones de ATM y DNA-PKcs. Esto se basa en que, ambas quinasas fosforilan a la histona H<sub>2</sub>AX (marcador de RDC) [19], en la disminución de los niveles de ATM luego de inhibir la expresión de DNA-PKcs [26] y en que ATM y DNA-PKcs cooperan en la fosforilación y en la activación completa de DNA-PKcs (en treonina 2609) en respuesta al daño en el ADN [4]. Asimismo, DNA-PKcs es un factor clave en la regulación de la actividad de HR.

Ante la incorrecta reparación de las RDC en el ADN, estas lesiones pueden convertirse en aberraciones cromosómicas estructurales [15]. La presencia de translocaciones cromosómicas recurrentes está asociada con tipos específicos de neoplasias hematológicas y tumores sólidos. Se ha reportado una clara asociación entre la exposición previa a ETO, la aparición de leucemias mieloides agudas relacionadas a la terapia (t-AML) y los rearrreglos cromosómicos involucrando al gen MLL (*mixed lineage leukemia*) ubicado en la región cromosómica 11q23 [8; 13].

En base a lo expuesto, este estudio evalúa la participación de los mecanismos de reparación NHEJ y HR en la progresión de las RDC inducidas por ETO en la fase G<sub>2</sub> de células humanas HeLa y la



consecuente formación de rearrreglos cromosómicos característicos de la etapa de iniciación de un proceso tumorigénico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Líneas Celulares:** Se utilizó la línea celular humana HeLa, derivada de un carcinoma cérvico-uterino. Se estableció una línea silenciada (*knock down*) en la proteína ATM durante la Beca de Formación Inicial en Investigación en Cáncer III. Esta línea posee una expresión residual de ATM de  $20,09\% \pm 0,68$  respecto a la línea control HeLa No Silenciante (NS). Durante la beca actual, se generó una línea celular silenciada (*knock down*) en la expresión de la cohesina Rad21. Las células se cultivaron en medio completo: RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  estreptomycin). Las células se mantuvieron en atmósfera humidificada a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ .

**Agentes químicos:** Etopósido (ETO), NU7026 (inhibidor de DNA-PKcs), KU55933 (inhibidor de ATM) y citocalasina B (inhibidor de la citocinesis) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se mantuvieron a  $20^\circ\text{C}$ . 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) se disolvió en agua destilada y se mantuvo a  $4^\circ\text{C}$ . Los cultivos celulares controles se trataron con los diluyentes correspondientes a cada agente empleado (DMSO 0,5% durante 2 hs, NU7026 10  $\mu\text{M}$  y KU55933 10  $\mu\text{M}$  durante todo el tiempo de cultivo).

**Silenciamiento de Rad21:** El silenciamiento de Rad21 se realizó transfectando las células con un plásmido conteniendo un shRNAmir específico contra el ARN mensajero de Rad21 (pGIPZ-Rad21). Se sembraron  $8,0 \times 10^4$  células en placas de 16 mm con medio completo. A las 24 hs, se descartó el medio, se lavó con PBS y se agregó medio OptiMEM. Luego se procedió al agregado de los conjugados plásmido/reactivo de lipofección (0,8  $\mu\text{g}$  pGIPZ-Rad21 y 3  $\mu\text{l}$  LipoFectamina 2000) durante 4 hs. Finalmente, se retiró el medio de transfección, se lavaron las células y se agregó medio completo. Las células se mantuvieron en cultivo seleccionando a las que incorporaron el plásmido con puomicina, debido a que el mismo posee el gen de resistencia a esta droga.

**Confirmación del silenciamiento de Rad21 por Western blot:** Se prepararon extractos proteicos totales utilizando buffer RIPA (150 mM ClNa, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,25% deoxicolato de sodio) conteniendo inhibidores de proteasas. La concentración proteica de las muestras se determinó por el método de Bradford. Se realizó la electroforesis de 100  $\mu\text{g}$  de proteínas totales conteniendo buffer de siembra en gel SDS-PAGE usando buffer de corrida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF usando buffer de transferencia. Luego de lavarla, la membrana se bloqueó durante toda la noche en solución bloqueante (5% de leche descremada en polvo en PBS/0,2% Tween20). Luego se incubó con el anticuerpo primario anti-Rad21 en solución bloqueante. Se lavó con PBS/0,2% Tween20 (TBS) y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) diluido en solución bloqueante. Se lavó en TBS y se incubó con una solución sustrato de HRP. El revelado se realizó mediante autorradiografía. Se utilizó la proteína ATM como control de carga.

**Caracterización de la línea celular Rad21<sup>kd</sup>:** Se realizaron los siguientes experimentos:

**a- Apareamiento de cromátidas hermanas en metafase:** Las células HeLa Rad21<sup>kd</sup> y NS se cultivaron en medio completo en placas de Petri de 60 mm. Luego se agregó tripsina y se realizó el procesado citogenético convencional (colchicina 0,1  $\mu\text{g/ml}$  durante los últimos 90 min de cultivo, hipotonía KCl 0,075 M durante 28-30 min y fijación con 3 metanol: 1 ácido acético), para la obtención de metafases. Los extendidos cromosómicos se colorearon con Giemsa 10% en buffer Sorensen ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  0,067M,  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  0,067M; pH 6.8) y se analizó la presencia de metafases con o sin las cromátidas apareadas en 200 células mediante microscopía óptica.

**b- Frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) espontáneas:** Las células HeLa Rad21<sup>kd</sup> y NS se sembraron en placas de Petri de 60 mm y se cultivaron en medio completo en presencia de 10  $\mu\text{g/ml}$  BrdU. A las 40 hs. se realizó el procesado citogenético convencional (colchicina, hipotonía y fijación) para la obtención de metafases. Los extendidos cromosómicos se colocaron en una solución de Hoechst 33258 1  $\mu\text{g/ml}$  en agua destilada durante 15 min en oscuridad, se activaron por exposición a la luz solar durante 3-4 hs, y se incubaron en 2XSSC (ClNa 0,3 M,  $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$  0,03 M) a  $56^\circ\text{C}$  durante

1 h. Finalmente, se colorearon con Giemsa 10% en buffer Sorensen y se contaron los ICH por cromosoma en 50 metafases mediante microscopía óptica.

**c- Presencia de puentes cromatínicos espontáneos en células binucleadas:** Las células HeLa Rad21<sup>kd</sup> y NS sembradas sobre cubreobjetos en placas de Petri de 35 mm se mantuvieron en medio completo durante 10-11 hs, agregándose citocalasina B 3 µg/ml durante las últimas 4 hs de cultivo para bloquear la citocinesis celular. Las células se lavaron con PBS, se expusieron a solución hipotónica KCl 0,075 M durante 8 min a 37°C, se fijaron con paraformaldehído (PFA) 2% en PBS durante 15-20 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,25% a temperatura ambiente. Luego del bloqueo (3% seroalbúmina bovina, con 0,25% Tritón X-100 en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente, las células se incubaron durante 18 hs a 4°C en solución bloqueante conteniendo el anticuerpo anti-γH2AX. Se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h con solución bloqueante conteniendo el anticuerpo secundario. Finalmente, se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos utilizando DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) como colorante conteniendo medio de montaje. Se analizó la presencia de puentes con o sin señales γH2AX en los núcleos de 500 células binucleadas (BN) por tratamiento mediante microscopía de fluorescencia.

**d- Ciclo celular frente al tratamiento con ETO:** Las células HeLa Rad21<sup>kd</sup> y NS se sembraron y expusieron a dosis crecientes de ETO: 1,0; 2,0; 5,0 y 10,0 µg/ml durante 2 hs. Luego las células se lavaron con PBS y se agregó medio completo durante 24 hs. Las células se tripsinizaron y colectaron en medio completo. Se realizó una centrifugación (2000 rpm durante 5 min), se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol 90% a -20°C durante un mínimo de 2 hs. Las células se centrifugaron y lavaron con PBS dos veces. Luego se resuspendieron en 300 µl de PBS conteniendo 8 µl de yoduro de propidio 10 µg/ml y se incubaron con 3 µl de RNAsa A (150 µg/ml, libre de DNAsas) durante al menos 20 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Se evaluó el ciclo celular en 20.000 células por dosis mediante un citómetro de flujo Becton-Dickinson, a través del software Cell Quest. Los histogramas de contenido de ADN se analizaron mediante el software WinMDI 2.9.

**e- Ensayo clonogénico:** Las células HeLa Rad21<sup>kd</sup> y NS (300/placas de 60 mm) se expusieron a dosis crecientes de ETO: 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 µg/ml durante 18 hs. Luego de 10-12 días, las colonias se fijaron con metanol y se colorearon con violeta de cristal. Se contaron las colonias con más de 50 células mediante microscopio óptico invertido.

**Evaluación de HR: Focos Rad51 por inmunomarcación en núcleos interfásicos:** Las células HeLa ATM<sup>kd</sup> y NS se sembraron sobre cubreobjetos en placas de Petri y se trataron con 2 µg/ml ETO durante 1 h o se pretrataron con NU7026 durante 1 h y se trataron con 2 µg/ml ETO durante 1 h (tratamiento combinado). Luego de 5-6 hs, se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 2% durante 15-20 min y se permeabilizaron con 0,25% Tritón X-100 a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-Rad51 y con el anticuerpo secundario correspondiente. Finalmente se procedió a montarlos sobre portaobjetos utilizando el colorante DAPI conteniendo medio de montaje. Se contó el número de focos Rad51 en 100 núcleos interfásicos por tratamiento mediante microscopio de fluorescencia.

**Micronúcleos (MN) y daño en el ADN de células binucleadas (BN):** Las células HeLa ATM<sup>kd</sup>, Rad21<sup>kd</sup> y NS se sembraron sobre cubreobjetos y se pretrataron con NU7026 durante 1 h o con KU55933 durante 1 h o se trataron con ETO o con la combinación NU7026-ETO o KU55933-ETO. Luego, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio completo durante 10-11 hs, agregándose 3 µg/ml citocalasina B y 10 µg/ml BrdU durante las últimas 4 hs y 2 hs de cultivo, respectivamente. Las células se lavaron con PBS, se expusieron a solución hipotónica KCl 0,075 M durante 8 min a 37°C, se fijaron con PFA 2% durante 15-20 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,25% a temperatura ambiente. Luego del bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente, las células se incubaron durante 18 hs a 4°C en solución bloqueante conteniendo los anticuerpos anti-γH2AX y anti-BrdU (para descartar las células en fase S), se lavaron con PBS y se incubaron con solución bloqueante conteniendo los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 h. Finalmente, se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos utilizando DAPI. Se evaluó la presencia de MN, de focos γH2AX en los MN y en los núcleos principales en 500 células BN en la fase G1 post-mitótica y los puentes cromatínicos en 500 anafases de células BN mediante microscopio de fluorescencia.

**Análisis de cromosomas dicéntricos:** Las células HeLa ATM<sup>kd</sup> y NS se sembraron, se trataron con ETO o con la combinación NU7026-ETO y se mantuvieron en cultivo durante 28 hs adicionando 10 µg/ml BrdU durante las últimas 8 hs para identificar las células que alcanzaron la segunda división mitótica luego del tratamiento. Se realizó el procesado citogenético convencional para la obtención de metafases y se generaron los extendidos cromosómicos. Luego, se procedió a la desnaturalización del ADN mediante una solución de HCl 2N durante 30 min, se lavó con PBS y se neutralizó con borato de sodio 0,1M durante 5 min. Se realizó la inmunomarcación de BrdU incubando con el anticuerpo específico durante 1 h y luego con el anticuerpo secundario. Se observó la presencia de cromosomas dicéntricos en 100 metafases BrdU positivas mediante microscopio de fluorescencia.

**Rearreglos del gen MLL mediante hibridación in situ por fluorescencia (FISH):** Las células HeLa Rad21<sup>kd</sup> y NS se sembraron sobre cubreobjetos y se trataron con ETO en presencia o no de NU7026. Luego se expusieron a solución hipotónica KCl 0,075 M durante 8 min a 37°C y se fijaron con 3 metanol: 1 ácido acético. Para la hibridación se utilizó la sonda *break apart* para el gen MLL (11q23) con el fin de detectar la presencia de rupturas (translocaciones) en el mismo. Se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, los preparados se lavaron con 2XSSC durante 2 min a temperatura ambiente. Luego se realizó la deshidratación con concentraciones crecientes de etanol (70, 90 y 100%) durante 2 min cada una, la desnaturalización conjunta de la sonda y el ADN nuclear por calentamiento a 75°C y la hibridación en oscuridad en cámara húmeda durante 24 hs a 37°C. Luego se realizaron lavados pos-hibridatorio en 0,4XSSC a 72°C durante 2 min, seguido de un lavado en 2XSSC/0,05% Tween20 a temperatura ambiente. Finalmente, se coloreó con DAPI y se procedió al montaje en portaobjetos. Se contaron 400-500 núcleos interfásicos por tratamiento mediante microscopio de fluorescencia.

## RESULTADOS PRELIMINARES

### **Participación de ATM y DNA-PKcs en la regulación de HR**

En los pasos iniciales de la reparación de las RDC mediante HR la proteína Rad51 forma un filamento nucleoproteico compuesto por monómeros de Rad51 unidos al ADN de simple cadena. Este filamento es el encargado de buscar la secuencia homóloga. Los resultados expuestos en la Figura 1 muestran que ETO induce un aumento similar del número de focos nucleares Rad51 en células HeLa NS, tratadas con el inhibidor químico de DNA-PKcs, NU7026, y en células HeLa ATM<sup>kd</sup> (9,5±6,3 vs. 9,9±7,1). La inhibición química de DNA-PKcs en un contexto deficiente en ATM produce un mayor aumento de focos Rad51 (12,9±8,2) luego del tratamiento con ETO. Por lo tanto, la deficiencia simultánea de ATM y DNA-PKcs afecta la reparación por HR y D-NHEJ, respectivamente, generando una mayor acumulación de la proteína Rad51 en los sitios de daño.

### **Figura 1**

### **Progresión del daño cromosómico a la fase G<sub>1</sub> post-mitótica en un contexto deficiente en ATM**

Para analizar la progresión del daño al siguiente ciclo celular, las células HeLa NS y ATM<sup>kd</sup> se trataron con ETO en presencia o no de NU7026 y se mantuvieron en cultivo durante 10-11 hs, agregando citocalasina B durante las últimas 4 hs. Este esquema experimental permite obtener células BN que se han dividido una vez luego del tratamiento. En la Figura 2a se observa el porcentaje de células BN con focos γH2AX. Las células NS tratadas con la combinación NU7026-ETO muestran un porcentaje de células BN con >20 focos γH2AX en los núcleos principales parecido al hallado en las células ATM<sup>kd</sup> tratadas con ETO (21,71±4,7 vs 26,8±5,9). La falta de ambas proteínas quinasas, ATM y DNA-PKcs, induce un marcado aumento de células BN con >20 focos γH2AX en los núcleos principales (48,2±4,4). Esto sugiere que ambas proteínas contribuyen en forma aditiva en impedir el progreso de células altamente dañadas.

La falta o incorrecta reparación de estas lesiones persistentes en el ADN puede generar rearreglos cromosómicos estructurales. Para demostrarlo se analizó la presencia de cromosomas dicéntricos en la segunda metafase luego del tratamiento. Las células se mantuvieron en cultivo durante 28 hs luego de los tratamientos y se agregó BrdU durante las últimas 8 hs de cultivo para identificar las metafases en la segunda división mitótica. El número de cromosomas dicéntricos por célula aumentó en ambas líneas luego del tratamiento con ETO (Figura 2b). En el caso de la línea

ATM<sup>kd</sup>, la presencia del inhibidor de DNA-PKcs, NU7026, produce un mayor incremento en este valor respecto al tratamiento con ETO solo. De estos datos se concluye que la inhibición química de DNA-PKcs en un contexto deficiente en ATM favorece la formación de rearrreglos cromosómicos, indicando la participación de la vía de reparación B-NHEJ en la generación de translocaciones cromosómicas.

## Figura 2

### **Disminución de los niveles relativos de expresión de Rad21**

Se estableció una línea celular silenciada en la proteína Rad21, lo que se corroboró mediante la cuantificación de los niveles relativos de esta proteína por la técnica de *Western blot*. En la Figura 3a se observa la disminución de la proteína Rad21 total en relación a la línea celular NS, utilizándose a la proteína ATM como control de carga.

## Figura 3

### **Caracterización de la línea HeLa Rad21<sup>kd</sup>**

Se realizaron diversos estudios para confirmar el silenciamiento de Rad21 y caracterizar la línea generada. La proteína Rad21 forma parte del complejo cohesina manteniendo la cohesión de las cromátidas hermanas desde las fases S, G<sub>2</sub> y mitosis hasta anafase asegurando la adecuada segregación cromosómica [3]. Debido a esto, se analizó el apareamiento de las cromátidas hermanas en células metafásicas. En la Figura 3b se observa que en la línea NS alrededor del 100% de las células presentan las cromátidas apareadas, mientras que en la línea Rad21<sup>kd</sup> este porcentaje es menor al 50%. Como Rad21 facilita la reparación por HR, se estudió si su depleción afecta la eficiencia de HR espontánea. La Figura 3c muestra que el número de ICH por cromosoma no difiere entre ambas líneas NS y Rad21<sup>kd</sup> (se analizaron las metafases con las cromátidas apareadas). La falta de Rad21 está asociada con la generación de puentes cromatínicos espontáneos debido a una segregación incorrecta de los cromosomas durante anafase [7]. El análisis de puentes en células BN determinó un importante incremento en la línea Rad21<sup>kd</sup> respecto a NS (Figura 3d). La falta de fosforilación de las cohesinas frente al daño en el ADN se refleja en una disminución de la sobrevida (Bauerschmidt y col., 2010 [2]). En consecuencia, se estudió el efecto de la depleción de Rad21 sobre la viabilidad celular frente a dosis crecientes de ETO. Los resultados expuestos en la Figura 3e muestran que no hay diferencias en la sobrevida entre ambas líneas celulares. Por último, se evaluó la distribución de las poblaciones celulares en las distintas fases del ciclo (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M) frente a dosis crecientes de ETO. Ambas líneas celulares se comportan de forma similar luego de los tratamientos efectuados (Figura 3f), existiendo una dosis-respuesta ( $r=0,993$ ;  $p=0,0005$  para NS y  $r=0,980$ ;  $p=0,003$  para Rad21<sup>kd</sup>) y una leve disminución del porcentaje de células en la fase G<sub>2</sub>/M para ETO 10 µg/ml en la línea Rad21<sup>kd</sup>. Esto se debe a que la proteína Rad21 es requerida para el punto de control G<sub>2</sub>/M luego del daño inducido en el ADN en células de mamíferos [25].

### **Progresión del daño cromosómico a la fase G<sub>1</sub> post-mitótica en un contexto deficiente en HR (Rad21<sup>kd</sup>)**

La progresión del daño en las células HeLa NS y Rad21<sup>kd</sup> se analizó en células BN luego del tratamiento con ETO en presencia o no de KU55933. La Figura 4a muestra que ETO aumenta el porcentaje de células con >20 focos γH2AX en NS (7,7±3,5) y en Rad21<sup>kd</sup> (4,1±2,5). La combinación KU55933-ETO incrementa este porcentaje en NS (20,7±3,2), sin embargo, no hay un efecto adicional en células Rad21<sup>kd</sup> (38,6±0,3). De modo similar, ETO incrementa el porcentaje de células BN con MN con señal γH2AX (15,2±2,3) y aún más en combinación con KU55933 (43,9±15,8) en células NS. Cuando las células Rad21<sup>kd</sup> son tratadas con ETO o una combinación KU55933-ETO, los porcentajes de células BN con MN con señal γH2AX no presentan diferencias significativas entre ambos tratamientos (37,4±20,1 vs. 43,3±14,6) (Figura 4b) sin alterar la cinética de división celular (Figura 4c). Nuestros resultados muestran que HR y ATM funcionan juntas en el mismo proceso facilitando la reparación eficiente de las RDC inducidas por ETO en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular.

## Figura 4

### **Participación de la vía B-NHEJ en la acumulación y progresión de RDC**

En la Figura 5a se observa que la presencia de NU7026 provoca un aumento basal del porcentaje de células BN con >20 focos  $\gamma$ H2AX en un contexto deficiente en Rad21. En ambas líneas celulares, HeLa NS y Rad21<sup>kd</sup>, la combinación entre el inhibidor químico de DNA-PKcs NU7026 y ETO induce un significativo incremento del daño en el ADN. Esto se ve reflejado en el aumento del porcentaje de células BN con >20 focos  $\gamma$ H2AX en comparación con ETO (NS=21,7 $\pm$ 4,7 vs. 7,7 $\pm$ 3,5 y Rad21<sup>kd</sup>=82,7 $\pm$ 1,5 vs. 41,1 $\pm$ 15,9). Por otro lado, el mismo efecto se obtuvo en la formación de puentes cromatínicos. Los cromosomas dicéntricos son cromosomas anormales que pueden producir puentes cromatínicos entre los núcleos de células BN durante anafase. El porcentaje de células BN con puentes se duplicó luego del tratamiento con NU7026-ETO en relación al tratamiento con ETO solo (Figura 5b). Además, la falta de DNA-PK y Rad21 genera un aumento de ~50% en los reordenamientos del gen MLL (Figura 5c). Sin embargo, la presencia de células con daño cromosómico no modifica la cinética de división celular manifestada en el porcentaje de células BN que alcanzaron la fase G<sub>1</sub> post-mitótica (Figura 5d). Estos resultados indican la participación de B-NHEJ en la progresión de daño y en la generación de translocaciones que involucran al gen MLL asociadas a los tratamientos quimioterapéuticos que emplean ETO.

## Figura 5

### **DISCUSIÓN**

Esta investigación estudió la interrelación entre los mecanismos de reparación HR, D-NHEJ y B-NHEJ frente a las lesiones mediadas por la enzima Topo II en un contexto deficiente en ATM y la participación de los mismos en impedir la progresión de células portadoras de rearrreglos cromosómicos. Además, se determinaron las posibles asociaciones entre el gen MLL, involucrado en translocaciones características de las neoplasias relacionadas a la terapia con venenos de Topo II, con las vías de reparación potencialmente mutagénicas, lo que podría conducir a una mejor comprensión de estos fenómenos y a esclarecer los pasos iniciales de un posible desarrollo tumorigénico.

Los estudios se realizaron tratando las células en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular debido a que es en esta fase donde la isoforma  $\alpha$  de Topo II, blanco específico de ETO, alcanza su máxima expresión. Por otro lado, los mecanismos de reparación HR, D-NHEJ y B-NHEJ de las lesiones inducidas por ETO operan fundamentalmente en dicha fase.

Los resultados obtenidos muestran que la deficiencia simultánea de ATM y DNA-PKcs, por inhibición química con NU7026, afecta la reparación por HR generando una mayor acumulación de la proteína Rad51 en los sitios de daño del ADN en la fase G<sub>2</sub>. La proteína ATM es necesaria para la iniciación de la reparación de las RDC por HR. Sin embargo, la inhibición de ATM no afecta la formación del nucleofilamento de Rad51 en las etapas tempranas de HR [1]. Asimismo, Sun y col. [21] reportaron que la deficiencia de ATM provoca la acumulación prolongada de focos Rad51 en las RDC inducidas por ETO.

Además, la falta de las protein-quinazas, ATM y DNA-PKcs, induce un marcado aumento de células BN con >20 focos  $\gamma$ H2AX en los núcleos principales en la fase G<sub>1</sub> post-mitótica y favorece la formación de rearrreglos cromosómicos (cromosomas dicéntricos) en la metafase siguiente. Esto sugiere que ambas proteínas contribuyen, en forma aditiva, en impedir el progreso de células altamente dañadas y que, en su ausencia, la vía de reparación con cinética lenta B-NHEJ participa en la reunión incorrecta de los extremos de ADN generando translocaciones cromosómicas. En este sentido, Yamauchi y col.[28] establecieron que ATM y DNA-PKcs funcionan en una vía común para limitar o minimizar la reunión las RDC persistentes evitando la formación de dicéntricos y translocaciones en fibroblastos humanos normales.

Por otro lado, y como la subunidad de la cohesina Rad21 facilita la reparación por HR al mantener la cohesión entre las cromátidas hermanas, se evaluó su participación en combinación con el inhibidor químico de ATM, KU55933 frente a las RDC inducidas por ETO. Este tratamiento combinado no aumenta el porcentaje de células BN con micronúcleos  $\gamma$ H2AX positivos (con RDC) en relación con ETO solo. Por lo tanto, HR y ATM funcionarían en el mismo proceso permitiendo la reparación eficiente

de las RDC inducidas por ETO en la fase G2 del ciclo celular. Los resultados de Bauerschmidt y col.[2] apoyan esta conclusión al considerar que las cohesinas y ATM actúan juntas en la reparación de las RDC inducidas por radiaciones.

El tipo de cáncer más frecuente luego del tratamiento con venenos de Topo II es la leucemia mieloide aguda (t-AML) que se caracteriza por presentar translocaciones del gen MLL (11q23) en el 80% de los casos [22]. El análisis con la técnica citomolecular de FISH muestra un aumento del porcentaje de células con el gen MLL rearrreglado en células Rad21<sup>kd</sup> en combinación con el inhibidor de DNA-PKcs. Esto indica la participación de la vía B-NHEJ en la generación de translocaciones cromosómicas en el gen MLL. En este sentido, se ha reportado que tanto HR como D-NHEJ, suprimen la formación de translocaciones y que su inactivación permite el procesado de las RDC por la vía B-NHEJ (Soni y col., 2014 [17]).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bakr A, Oing C, Köcher S, Borgmann K, Dornreiter I, Petersen C, et al. Involvement of ATM in homologous recombination after end resection and RAD51 nucleofilament formation. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: 3154-66.
2. Bauerschmidt C, Arrichiello C, Burdak-Rothkamm S, Woodcock M, Hill MA, Stevens DL, et al. Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 477-87.
3. Caron P, Aymard F, Iacovoni JS, Briois S, Canitrot Y, Bugler B, et al. Cohesin protects genes against  $\gamma$ H2AX Induced by DNA double-strand breaks. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002460.
4. Chen BP, Uematsu N, Kobayashi J, Lerenthal Y, Krempler A, Yajima H, et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem.* 2007; 282: 6582-7.
5. de Campos-Nebel M, Larripa I, González-Cid M. Topoisomerase II-mediated DNA damage is differently repaired during the cell cycle by non-homologous end joining and homologous recombination. *PLoS One.* 2010; 5: pii: e12541.
6. Delacôte F, Lopez BS. Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle.* 2008; 7: 3-8.
7. Díaz-Martínez LA, Beauchene NA, Furniss K, Esponda P, Giménez-Abián JF, Clarke DJ. Cohesin is needed for bipolar mitosis in human cells. *Cell Cycle.* 2010; 9: 1764-73.
8. Felix CA, Kolaris CP, Osheroff N. Topoisomerase II and the etiology of chromosomal translocations. *DNA Repair.* 2006; 5: 1093-1108.
9. Golding SE, Rosenberg E, Khalil A, McEwen A, Holmes M, Neill S, et al. Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 15402-10.
10. Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, et al. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 104: 14-20.
11. Iliakis G. Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother Oncol.* 2009; 92: 310-5.
12. Jekimovs C, Bolderson E, Suraweera A, Adams M, O'Byrne KJ, Richard DJ. Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: the good, the bad, and the promising. *Front Oncol.* 2014; 4: 86.
13. Kantidze OL, Razin SV. Chemotherapy-related secondary leukemias: A role for DNA repair by error-prone non-homologous end joining in topoisomerase II-Induced chromosomal rearrangements. *Gene.* 2007; 391: 76-9.
14. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem.* 2008; 283: 1-5.
15. Obe G, Durante M. DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res.* 2010; 128: 8-16.
16. Shrivastav M, Miller CA, De Haro LP, Durant ST, Chen BPC, Chen DJ, et al. DNA-PKcs and ATM Co-Regulate DNA Double-Strand Break Repair. *DNA Repair.* 2009; 8: 920-9.
17. Soni A, Siemann M, Grabos M, Murmann T, Pantelias GE, Iliakis G. Requirement for Parp-1 and DNA ligases 1 or 3 but not of Xrcc1 in chromosomal translocation formation by backup end joining. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42:6380-92.
18. Sonoda E, Matsusaka T, Morrison C, Vagnarelli P, Hoshi O, Ushiki T, et al. Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev Cell.* 2001; 1: 759-70.
19. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2004; 64: 2390-6.
20. Ström L, Sjögren C. DNA damage-induced cohesion. *Cell Cycle.* 2005; 4: 536-9.
21. Sun J, Oma Y, Harata M, Kono K, Shima H, Kinomura A, et al. ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot. *PLoS One.* 2010; 5: e13554.
22. Sung PA, Libura J, Richardson C. Etoposide and illegitimate DNA double-strand break repair in the generation of MLL translocations: new insights and new questions. *DNA Repair.* 2006; 5:1109-18.
23. Tanaka T, Halicka HD, Traganos F, Seiter K, Darzynkiewicz Z. Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase. *Cell Cycle.* 2007;6: 371-6.
24. Wang L, Roy SK y Eastmond DA. Differential cell cycle-specificity for chromosomal damage induced by merbarone and etoposide in V79 cells. *Mutation Res.* 2007; 616: 70-82.
25. Watrin E, Peters JM. The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells. *EMBO J.* 2009; 28: 2625-35.
26. Woods D, Turchi JJ. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther.* 2013; 4: 379-89.
27. Wu W, Wang M, Mussfeldt T, Iliakis G. Enhanced use of backup pathways of NHEJ in G2 in Chinese hamster mutant cells with defects in the classical pathway of NHEJ. *Radiat Res.* 2008; 170: 512-20.

28. Yamauchi M, Suzuki K, Oka Y, Suzuki M, Kondo H, Yamashita S. Mode of ATM-dependent suppression of chromosome translocation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 416: 111-8.

ANEXO

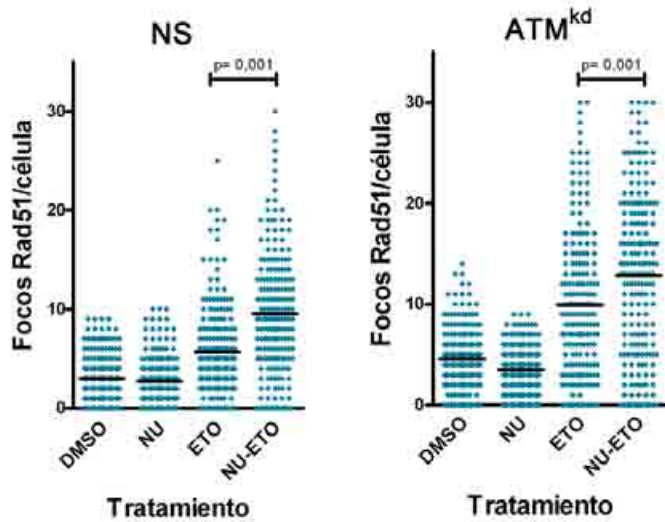


Figura 1. Participación de ATM y DNA-PKcs en la regulación de HR. Número de focos de Rad51 por célula inducidos por los distintos tratamientos. p, test t de Student

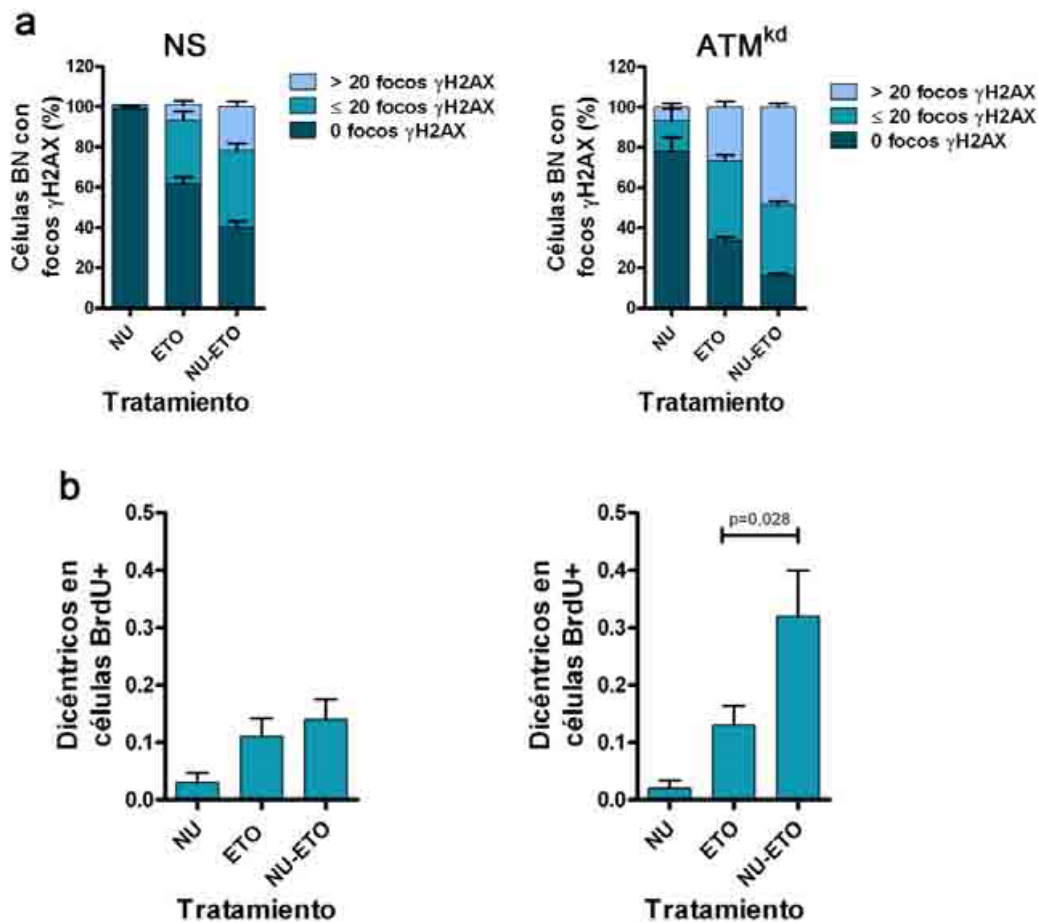
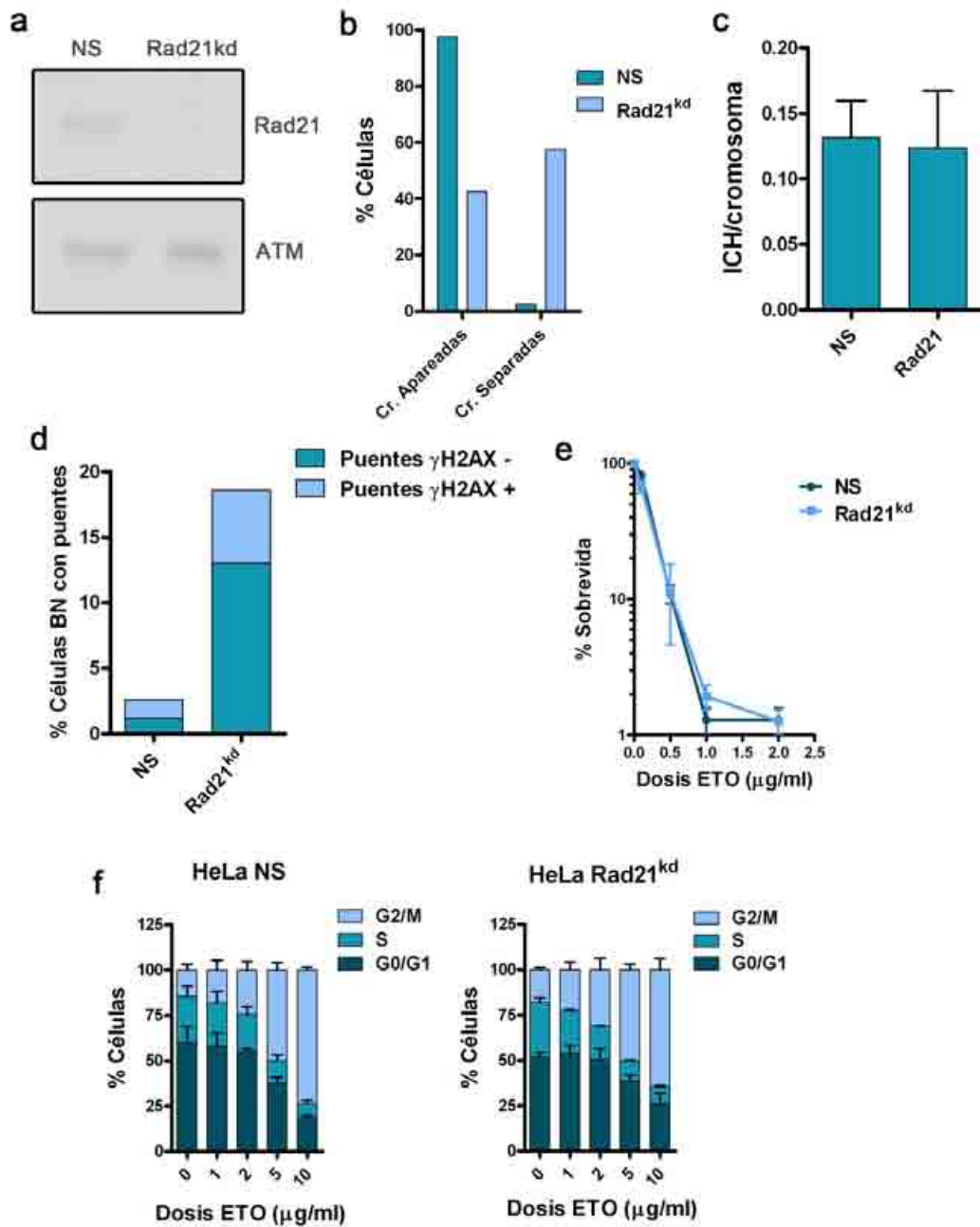


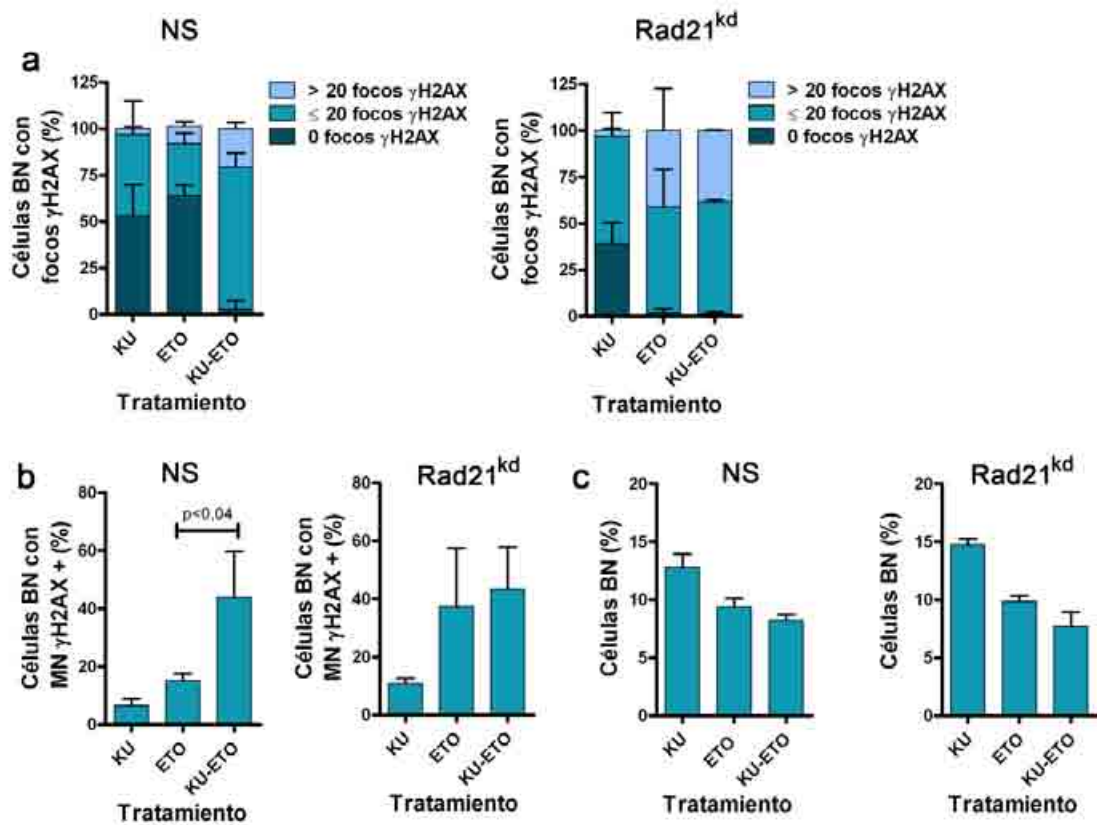
Figura 2. Progresión del daño cromosómico a la fase G1 post-mitótica en un contexto deficiente en ATM. a. Porcentaje de células BN con focos  $\gamma$ H2AX en los núcleos principales. b. Número de



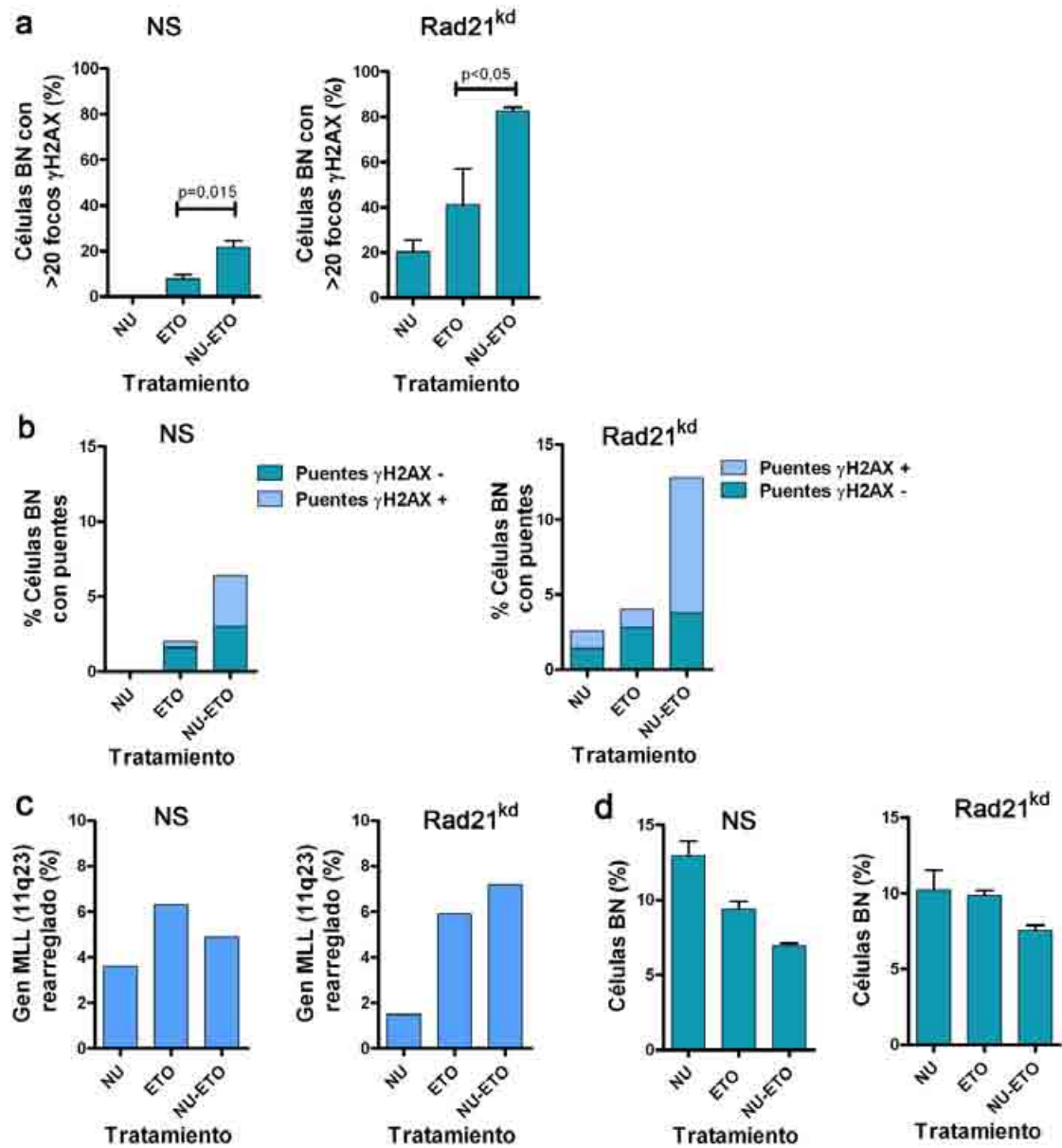
cromosomas dicéntricos por célula BrdU positivas. Barra indica media±desvío estándar, p, test *t* de Student.



**Figura 3.** Caracterización de la línea HeLa Rad21<sup>kd</sup>. **a.** Nivel de expresión de la proteína Rad21 total en HeLa Rad21<sup>kd</sup> respecto al control HeLa NS. ATM= control de carga. **b.** Porcentaje de células metafásicas con cromátidas hermanas apareadas o separadas. **c.** Número de ICH espontáneos por cromosoma. **d.** Porcentaje de células BN con puentes cromatínicos. Se diferencian los puentes  $\gamma$ H2AX positivos y negativos. **e.** Porcentaje de sobrevivida de células NS y Rad21<sup>kd</sup> frente al tratamiento con dosis crecientes de ETO. **f.** Distribución de las poblaciones celulares en las distintas fases del ciclo celular en respuesta al tratamiento con dosis crecientes de ETO. Barra indica media±desvío estándar.



**Figura 4.** Progresión del daño cromosómico a la fase G1 post-mitótica en un contexto deficiente en HR (Rad21<sup>kd</sup>). **a.** Porcentaje de células BN con focos  $\gamma$ H2AX en los núcleos principales. **b.** Porcentaje de células BN con MN  $\gamma$ H2AX positivos. **c.** Porcentaje de células BN en 1.000 núcleos por tratamiento. Barra indica media  $\pm$  desvío estándar,  $p$ , test  $t$  de Student.



**Figura 5.** Participación de la vía B-NHEJ en la acumulación y progresión de RDC. **a.** Porcentaje de células BN con >20 focos  $\gamma$ H2AX en los núcleos principales. **b.** Porcentaje de células BN con puentes cromáticos. Se diferencian los puentes  $\gamma$ H2AX positivos y negativos. **c.** Porcentaje de células con rearrreglos del gen MLL (11q23). **d.** Porcentaje de células BN en 1.000 núcleos por tratamiento. Barra indica media $\pm$ desvío estándar, p, test t de Student.

## EFFECTOS NO GENÓMICOS DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL EN LA MOTILIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA VIA C-SRC/FAK/PAXILLINA

Jorge Eduardo Shortrede

Laboratorio de Biología Tumoral, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Centro Científico Tecnológico Mendoza (CCT-Mendoza).

Directora: Marina Inés Flamini

### RESUMEN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte entre las mujeres debidas al cáncer. Los estrógenos estimulan el crecimiento de la glándula mamaria y del cáncer de mama hormono dependiente. La capacidad de las células para migrar en los tejidos es esencial para el proceso metastásico. 17- $\beta$ -estradiol puede activar diferentes vías de señalización que controlan diversos procesos biológicos. Entre ellos se encuentra el remodelamiento del citoesqueleto de actina que promueve la formación de lamellipodios y filopodios. Éste es regulado por diversas proteínas como por ejemplo *FAK*, paxillina y *N-WASP*, entre otras. En este trabajo se mostró la vía de señalización celular por la cual 17 $\beta$ -estradiol estaría promoviendo la fosforilación de *FAK*, paxillina y *N-WASP*, llevando a la formación de sitios de adhesión focal próximos a la membrana plasmática. Además, se observó el remodelamiento del citoesqueleto actínico y un marcado aumento de la migración y adhesión celular. Por primera vez se reporta el mecanismo completo que estaría involucrado en la promoción de la migración y adhesión celular en las células MCF7. Estos resultados proporcionaron un mecanismo molecular por el cual 17 $\beta$ -estradiol estimularía la motilidad de las células MCF7, proporcionando posibles blancos moleculares para nuevas terapias contra el cáncer de mama.

### ABSTRACT

Breast cancer is the major cause of death among women related to cancer. Estrogens stimulate the growth of mammary gland and in hormone dependent breast cancer. The ability of cells to migrate into tissues is essential for the metastatic process. 17- $\beta$ -estradiol can activate different signaling pathways that control various biological processes. These include remodeling of actin cytoskeleton which promotes lamellipodios and filopodia formation. Actin fibers remodeling is regulated by several proteins, including *FAK*, Paxillin and *N-WASP*, among others. In the present study it is shown the molecular pathway whereby 17 $\beta$ -estradiol would be promoting the phosphorylation of *FAK*, Paxillin and *N-WASP*, leading to the formation of focal adhesion sites close to plasma membrane. Furthermore, it was observed the actin cytoskeleton remodeling and a significant increase in cell migration and adhesion. For the first time, it is reported that an entire mechanism would be involved in the promotion of cell adhesion and migration by 17 $\beta$ -estradiol in MCF7 cells. These results provide a molecular mechanism of 17 $\beta$ -estradiol in the promotion of MCF7 cells motility, providing potential molecular targets for new therapies against breast cancer.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la enfermedad con mayor impacto en la salud mundial [1], entre las mujeres [2]. Además, es la principal causa de muerte por cáncer, una de cada ocho mujeres desarrolla cáncer de mama en alguna etapa de su vida, siendo la metástasis la principal causa de muerte [3]. La metástasis es un proceso complejo caracterizado por el desprendimiento de células desde el tumor primario, seguido por su diseminación a través de los vasos sanguíneos a órganos distantes, su extravasación al parénquima de los tejidos y la formación de tumores secundarios; constituyendo aproximadamente más del 90% de las muertes en pacientes con cáncer [4-6]. Los estrógenos juegan un papel clave en el desarrollo del cáncer de mama, progresión y metástasis, lo cual se correlaciona con el hallazgo de que entre el 60% y el 70% de las biopsias de pacientes con cáncer de mama son receptor de estrógenos alfa (*ER $\alpha$* ) positivo [4, 6, 7]. Los estrógenos son hormonas esteroideas derivadas de los

andrógenos, de los cuales el estradiol o  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) es el que posee mayor actividad biológica ya que es el predominante dentro de la célula [2, 6]. La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que el receptor esteroideo, es activado al unirse a  $E_2$ , actuando como un factor transcripcional al unirse al ADN estimulando la transcripción de genes blanco [7, 8]. Este modo de acción ha sido denominado "genómico", ya que requiere de la unión a su ligando luego de haber atravesado la membrana plasmática, seguido de la homo o heterodimerización del complejo hormona-receptor y del reconocimiento de una secuencia específica en el ADN o elemento de respuesta a estrógeno (ERE) [8]. Por otra parte, el modo de acción "no-genómico" del estrógeno y en general de todas las hormonas esteroideas es un proceso rápido, que transcurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario [8]. Los efectos rápidos de los estrógenos están asociados a la activación de numerosas vías de señalización que incluyen a la proteína tirosina quinasa p60 (c-Src), la quinasa de adhesión focal (FAK), fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Dichas quinasas se encuentran involucradas en la regulación de procesos como la adhesión a la matriz extracelular (ECM), migración, proliferación, apoptosis y sobrevivencia [9, 10]. La migración celular es requerida para la diseminación de las células tumorales, comprendiendo un complejo proceso que involucra numerosas etapas, comenzando por la protrusión del borde de migración de la célula, formación de complejos de adhesión focal, seguido de la contracción celular mediada por las fibras de actina-miosina, estimulando el desensamblaje de las adhesiones focales en el polo opuesto de la célula, permitiendo su desplazamiento [11, 12]. Para ello es necesario que ocurran una serie de eventos de manera coordinada, en los cuales están involucradas más de 125 proteínas, que van a conducir a la formación de lamellipodios y filopodios [12, 13]. Las integrinas son receptores transmembrana encargados de reconocer las distintas proteínas que componen la matriz extracelular (ECM), funcionando como un nexo entre el citoesqueleto de actina y la ECM, permitiendo el anclaje de la célula a la misma [14]. La interacción integrinas-ECM permite el reclutamiento de Talina hacia el dominio citoplasmático de las mismas, conduciendo a la formación de *clusters* de integrinas-Talina; los cuales, por un lado reclutan Paxillina, y por el otro a la quinasa de adhesión focal (FAK), promoviendo la liberación de la conformación auto-inhibitoria llevando a su activación y auto-fosforilación sobre el residuo de tirosina 397 (Y397) [15, 16]. El residuo fosforilado de Y397 funciona como un sitio de anclaje para la proteína tirosina quinasa no receptora de 60 KDa, c-Src, quien fosforila a FAK sobre Y576 y Y577, conduciendo a su máxima actividad quinasa [17]. La quinasa c-Src, se encuentra implicada en diferentes vías de señalización que involucran la proliferación y diferenciación celular, la adhesión, migración, invasión y angiogénesis. Su actividad, al igual que su expresión, se ha visto aumentada en numerosos tipos de tumores [18, 19]. FAK es una tirosina quinasa no receptora de 125 KDa que participa en la regulación de numerosos procesos celulares como la sobrevivencia, apoptosis, adhesión, migración e invasión [20]. Además, se ha observado su sobreexpresión en diversos tipos de cáncer como pulmón, colon y mama [21].

Una vez formado el complejo c-Src/FAK, éste interacciona con Paxillina por medio del dominio LD4 presente en esta última [11]. Paxillina es una proteína andamio multidominio de 68 KDa, que actúa como nexo, permitiendo coordinar e integrar numerosas señales celulares relacionadas con la migración, adhesión e invasión. En respuesta a diferentes estímulos Paxillina puede ser fosforilada por diferentes quinasas como c-Src/FAK, RACK1, JNK, p38 MAPK y ERK entre otras. La fosforilación de paxillina sobre los residuos de tirosina 31 y 118 (Y31 y Y118) genera sitios de unión para proteínas con dominios SH2 (homología a Src), además, por medio de sus dominios LIM (*Lin11*, *Isl1*, *Mec-3*) y LD (rico en leucina y aspartato) puede interaccionar con numerosas proteínas formando complejos multiprotéicos, facilitando la integración de señales, modulando la reestructuración dinámica del citoesqueleto de actina [11, 22, 23]. Una vez activada (fosforilada) ocurre el reclutamiento de numerosas proteínas que llevan por un lado a la activación de Rac con la consecuente formación de lamellipodios; y por otro lado a la activación de Cdc42, estimulando la formación de filopodios [22, 24]. Una vez activadas Rac y Cdc42 activan y reclutan a PAK (quinasa activada por p21) quien a su vez recluta a N-WASP (proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich neuronal) al complejo de adhesión focal, llevando a la activación del complejo Arp2/3 conduciendo al reclutamiento de Vinculina (proteína adaptadora multidominio), la cual se une a Talina, Paxillina, Arp2/3 y  $\alpha$ -actinina, estabilizándolas en los sitios de adhesión focal y promoviendo la ramificación y nucleación de los filamentos de actina [25-29]. Reportes anteriores realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado en otros modelos

celulares, que los estrógenos, en cuestión de minutos, pueden fosforilar y activar varias de estas proteínas vinculadas a la motilidad celular obteniendo como resultado final una estimulación de la migración. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual los estrógenos modulan la dinámica de las adhesiones focales en células de cáncer de mama humano aún no ha sido dilucidado. Por ello, decidimos estudiar cómo  $E_2$  modula la migración y la adhesión celular a través del remodelamiento del citoesqueleto de actina mediante la vía de señalización *Src/FAK/paxillina* y *N-WASP* en las células de cáncer de mama humano MCF-7.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Líneas celulares y tratamientos***

Se utilizaron células de adenocarcinoma mama humano MCF-7 (*ER+*) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (2mM), 10% de suero fetal bovino (*FBS*), hasta una confluencia del 80%. Previo a los tratamientos, las células se mantuvieron 12-24 horas en un medio privado de esteroides, para el estudio de efectos no genómicos.  $17\text{-}\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y la toxina pertusica (*PTX*, inhibidor de proteínas G) fueron comprados en Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, EE.UU.); *ICI* 182,780 (*ICI*, inhibidor de receptor de estrógenos) fue conseguido en Tocris Cookson (Avonmouth, UK); 4-Amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil) pirazol (3,4-d) pirimidina, (*PP2*, inhibidor específico de *c-Src*) fue obtenido de Calbiochem (EMD Biosciences, Germany); el inhibidor 14 de *FAK* (*FAKi*) Santa Cruz, CA, EE.UU., inhibidor de Arp2/3 (CK666, sc-361151 Santa Cruz, CA, EE.UU.). Dichos inhibidores se administraron 45 minutos antes de realizar los tratamientos. Los inhibidores fueron utilizados en las siguientes concentraciones: *ICI* 100 nM, *PTX* 100 ng/ml, *PP2* 10  $\mu$ M, *FAKi* 1  $\mu$ M y CK666 4  $\mu$ M. Las células fueron tratadas con  $E_2$  10 nM y con Raloxifeno 10 nM durante 20 minutos.

### ***Western blotting y anticuerpos***

Las células MCF-7 fueron lisadas con 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 50 mM NaF, 0.1 mg/lit *phenylmethylsulfonylfluoride*, y 0.01% de mix inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Los homogenatos totales fueron separados por electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturalizantes (*SDS-PAGE*) del 8-12% y transferidos a una membrana de difloruro de polivinilideno (*PVDF*). Las membranas se incubaron con anticuerpos contra Paxillina (sc-31010, T-16, Santa Cruz Biotechnology), p-Paxillina (Y118, sc-365020, A-5, Santa Cruz Biotechnology); *FAK* (sc-271126, Santa Cruz Biotechnology), p-*FAK* (Y397, sc-11765, Santa Cruz Biotechnology); *N-WASP* y p-*N-WASP* (S484/485, wp-2201, ECM Biosciences). Luego, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios, seguido de 3 lavados de 5-min con buffer salino tris-Tween-20 (TBS-T). La inmunodetección se llevó a cabo utilizando quimioluminiscentes (*ECL*) y la digitalización se realizó con el equipo Chemidoc XRS (Hercules, CA, EE.UU.) y el análisis de cuantificación por densitometría óptica fue realizado con el programa *Image J* en condiciones que aseguran el rango lineal de detección.

### ***Inmunofluorescencia***

Las células MCF-7 fueron crecidas en cubreobjetos, luego se sometieron a los diferentes tratamientos, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos y se permeabilizaron con 0,1% de Tritón durante 5 minutos. A continuación se realizó el bloqueo en seroalbúmina bovina al 3% en PBS durante 30 min. Las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios respectivos durante toda la noche a 4°C; p-Paxillina (Y118, sc-365020), *N-WASP* (ab32707) y Arp3 (sc-374200). p-Paxillina y Arp3 fueron incubados con un anticuerpo secundario anti-mouse-FITC (1/100), *N-WASP* se incubó con un anticuerpo secundario anti-mouse-Daylight 594 (1/125). Se añadió Texas Red-phalloidina (Sigma-Aldrich) durante 30 min. Para la contratinción nuclear se utilizó 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de Sigma-Aldrich, durante 10 min. Luego fueron montadas en porta objetos con N-Propil Galato. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Nikon Eclipse E-200 (Japón) acoplado a una cámara digital de alta resolución DP70 Olympus.

### ***Silenciamiento génico por ARN interferente***

Se emplearon los siguientes ARN interferentes sintéticos: siRNA- $ER\alpha$ , para receptor de estrógenos alfa (siRNAs SMARTpool ESR1) y  $HER\beta$  siRNA, para receptor de estrógenos beta (sc-353259),

obtenidos de Dharmacon (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). hG- $\beta$  1 siRNA, para proteína G $\beta$  (sc-41762). siRNA Paxillina, ARN interferente de paxillina (sc-29439, Santa Cruz Biotechnology). N-WASP siRNA y Cdc42 siRNA fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los siRNA se utilizaron en una concentración final de 50–75 nM. Las células MCF-7 fueron tratadas 48 hs después de realizada la transfección con los siRNAs. La eficacia del silenciamiento génico se evaluó por western blot.

### **Transfección**

El constructo dominante negativo de la subunidad G $\alpha$ i (Gai1 G202T) fue obtenido de *Guthrie cDNA Resource Center* ([www.cdna.org](http://www.cdna.org)). El constructo fue clonado en un plásmido pcDNA3.1+. Las células MCF-7 fueron transfectadas con 10  $\mu$ g de plásmido utilizando Lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Como control, las células fueron transfectadas con el plásmido vacío pcDNA3.1+. Las células (en una confluencia del 60-70 %) fueron tratadas 48 horas después de realizada la transfección.

### **Ensayo de migración celular**

Las células MCF-7 fueron plaqueadas en placas de 6 pocillos, y crecidas hasta una confluencia del 60-70%. Se les practicó una herida sobre la monocapa de células como ha sido descrito por Li y col. [30]. A continuación se les realizaron 3 lavados con PBS estéril, se adicionaron 1.5 ml de RPMI 1640, conteniendo 10% FBS. El inhibidor selectivo de la síntesis de ADN, que no inhibe la síntesis de ARN (clorhidrato de Citosina  $\beta$ -D-arabinofuranosido 10 $\mu$ M (Sigma-Aldrich, C6645, 10 mM), se utilizó 1 hora antes de las sustancias a estudiar. Se realizó un seguimiento de la migración durante 24 y 48 horas, tomándose fotografías digitales con un microscopio invertido Carl Zeiss y los cierres de áreas fueron cuantificados utilizando el programa imageJ. A las 24 hs se reemplazó el medio de cultivo con los respectivos tratamientos.

### **Ensayo de adhesión celular**

Las células MCF-7 pre tratadas fueron plaqueadas en cubreobjetos cubiertos con gelatina (5x10<sup>4</sup> células/ml) e incubadas a 37°C durante 2 hs. Las células no adheridas se removieron por lavados suaves con PBS estéril. A continuación se incubaron con cristal violeta durante 5 min (como colorante de células) y se realizaron 3 lavados suaves con PBS. Luego fueron montadas en portaobjetos con bálsamo de Canadá. Se tomaron fotografías de las células adheridas, unos 10 campos al azar, por condición, con un microscopio Nikon Eclipse E-200 (Japón) acoplado a una cámara digital de alta resolución DP70 Olympus. Luego se contaron las células utilizando el programa imageJ.

### **Análisis estadístico**

Todos los valores se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados utilizando el software *GraphPad Prism5*, utilizando ANOVA de una vía y pos-test de Bonferroni. Se consideraron estadísticamente significativos los valores con un  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **17- $\beta$ -Estradiol activa paxillina por medio del ER $\alpha$ y la subunidad Gai $\beta$**

Primero se decidió investigar si el tratamiento con E<sub>2</sub> 10 nM durante 20 minutos producía la fosforilación de paxillina sobre el residuo de tirosina 118 por medio del receptor de estrógenos (ER), en células MCF-7. Para ello se evaluó el estado de fosforilación de paxillina por *western blot* en presencia de ICI, un inhibidor del ER (Fig. 1 A y B). Se halló un aumento significativo en la fosforilación de paxillina<sup>Y118</sup> en las células tratadas con E<sub>2</sub>, mientras que, en las células tratadas con ICI + E<sub>2</sub>, se observó una disminución en la fosforilación de paxillina, respecto a las células sin tratamiento, aunque no fue significativo. Con el fin de aclarar si estaba implicado el ER $\alpha$  y/o ER $\beta$  en la fosforilación de paxillina<sup>Y119</sup>, se decidió utilizar la estrategia de silenciamiento por ARN interferente pequeño para disminuir la expresión del ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Fig. 1 C y D). En las células tratadas con el ARNsi para el ER $\alpha$  y E<sub>2</sub>, se pudo observar una clara disminución en los niveles de p-paxillina<sup>Y118</sup>, mientras que en las células tratadas con el ARNsi para el ER $\beta$  y E<sub>2</sub>, no se vieron afectados los niveles de p-paxillina<sup>Y118</sup>. A continuación, se decidió evaluar la participación de las proteínas G en la fosforilación de paxillina<sup>Y118</sup>, por lo que se utilizó la toxina pertúsica (PTX) como inhibidor de las proteínas G. En las células tratadas con PTX + E<sub>2</sub> se vio una

marcada disminución en los niveles de p-paxillina<sup>Y118</sup> (Fig. 2 A y B). Para continuar profundizando se decidió probar si las subunidades G $\alpha$ i/ $\beta$  $\gamma$  participan de la fosforilación de paxillina<sup>Y118</sup>, para ello se transfectaron células MCF-7 con un constructo que codificaba para un dominante negativo de la subunidad G $\alpha$ i (G $\alpha$ i DN) y con ARNs para la subunidad G $\beta$  (G $\beta$  siRNA) durante 48 hs, luego las células fueron estimuladas con E<sub>2</sub> (Fig. 2 C y D). Tanto en las células transfectadas con G $\alpha$ i DN como en las transfectadas con G $\beta$  siRNA, se halló una disminución significativa de p-paxillina<sup>Y118</sup> respecto a las células sólo tratadas con E<sub>2</sub>.

### ***E<sub>2</sub> disparó la fosforilación y redistribución de paxillina llevada a cabo por las quinasas Src y FAK***

En vista de los resultados obtenidos anteriormente, se decidió continuar caracterizando la vía de señalización que podría estar involucrada en la activación de paxillina, mediada por E<sub>2</sub>. Para ello se utilizaron diferentes inhibidores como PTX, PP2 (Src), FAKi (FAK) y se disminuyó la expresión de las proteínas Cdc42 y N-WASP utilizando ARN interferentes específicos para cada una. En las células tratadas con los inhibidores más E<sub>2</sub>, se pudo observar una disminución significativa de p-paxillina<sup>Y118</sup> respecto a las células sólo tratadas con E<sub>2</sub>. Sin embargo, en las células tratadas con los ARN interferentes pequeños más E<sub>2</sub> no hubo cambios en los niveles de p-paxillina<sup>Y118</sup> (Fig. 3 A y B) respecto a las células sólo tratadas con E<sub>2</sub>. A continuación se decidió evaluar si E<sub>2</sub> producía cambios dinámicos en la localización subcelular de p-paxillina<sup>Y118</sup> y actina por inmunofluorescencia. Cuando se trataron las células con E<sub>2</sub>, se observó un remodelamiento del citoesqueleto de actina asociado a una localización periférica de p-paxillina<sup>Y118</sup> en los sitios de adhesión focal (Fig. 3 C). Sin embargo, cuando se trataron las células con PTX, PP2 y FAKi junto con E<sub>2</sub>, se vió una ausencia de redistribución de p-paxillina<sup>Y118</sup> hacia la región proximal a la membrana y la falta de reorganización del citoesqueleto de actina.

### ***Paxillina reguló la activación de N-WASP hacia el complejo Arp2/3 a través de FAK y Cdc42***

Para determinar si la vía proteína G/Src/FAK/Paxillina/Cdc42 participaría en la activación por fosforilación de los residuos de Ser 484/485 de N-WASP, primero, se trataron las células con el siRNA de Cdc42, N-WASP y con los inhibidores PTX, PP2 y FAKi. Luego, se estimularon las mismas con E<sub>2</sub> y se observó una disminución en los niveles de p-N-WASP<sup>Ser484/485</sup> respecto a las células que sólo fueron tratadas con E<sub>2</sub> (Fig. 4 A). A continuación se decidió silenciar paxillina utilizando interferencia por ARN y se evaluaron los niveles de p-FAK<sup>Y397</sup>, p-paxillina<sup>Y118</sup> y p-N-WASP<sup>Ser484/485</sup> por *westernblot* para determinar si paxillina es activada corriente arriba o debajo de FAK y N-WASP (Fig. 4 B). Al evaluar los niveles de p-FAK<sup>Y397</sup> no se vieron cambios en los niveles de fosforilación, inducidos por E<sub>2</sub>, con respecto a las células tratadas con el ARN interferente para paxillina. Por el contrario, cuando se evaluaron los niveles p-N-WASP<sup>Ser484/485</sup> se observó una disminución de los mismos en las células tratadas con el ARN interferente de paxillina, por lo que paxillina sería necesaria para la activación de N-WASP.

Luego se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para evaluar la localización subcelular de N-WASP y del complejo Arp2/3 en células transfectadas con los ARN interferentes para paxillina, Cdc42 y N-WASP. Se notó el cambio de localización de dichas proteínas en las células estimuladas con E<sub>2</sub> respecto a las células sin estímulo (Fig. 4 C). Sin embargo, en las células pre tratadas con los respectivos ARN interferentes y el inhibidor del complejo Arp2/3 (CK666), y posteriormente estimuladas con E<sub>2</sub> se observó una localización difusa de N-WASP y Arp3 en el citoplasma similar a las células control.

### ***La activación de paxillina moduló la migración y adhesión celular***

Hasta el momento se ha demostrado que E<sub>2</sub> activa y estimula la redistribución de paxillina hacia la periferia celular. Por ello se decidió investigar si paxillina podría modular procesos celulares relacionados con la metástasis como la adhesión y migración, para ello, se llevaron a cabo ensayos de adhesión en matriz de gelatina y el ensayo de herida. Cuando se trataron las células con E<sub>2</sub> se observó el doble de células adheridas a la matriz de gelatina respecto de las células control (Fig. 5 A y B). Sin embargo, cuando se trataron las células con PP2, FAKi y CK666 no se encontraron cambios significativos en el número de células adheridas a la matriz. Además, en las células transfectadas con el interferente de Paxillina se vio una disminución significativa en el número de células adheridas, y en aquellas células transfectadas con el ARNi para N-WASP se encontró un aumento del número de células adheridas comparado con el control. Cuando se analizó el ensayo de herida, se observó un cierre significativo de la herida en las células tratadas sólo con E<sub>2</sub>, no así cuando se trataron las células con los



inhibidores de *ERs*, proteínas *G*, *Src*, *FAK* y *Arp2/3* o con los interferentes para Paxillina, *Cdc42* and *N-WASP* (Fig. 6 A y B).

## DISCUSIÓN

Una mejor comprensión sobre los cambios moleculares que ocurren dentro de una célula cuando es sometida a un estímulo, tales como hormonas o estrógenos, son muy importantes para la identificación de nuevos marcadores moleculares y nuevas dianas terapéuticas, necesarios para mejorar los tratamientos contra el cáncer de mama [31]. En la naturaleza, el uso de proteínas andamio multidominio por parte de las células es un mecanismo altamente conservado que les permite regular e integrar múltiples señales extracelulares, conduciendo a un conjunto de respuestas biológicas relacionadas. Paxillina es un claro ejemplo de cómo funciona este tipo de proteínas. Dado el elevado número de motivos de unión presentes en la estructura de Paxillina, le permite reclutar diferentes proteínas intermediarias formando un complexoma que permite una adecuada activación de múltiples vías de señalización. Se ha reportado que Paxillina estaría regulando la reorganización del citoesqueleto de actina y de la *ECM*, la motilidad celular y la expresión génica [9, 32]. Por ello, en el presente estudio se decidió estudiar cómo  $E_2$  modularía la movilidad celular, a través del remodelamiento del citoesqueleto de actina promovido por la participación de las proteínas *FAK/paxillina* y *N-WASP* a través de la vía genómica del receptor de estrógenos.

Algunos estudios asocian las isoformas del receptor de estrógenos (*ER $\alpha$*  y *ER $\beta$* ) con el desarrollo y la progresión de los cánceres hormono dependientes, ejerciendo diferentes funciones biológicas de acuerdo con el tipo de tejido en donde se expresan [6, 7]. El *ER $\alpha$*  ha sido asociado con la proliferación anormal, la inflamación y el desarrollo tumoral maligno [8]. Estudios recientes, han indicado que la vía de señalización extranuclear del *ER* en células de cáncer de mama promueve el remodelamiento del citoesqueleto y la migración celular [3, 33]. Una de las funciones más interesantes de paxillina, es la modulación de las adhesiones focales y la remodelación del citoesqueleto de actínica, además, el residuo de Tyr118 es considerada una región integradora que estaría regulando la migración celular [11, 34]. En este estudio hemos demostrado claramente que 17- $\beta$ -estradiol ejerce su acción a través del *ER $\alpha$*  y la subunidad *Gai/βγ* y en la fosforilación de PaxillinaTyr118 en células MCF-7. Además, se presentó evidencia de que *Src* y *FAK* estarían implicados en la fosforilación de PaxillinaTyr118 inducido por  $E_2$ . Dicho resultado está de acuerdo con lo observado por el grupo Wei Yue, donde  $E_2$  induce la fosforilación de las quinasas *Src* y *FAK* en células T47D [9].

La migración celular es uno de los procesos celulares relacionados con la metástasis y se estima que es responsable de aproximadamente el 90% de los decesos debidas al cáncer [35]. Para que ocurra la migración celular, tienen que ocurrir una serie cambios que involucran reordenamientos dinámicos del citoesqueleto de actina, con el fin de promover la formación de protuberancias en la membrana plasmática (filopodios y lamellipodios) que conducen a la translocación de la célula en dirección al frente de migración [36]. Durante este proceso ocurre la formación de adhesiones focales, que unen la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina a través de un gran número de proteínas estructurales y reguladoras [37]. La regulación de las adhesiones focales está liderada en primer lugar; por la activación de las quinasas *Src* y *FAK* [38] y, en segundo lugar, por la fosforilación de paxillina<sup>Tyr118</sup> como lo hemos demostrado, donde jugaría un papel central en el ensamblaje de las adhesiones focales cuando las células MCF-7 fueron estimuladas con  $E_2$ . Estos resultados son consistentes con los hallazgos publicados por el grupo de Rondé; donde sugieren que la interacción entre *Src/FAK* sería esencial para la activación de paxillina [32]. La polimerización de los filamentos de actina en la región proximal a la membrana plasmática es el principal motor que impulsa a la formación de protuberancias en el borde o frente de migración [12]. Uno de los reguladores claves en este proceso son las proteínas relacionada a actina 2 y 3 (*Arp2/3*). Dichas proteínas forman un complejo que permite la nucleación de actina sobre los filamentos preexistentes que llevan a la polimerización de la misma, formando ramificaciones que se dirigen en dirección perpendicular hacia la membrana plasmática, llevando a la formación de lamellipodios en dirección al frente de migración celular [39, 40]. Los principales activadores del complejo *Arp2/3* son la familia de proteínas del síndrome de *Wiskott-Aldrich* (*WASP*), que incluye a *WAS*, *WASP* y *WAVE* [28]. Ellas son las encargadas de transmitir las señales desde las Rho GTPasas, como *Cdc42*, hacia el complejo *Arp2/3* y por medio de éste al citoesqueleto de actina promoviendo su polimerización [41, 42]. La activación de *N-WASP* es controlada por procesos de fosforilación y desfosforilación, donde diversas quinasas tales como

*Src*, *FAK*, Abelson (*Ab1*) y la caseína quinasa 2 (*CK2*) pueden activar *N-WASP* [43]. Además, encontramos que la fosforilación de paxillin sobre el residuo de Tyr 118 sería esencial para la activación y localización de *N-WASP*, como se observa en las inmunofluorescencias. En éste trabajo mostramos el rol protagónico que cumple paxillina en la regulación del citoesqueleto actínico, ya que al disminuir su expresión observamos la pérdida de localización de *N-WASP* y del complejo *Arp2/3* de los sitios de adhesión focal, a partir de los cuales ocurre la ramificación de las fibras de actina, alterando al final, la migración celular y la adhesión de las células MCF7 [24, 28, 29].

Por otra parte, se halló que 17- $\beta$ -estradiol estaría modulando la adhesión y la migración en células MCF-7 a través de la vía *ER $\alpha$* , proteína *G $\alpha$ i*, *Src/FAK/paxillina*, *Cdc42*, *N-WASP* y el complejo *Arp2/3*. Se ha observado una asociación entre algunos miembros de dicha vía de señalización por el grupo de Wang YC en células de carcinoma esofágico escamoso (*ESCC*). Ellos proponen que el silenciamiento de *SLIT2* (factor secretable), induciría la activación de *Cdc42*, promoviendo la localización próxima a la membrana de *FAK* y paxillina [44]. Por primera vez se está reportando la vía de señalización completa que estaría involucrada en la estimulación de la migración celular y la adhesión en células MCF7 y el rol clave que cumple la fosforilación de paxillina sobre el residuo de Tyr118 en dichos procesos biológicos. Estos resultados proporcionan un mecanismo molecular por el cual 17 $\beta$ -estradiol estimularía la motilidad de las células MCF7, proporcionando posibles blancos moleculares para nuevas terapias contra el cáncer de mama. A futuro sería interesante estudiar si existe un diálogo cruzado con la vía de señalización de *PI3K*, *AKT* y el complejo *mTOR*, ya que otros trabajos han demostrado la activación de *PI3K* por  $E_2$  en modelos *in vitro* e *in vivo* [45, 46]. Un estudio en células de cáncer de colon Caco2 demuestra una disminución significativa de la migración celular, cuando utilizan un inhibidor farmacológico de *PI3K*, llevando a una disminución de la fosforilación de *mTOR* y de *PAK1* (proteína quinasa activada por p21/ *Cdc42/Rac*) [47].

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith AW, Alfano CM, Reeve BB, Irwin ML, Bernstein L, Baumgartner K, et al. Race/ethnicity, physical activity, and quality of life in breast cancer survivors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):656-63.
2. Folkerd EJ, Dowsett M. Influence of sex hormones on cancer progression. *J Clin Oncol.* 2010;28(26):4038-44.
3. Sanchez AM, Flamini MI, Baldacci C, Goglia L, Genazzani AR, Simoncini T. Estrogen receptor- $\alpha$  promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP. *Mol Endocrinol.* 2010;24(11):2114-25.
4. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;102(1-5):89-96.
5. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011;147(2):275-92.
6. Liang J, Shang Y. Estrogen and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:225-40.
7. Castoria G, Migliaccio A, Giovannelli P, Auricchio F. Cell proliferation regulated by estradiol receptor: Therapeutic implications. *Steroids.* 2010;75(8-9):524-7.
8. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(8):597-608.
9. Li Y, Wang JP, Santen RJ, Kim TH, Park H, Fan P, et al. Estrogen stimulation of cell migration involves multiple signaling pathway interactions. *Endocrinology.* 2010;151(11):5146-56.
10. Soltysik K, Czekaj P. Membrane estrogen receptors - is it an alternative way of estrogen action? *J Physiol Pharmacol.* 2013;64(2):129-42.
11. Deakin NO, Turner CE. Paxillin comes of age. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 15):2435-44.
12. Vinzenz M, Nemethova M, Schur F, Mueller J, Narita A, Urban E, et al. Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 11):2775-85.
13. Eleniste PP, Bruzzaniti A. Focal adhesion kinases in adhesion structures and disease. *J Signal Transduct.* 2012;2012:296450.
14. Lawson C, Schlaepfer DD. Integrin adhesions: who's on first? What's on second? Connections between FAK and talin. *Cell Adh Migr.* 2012;6(4):302-6.
15. Millard M, Odde S, Neamati N. Integrin targeted therapeutics. *Theranostics.* 2011;1:154-88.
16. Zebda N, Dubrovskiy O, Birukov KG. Focal adhesion kinase regulation of mechanotransduction and its impact on endothelial cell functions. *Microvasc Res.* 2012;83(1):71-81.
17. Scheswohl DM, Harrell JR, Rajfur Z, Gao G, Campbell SL, Schaller MD. Multiple paxillin binding sites regulate FAK function. *J Mol Signal.* 2008;3:1.
18. Flamini MI, Sanchez AM, Genazzani AR, Simoncini T. Estrogen regulates endometrial cell cytoskeletal remodeling and motility via focal adhesion kinase. *Fertil Steril.* 2011;95(2):722-6.
19. Zhang L, Teng Y, Zhang Y, Liu J, Xu L, Qu J, et al. c-Src expression is predictive of poor prognosis in breast cancer patients with bone metastasis, but not in patients with visceral metastasis. *APMIS.* 2012;120(7):549-57.
20. Luo M, Guan JL. Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett.* 2010;289(2):127-39.
21. Alexopoulou AN, Ho-Yen CM, Papalazarou V, Elia G, Jones JL, Hodivala-Dilke K. Tumour-associated endothelial-FAK correlated with molecular sub-type and prognostic factors in invasive breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14(1):237.
22. Zaidel-Bar R, Milo R, Kam Z, Geiger B. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 1):137-48.
23. Vanarotti MS, Miller DJ, Guibao CD, Nourse A, Zheng JJ. Structural and mechanistic insights into the interaction between Pyk2 and paxillin LD motifs. *J Mol Biol.* 2014;426(24):3985-4001.
24. Yu JA, Deakin NO, Turner CE. Paxillin-kinase-linker tyrosine phosphorylation regulates directional cell migration. *Mol Biol Cell.* 2009;20(22):4706-19.
25. Dummmler B, Ohshiro K, Kumar R, Field J. Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1-2):51-63.
26. Lettau M, Pieper J, Gerneth A, Lengl-Janssen B, Voss M, Linkermann A, et al. The adapter protein Nck: role of individual SH3 and SH2 binding modules for protein interactions in T lymphocytes. *Protein Sci.* 2010;19(4):658-69.
27. Carisey A, Ballestrem C. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur J Cell Biol.* 2011;90(2-3):157-63.
28. Oda A, Eto K. WASPs and WAVEs: from molecular function to physiology in hematopoietic cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2013;24(4):308-13.
29. Jessick VJ, Xie M, Pearson AN, Torrey DJ, Ashley MD, Thompson S, et al. Investigating the role of the actin regulating complex ARP2/3 in rapid ischemic tolerance induced neuro-protection. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2013;5(4):216-27.

30. Li Y, Chao Y, Fang Y, Wang J, Wang M, Zhang H, et al. MTA1 promotes the invasion and migration of non-small cell lung cancer cells by downregulating miR-125b. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013;32:33.
31. Cuello-Carrion FD, Shortrede JE, Alvarez-Olmedo D, Cayado-Gutierrez N, Castro GN, Zoppino FC, et al. HER2 and beta-catenin protein location: importance in the prognosis of breast cancer patients and their correlation when breast cancer cells suffer stressful situations. *Clin Exp Metastasis.* 2015;32(2):151-68.
32. Deramaudt TB, Dujardin D, Noulet F, Martin S, Vauchelles R, Takeda K, et al. Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes. *PLoS One.* 2014;9(3):e92059.
33. Hammes SR, Levin ER. Minireview: Recent advances in extranuclear steroid receptor actions. *Endocrinology.* 2011;152(12):4489-95.
34. Brown MC, Turner CE. Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1315-39.
35. Germanov E, Berman JN, Guernsey DL. Current and future approaches for the therapeutic targeting of metastasis (review). *Int J Mol Med.* 2006;18(6):1025-36.
36. Acconcia F, Barnes CJ, Kumar R. Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells. *Endocrinology.* 2006;147(3):1203-12.
37. Infusino GA, Jacobson JR. Endothelial FAK as a therapeutic target in disease. *Microvasc Res.* 2012;83(1):89-96.
38. Dumbauld DW, Michael KE, Hanks SK, Garcia AJ. Focal adhesion kinase-dependent regulation of adhesive forces involves vinculin recruitment to focal adhesions. *Biol Cell.* 2010;102(4):203-13.
39. Insall RH, Machesky LM. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell.* 2009;17(3):310-22.
40. Li Y, Wang PS, Lucas G, Li R, Yao L. ARP2/3 complex is required for directional migration of neural stem cell-derived oligodendrocyte precursors in electric fields. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:41.
41. Frugtniet B, Jiang WG, Martin TA. Role of the WASP and WAVE family proteins in breast cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2015;7:99-109.
42. Takenawa T, Suetsugu S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):37-48.
43. Rotty JD, Wu C, Bear JE. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):7-12.
44. Tseng RC, Chang JM, Chen JH, Huang WR, Tang YA, Kuo IY, et al. Deregulation of SLIT2-mediated Cdc42 activity is associated with esophageal cancer metastasis and poor prognosis. *J Thorac Oncol.* 2015;10(1):189-98.
45. Varea O, Escoll M, Diez H, Garrido JJ, Wandosell F. Oestradiol signalling through the Akt-mTORC1-S6K1. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(5):1052-64.
46. Skandalis SS, Afratis N, Smirlaki G, Nikitovic D, Theocharis AD, Tzanakakis GN, et al. Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: Focus on the role and impact of proteoglycans. *Matrix Biol.* 2013.
47. Gu S, Kounenidakis M, Schmidt EM, Deshpande D, Alkahtani S, Alarifi S, et al. Rapid activation of FAK/mTOR/p70S6K/PAK1-signaling controls the early testosterone-induced actin reorganization in colon cancer cells. *Cell Signal.* 2013;25(1):66-73.

# ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD Y TOXICIDAD IN VIVO DE NUEVAS DROGAS O SUS ASOCIACIONES CON POTENCIAL APLICACIÓN AL TRATAMIENTO DE PACIENTES RECAÍDOS/REFRACTARIOS CON RETINOBLASTOMA

Úrsula Andrea Winter

Hospital de pediatría Prof. Dr. J. P. Garrahan

Directora: Paula Schaiquevich

## RESUMEN

El retinoblastoma es el tumor intraocular más frecuente en pediatría. Es prioritario el estudio de nuevas drogas y esquemas terapéuticos para optimizar el tratamiento según la necesidad de cada paciente.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad citotóxica *in vitro* de melfalan, topotecan, docetaxel y gemcitabina administrados bajo diferentes esquemas terapéuticos. Se utilizaron líneas celulares de retinoblastoma (Y79 y WERI-RB1) y endoteliales humanas (HUVEC, EPC y HMEC). La viabilidad celular se evaluó mediante ensayos colorimétricos, se cuantificó la apoptosis celular y el efecto del tratamiento en el ciclo celular. Además, se determinó por RT-qPCR la expresión del CaRs y de tres proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas).

El topotecan y el melfalan, mostraron una reducción significativa de la IC<sub>50</sub> bajo un esquema metronómico ( $p < 0.05$ ). Los ensayos de tinción diferencial y anexina-V corroboraron los valores obtenidos de IC<sub>50</sub>. Además se observó una tendencia de las células de quedar arrestadas en la fase S/G<sub>2</sub>/M. Docetaxel-gemcitabina combinados mostraron una reducción de la IC<sub>50</sub>, en comparación a la administración individual. Se corroboró la expresión del CaRs y no se observaron diferencias, en expresión de las MDR-proteínas, entre tratamientos. Los resultados obtenidos podrían sentar las bases de nuevas estrategias terapéuticas.

## ABSTRACT

Retinoblastoma is the most common intraocular tumor in children. The priority is to optimize therapeutic strategies with known drugs with more personalized treatment for patients.

The objective of this work was to study *in vitro* the cytotoxic activity of topotecan, melphalan, docetaxel and gemcitabine using different therapeutic strategies.

The methodologies used in this work were: *in vitro* cytotoxicity studies on human retinoblastoma cell lines (Y79 and WERI-RB1) and human endothelial cells (HUVEC, EPCs, and HMEC), viability was measured by colorimetric assay, apoptosis and cell cycle arrest was evaluated by flow cytometry. Also using RT-qPCR was evaluated expressions of CaSr and three multi drug resistance proteins.

The metronomic effect of topotecan and melphalan was confirmed with a significant reduction of the IC<sub>50</sub> under metronomic treatment ( $p < 0.05$ ).

The apoptosis assay corroborates the value of IC<sub>50</sub> previously calculated. Furthermore after topotecan and melphalan treatment cell cycle arrest at S/G<sub>2</sub>/M was observed. Docetaxel-gemcitabine together has shown IC<sub>50</sub> reduction in comparison with individual administration.

CaSr expression was confirmed in all cell lines and not found significant difference within treatment in the MDR-protein.

In conclusion, these results may set the basis for new therapeutic strategies.

## INTRODUCCIÓN:

El retinoblastoma es el tumor intraocular más frecuente en pediatría y es la neoplasia sólida más frecuente en el Servicio de Hemato-Oncología del Hospital de Pediatría JP Garrahan [12]. Aproximadamente el 80% de los pacientes con retinoblastoma diagnosticados en Argentina se tratan

en nuestro Hospital [12]. El tratamiento del retinoblastoma intraocular involucra una serie de toma de decisiones del equipo clínico tratante basadas en diversos criterios que incluyen la lateralidad del tumor, extensión y compromiso tumoral, edad del paciente y tipo de tratamiento previo. Los tratamientos clásicos incluían la enucleación directa del globo ocular afectado, la administración de quimioterapia sistémica (generalmente compuesta por carboplatino, vincristina y etopósido), el tratamiento local con láser o braquiterapia. Posteriormente, se desarrollaron tratamientos locales con la intención de conservar el globo ocular y posiblemente la visión que incluyen la infusión superselectiva en la arteria oftálmica de melfalan, topotecan o carboplatino, la inyección intra-vítrea o periocular de topotecan o melfalan [2]. Es decir, la decisión acerca de la vía de administración, la quimioterapia y el esquema terapéutico que recibirá el paciente es multifactorial. Sin embargo, hasta un 60% de los ojos con enfermedad intraocular y tratados con terapia conservadora recaen o resultan refractarios al tratamiento. Por ello, es imprescindible la disponibilidad de tratamientos de segunda o tercera línea para evitar la enucleación de estos pacientes.

Son limitados los agentes quimioterápicos que se utilizan en el tratamiento del retinoblastoma. Luego de la incorporación del topotecan, no se registran nuevas drogas en los esquemas habituales [3]. En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos contra el retinoblastoma, se trabajó intensamente, en el marco de la Beca Inicio en la investigación 2014, evaluando nuevas drogas con potencial acción contra el retinoblastoma, de este plan se desprende una publicación en prensa (Winter U. y col, Invest Ophthalmol Vis Sci. En prensa)

El tratamiento de retinoblastoma consta de una fase inicial quimiorreducción y una fase de consolidación (terapias locales), más no cuenta con una fase de mantenimiento. Por esto y siguiendo con la línea de trabajo, nos propusimos evaluar la administración metronómica de la quimioterapia [16,17,21]. Si bien el tratamiento metronómico del tumor, consta administraciones de bajas dosis de droga de manera repetida y continua en el tiempo, ha resultado en buena tolerancia (baja probabilidad de eventos adversos) y con estabilización de la enfermedad en algunos tumores, hasta el momento no se ha estudiado para el retinoblastoma. Los mecanismos de acción por los cuales actúan los agentes quimioterápicos administrados en regímenes metronómicos incluyen la actividad antiangiogénica, restauración de la respuesta inmune anticancerígena y la latencia del tumor (*tumor dormancy*) probablemente por la avascularidad inducida y el control inmunológico como una acción directa del quimioterápico sobre las células tumorales. Sin embargo, estos mecanismos son en líneas generales los reportados hasta el momento, pero los correspondientes para cada agente quimioterápico no están dilucidados [16,17].

Hace más de una década se reportó la actividad antiangiogénica del topotecan [7]. Estudios posteriores, mostraron que el topotecan es un antagonista del factor inducible por hipoxia, el cual juega un papel crítico en la angiogenesis mediada por hipoxia [11].

El tratamiento metronómico de células de carcinoma ovárico ha mostrado que la sensibilidad de éstas no difiere del tratamiento convencional (a dosis máximas [13]). Por el contrario, los autores reportaron que las células endoteliales humanas (HUVEC) sí fueron más sensibles luego de 9 días de tratamiento metronómico de topotecan respecto del convencional, con una disminución en 10 veces de la IC<sub>50</sub>.

Así, la actividad antiangiogénica y antitumoral de topotecan se demostró en distintos tipos de tumores tanto bajo un esquema de dosis máxima o convencional como en la administración continua a bajas dosis o metronómica. En particular, el topotecan tiene una reconocida actividad contra el retinoblastoma. Asimismo, hemos demostrado que los tratamientos de bajas dosis de topotecan durante al menos 5 días con descanso de 2 días y repetición de 5 días, respecto de la misma dosis total administrada en un solo día, con la ventaja de mejorar el control de la masa tumoral con menor probabilidad de eventos adversos [20,6]. Sin embargo, la administración metronómica en el tratamiento del retinoblastoma no ha sido evaluada aún.

La ciclofosfamida ha sido ampliamente estudiada y utilizada en los tratamientos metronómicos incluso a nivel de estudios clínicos Fase I/II en pacientes adultos con distintos tipos de tumores sólidos [19]. En particular, el melfalan, es una mostaza nitrogenada del mismo grupo farmacológico que la ciclofosfamida [6], con demostrada actividad antitumoral contra el retinoblastoma y actualmente es usada en el tratamiento local de retinoblastoma. Por todo lo dicho, se planteó evaluar si la sensibilidad de las células del retinoblastoma al tratamiento convencional o al metronómico con topotecan y melfalan, es comparable, o difieren estadísticamente.

El objetivo principal del tratamiento quimioterápico es conseguir la muerte de la célula tumoral, para ello es necesario conseguir la mayor cantidad de fármaco activo disponible, cualquier circunstancia que se interponga o dificulte ese objetivo puede generar resistencia. Actualmente no se ha identificado el mecanismo exacto por el cual una célula tumoral se vuelve resistente a la quimioterapia, es muy probable que esta resistencia sea multifactorial. Uno de los fenómenos relacionados podría ser el aumento de la expresión de proteínas asociadas a resistencia a drogas que se producen por situaciones de hipoxia por mala vascularización tumoral, por exposición a la quimioterapia, entre otros [7,8].

La expulsión del fármaco fuera de la célula es probablemente el mecanismo de resistencia más estudiado y se relaciona fundamentalmente con la acción de proteínas transportadoras del grupo ATP binding cassette, que incluyen P-gp o MDR1 (P-glycoprotein), MRP<sub>1</sub> o ABCB1 (Multidrug Resistance-Associated Protein) y BCRP o ABCG2 (Breast cancer resistance protein) [13,23].

El esquema de administración, definido por la dosis y la frecuencia podría estar relacionado con el desarrollo o no de resistencia. Es por eso que nos propusimos evaluar la expresión de estas tres proteínas (P-gp, MRP<sub>1</sub> y BCRP) en dos líneas celulares, una de retinoblastoma (Y79) y otra endotelial humana (EPC), para topotecan y melfalan, comparando dos esquemas de tratamiento, convencional y metronómico.

Específicamente, el topotecan es un sustrato del MDR1 y ABCB1 [22,23].

En cuanto a la identificación de nuevas drogas ya comercializadas que puedan ser activas en el retinoblastoma, una alternativa atractiva es la combinación de gemcitabina y docetaxel. Esta combinación ha sido elegida en tumores pediátricos refractarios dado que las toxicidades de las drogas individuales prácticamente no se suman y los mecanismos de acción son diferentes lo cual permite dirigir la quimioterapia contra distintos objetivos intracelulares del tumor [9]. La actividad antitumoral de la combinación se estudió previamente en diferentes cultivos celulares incluyendo sarcomas, tumores gástricos e incluso se utiliza en la práctica clínica de pacientes pediátricos con sarcomas óseos y de tejidos blandos [9,10,18]. La actividad antitumoral de la combinación se estudió previamente en diferentes cultivos celulares incluyendo sarcomas, tumores gástricos e incluso se utiliza en la práctica clínica de pacientes pediátricos con sarcomas óseos y de tejidos blandos. El docetaxel pertenece a la familia de los taxanos, se une reversiblemente a la subunidad beta de tubulina de los microtúbulos impidiendo su depolimerización [14]. Esto lleva a una inestabilidad dinámica de la célula afectando el transporte intracelular y la mitosis, con el consecuente arresto celular. Dentro de los eventos adversos se reporta toxicidad hematológica y neurotoxicidad periférica [14]. La gemcitabina es un antimetabolito por ser un análogo de bases pirimidínicas (citosina). Es una prodroga, es metabolizada dentro del interior celular a nucleosidos di y trifosfatos los que interfieren en la replicación del ADN y conlleva a arresto celular y apoptosis. Asimismo, puede llevar a toxicidad hematológica severa y toxicidad pulmonar [10]. Debemos tener en cuenta cómo administrar ambas drogas para lograr un efecto sinérgico, para ello se planteó la evaluación de la actividad de gemcitabina, de docetaxel y de su combinación en líneas celulares de retinoblastoma.

Por otro lado, es importante señalar que las observaciones clínicas vinculan la regresión tumoral a la aparición de calcificación intraocular en el retinoblastoma. Asimismo, el neuroblastoma es un tumor neuroectodérmico al igual que el retinoblastoma y manifiesta extensa calcificación. En relación a la homeostasis del calcio, se ha identificado el receptor de calcio (CaR). La función descripta del CaR es la de sensar las fluctuaciones extracelulares de calcio y de esta manera, regular la secreción de hormona paratiroidea. Además, desempeña un rol en el control de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular [5]. La expresión del CaR se describió en diversos tejidos normales y particularmente en neoplasias, pero su activación conlleva resultados diferentes según el tumor. La expresión del CaR en el neuroblastoma en pacientes se correlacionó con tumores diferenciados, una histología favorable, estadios menos avanzados de la enfermedad y bajo riesgo [1,5]. Por todo lo dicho nos propusimos llevar a cabo un estudio preliminar, en líneas celulares de retinoblastoma y endoteliales humanas, para evaluar la expresión del CaR.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Líneas celulares***

Las líneas celulares de retinoblastoma, Y79 y WERI-Rb1 fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Invitrogen), según indicaciones del fabricante.

En el caso de las líneas celulares de endotelio de cordón umbilical humano (HUVEC) y precursoras endoteliales (EPC) fueron purificadas de sangre del cordón umbilical que se recogió después de partos normales a término con el consentimiento informado de la madre en el Instituto IMEX de la Academia Nacional de Medicina. Las células HUVEC se separaron por inmunomarcaje magnético las CD34<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Bergisch Glad-bach, Alemania). Finalmente, las células microvasculares endoteliales humanas (HMEC) fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las tres líneas fueron cultivadas en medio suplementado para células endoteliales EGM<sup>TM</sup>2 BulletKit<sup>TM</sup> (Walkersville, MD, Lonza) 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina and heparina 0,1%. Todas las líneas se mantuvieron en una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### ***Evaluación de la citotoxicidad del melfalan o topotecan, bajo tratamiento metronómico en líneas celulares de retinoblastoma y endoteliales humanas.***

Los cultivos de células de retinoblastoma (Y79 y WERI-Rb1) y endoteliales humanas (HUVEC, EPC y HMEC), se sembraron en placas de 96 pocillos (20.000 células por pocillo) y se incubaron durante 24 horas. Luego, se expusieron a concentraciones crecientes de topotecan (0.001-10nM) o melfalan (0.0001-10µM), y se cultivaron por 24h en una estufa de cultivo. Al día siguiente, se lavaron las células, se centrifugaron las placas a 2000 rpm durante 10 minutos para reemplazar por medio fresco añadiendo nuevamente la droga a la misma concentración que la del día anterior. Este procedimiento se repitió durante siete días consecutivos. Pasadas 24h de la última administración de droga, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de MTT. La sobrevivencia celular, se determinó en porcentajes, según la relación de absorbancias entre cada pocillo y el control.

### ***Estudios de apoptosis***

Para determinar el porcentaje de células apoptóticas bajo cada esquema de tratamiento (tipo de droga utilizada, secuencia de tratamiento, combinación) se utilizó Anexina-V acoplada a isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC) en conjunto con yoduro de propidio (IP). Esta combinación permite discriminar entre células apoptóticas (anexina V positivas, IP negativas), células necróticas (anexina V positivas, IP positivas), y células viables (anexina V negativas, IP negativas). Luego del tratamiento, se incubaron las células con anexina V/yoduro de propidio y luego, se lavaron con buffer PBS. La cuantificación se realizó por citometría de flujo.

Además, como segunda técnica, se utilizó naranja de acridina/bromuro de etidio y por medio de microscopía de fluorescencia se contaron 300 células totales, discriminando entre viables y no viables.

### ***Expresión de proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas)***

Se utilizó una línea celular de retinoblastoma Y79, y una endotelial humana EPC. Se siguió la metodología previamente descrita para la determinación del efecto citotóxico, planteando un control celular (sin droga) y tratando las células a la IC<sub>50</sub>, convencional y metronómico, para topotecan y melfalan. Finalizado el esquema de tratamiento por medio de la metodología de extracción por columna (PureLink<sup>TM</sup> RNA MiniKit, LifeTechnologies) purificamos el RNA de cada línea, de cada tratamiento. Se realizó una RTq-PCR utilizando el sistema StepOne<sup>TM</sup> (AppliedBiosystems®).

### ***Efecto farmacológico de topotecan y melfalan sobre el ciclo celular***

Se utilizaron dos líneas celulares Y79 y WERI-RB, ambas de retinoblastoma. Se siguió la metodología previamente descrita para la determinación del efecto citotóxico, planteando un control celular (sin droga) y tratando las células a la IC<sub>50</sub>, convencional y metronómico, para topotecan y melfalan. Para determinar el arresto del ciclo celular se trabajó con el marcador KI-67 y con yoduro de propidio. Como controles de ciclo celular un grupo de células de cada línea fueron mantenidas en ausencia de suero fetal bovino (o suplementos, starvation), para lograr un arresto del ciclo celular y un grupo de células creciendo en condiciones de cultivo normales, ambos grupos fueron fijados con etanol al 70% a 4°C toda la noche, tratados con RNasaA (75 U/ml) 30 minutos a



37°C, y teñidos con yoduro de propidio (50 µg/ml) 30 minutos a temperatura ambiente. La determinación de la expresión de Ki-67 se realizó por medio de citometría de flujo.

#### ***Citotoxicidad de gemcitabina y docetaxel***

Se utilizaron dos líneas celulares comerciales de retinoblastoma, Y79 y WERI-RB. La viabilidad celular se midió mediante el método in vitro MTT (Sigma-Aldrich). Se trabajó en placas de 96-wells (20.000 células por pocillo) que se sembraron 24 horas previas al tratamiento con la droga. Pasado este tiempo, se expusieron las líneas celulares a 8 concentraciones crecientes de gemcitabina (0.01-100nM) o de docetaxel (0.01-250nM). Luego de transcurridas 72 horas, se estimó la viabilidad celular en cada pocillo. Cada concentración por triplicado y cada ensayo se realizaron al menos tres veces de manera independiente. La sobrevivencia celular, se determinó en porcentajes, según la relación de absorbancias entre cada pocillo y el control.

#### ***Interacción gemcitabina-docetaxel***

Posteriormente, ya determinada la IC<sub>25</sub> y la IC<sub>50</sub> de gemcitabina y docetaxel en las líneas Y79 y WERI-Rb1, se evaluó la actividad de la combinación. La viabilidad celular se midió mediante el método descrito del MTT. Se trabajó en placas de 96-pocillos (20.000 células por pocillo) que se sembraron 24 horas previas a la administración del quimioterápico. Pasado este tiempo se expusieron las líneas celulares a 8 concentraciones crecientes de gemcitabina (0.01-100nM) y simultáneamente, se agregó docetaxel en cada pocillo en una concentración final en el pocillo equivalente a la IC<sub>25</sub>. En otra experiencia, se expusieron las líneas celulares a concentraciones crecientes de docetaxel (0.01-250nM) en presencia de gemcitabina a su IC<sub>25</sub>. En ambos casos, se estimó la viabilidad celular en cada pocillo luego de pasadas las 72 horas del tratamiento.

#### ***Expresión de CaRs en líneas celulares de retinoblastoma***

Se evaluó la expresión del receptor sensor de calcio en dos líneas comerciales de retinoblastoma (Y79 y WERI-RB1) y tres líneas endoteliales humanas (HUVEC, EPC y HMEC). Utilizando un colorante vital (TrypanBlue) se contaron 1.000.000 células, por cultivo celular, y por medio de la metodología de extracción por columna (PureLink™ RNA MiniKit, LifeTechnologies) purificamos el RNA de cada línea. Realizamos una RTq-PCR utilizando el sistema StepOne™ (AppliedBiosystems®).

#### ***Análisis de los datos***

Los datos crudos se extrajeron del lector de placas y se exportaron a una hoja de Microsoft Office Excel. A partir de los datos obtenidos se calculó la concentración inhibitoria 50% (IC<sub>50</sub>) por medio de una curva dosis-respuesta por regresión no lineal, con el programa GraphPad Prism 5. Para determinar el índice combinatorio CI utilizamos el programa CalcuSyn.

#### ***Topotecan***

Como reportamos, en un informe anterior, los valores de IC<sub>50</sub>, obtenidos bajo el esquema de tratamiento convencional en líneas celulares de retinoblastoma, Y79 y WER-Rb1, fueron de 28.58nM y 18.30nM, respectivamente. Del mismo modo se reportaron los resultados obtenidos en las líneas endoteliales humanas, HUVEC, EPC y HMEC, con valores de IC<sub>50</sub> de 32.49nM, 35.79nM y 13078.00 nM respectivamente. En todos los casos se observa una reducción estadísticamente significativa de la IC<sub>50</sub> en el tratamiento metronómico respecto del convencional (p<0.05)

**Tabla N° 1:** Concentración inhibidora de topotecan del 50% del crecimiento del cultivo según el esquema de tratamiento en las líneas celulares estudiadas

Línea celular	IC <sub>50</sub> tratamiento convencional (nM)	IC <sub>50</sub> tratamiento metronómico (nM)	IC <sub>50</sub> Convencional/IC <sub>50</sub> Metronómica
Y79	28.58 (26.15 -31.49)	1.55 (1.37 - 2.16)	18.43
WERI-Rb1	18.30 (16.71 -20.61)	1.49 (1.33 - 1.69)	12.28
HUVEC	32.49 (29.36 -42.79)	1.42 (1.30 - 2.05)	22.88
EPC	35.79 (32.87-53.20)	2.03 (1.88 - 3.66)	17.63
HMEC	13078.00 (12597.00-14601.00)	1567.00 (1489.00-1647.00)	8.34

**Tabla N° 2:** Determinación del grado de apoptosis, por medio de citometría de flujo, comparación entre el tratamiento convencional y metronómico, a la IC<sub>50</sub> de topotecan

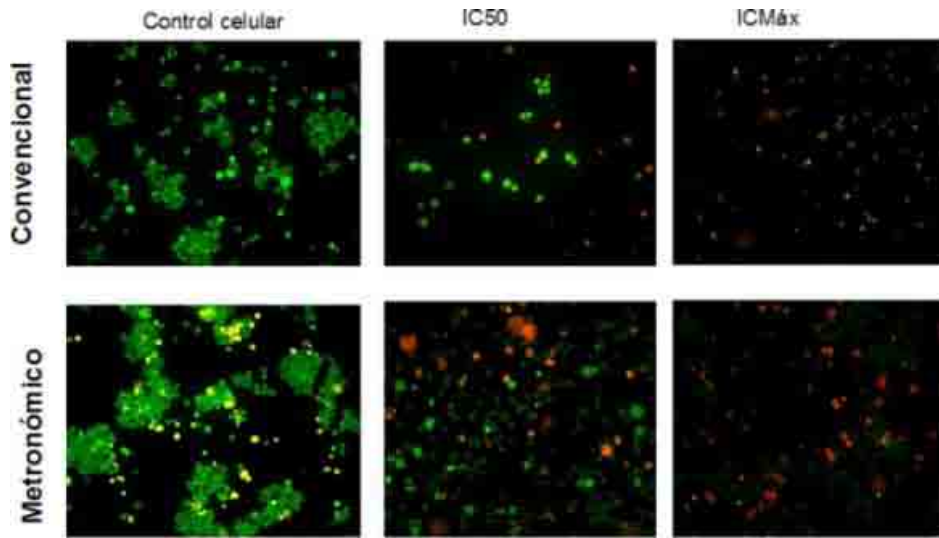
		Y79		HUVEC		EPC	
TOPOTECAN	% Células	IC <sub>50</sub> Convencional	IC <sub>50</sub> Metronómico	IC <sub>50</sub> Convencional	IC <sub>50</sub> Metronómico	IC <sub>50</sub> Convencional	IC <sub>50</sub> Metronómico
	Viables	52.5 (52.3-54.6)	55.2 (47.3-60.0)	54.3 (38.5-61.7)	59.2 (41.1-60.3)	57.4 (43.6-59.2)	54.3 (51.2-54.8)
	Apoptóticas tempranas	1.2 (0.1-1.4)	0.3 (0.2-0.5)	18.6 (5.3-21.5)	2.6 (0.1-3.0)	15.4 (3.9-21.3)	0.4 (0.2-3.7)
	Apoptóticas tardías	12.8 (3.6-18.6)	0.6 (0.2-1.2)	25.4 (9.0-26.8)	4.6 (0.6-8.7)	25.6 (21.7-26.4)	1.3 (0.4-1.6)
	Necróticas	28.3 (27.9-45.9)	45.8 (38.8-51.9)	2.5 (2.1-9.8))	35.9 (21.9-37.4)	1.4 (0.8-10.9)	47.8 (42.8-51.1)

Cada experimento fue repetido de manera independiente al menos tres veces. Los porcentajes de apoptosis se presentan como la mediana de estos.

Se observa que a la IC<sub>50</sub> los valores de apoptosis son cercanos al 50% confirmándose los valores obtenidos previamente por los ensayos colorimétricos.

**Confirmación de la IC<sub>50</sub> metronómica de topotecan en las distintas líneas celulares por tinción diferencial con Naranja de acridina/ Bromuro de etidio**

Se muestra los resultados obtenidos en una de las líneas celulares de retinoblastoma, Y79.



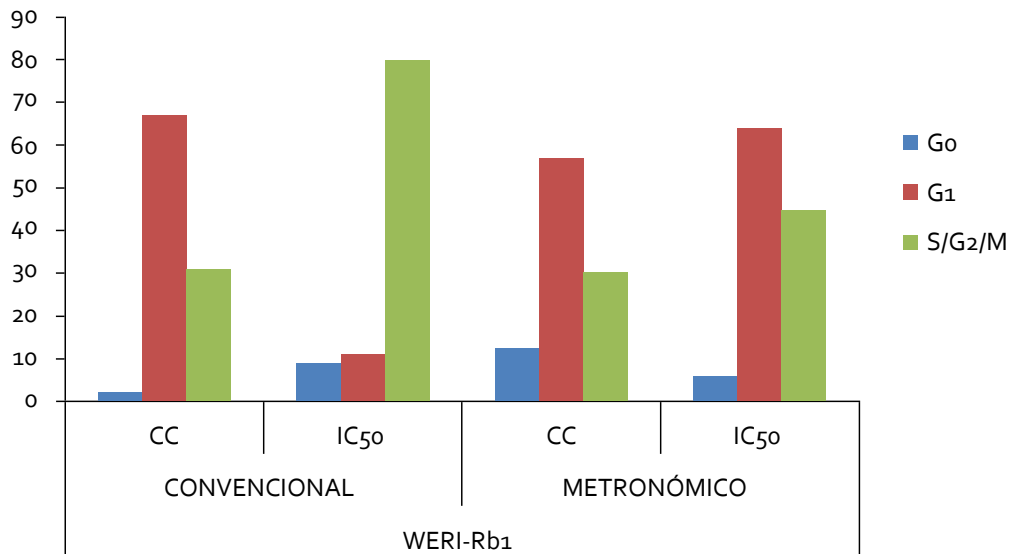
**Fotos Naranja de acridina/Bromuro de etidio, tratamiento *convencional* vs *metronómico* en líneas de retinoblastoma con TOPOTECAN**

Se observa que las células viables aparecen de color verde mientras que las células muertas son teñidas de color naranja. Los controles (sin adición de quimioterápico) muestran un importante número de células viables, este número se reduce al tratarlas a la IC<sub>50</sub> de topotecan, no observándose células viables a la máxima concentración de topotecan (100nM).

**Evaluación del efecto del topotecan sobre el ciclo celular**

Se evaluó por medio de citometría de flujo, utilizando el marcador Ki-67/ioduro de propidio, el efecto sobre el ciclo celular producido por los dos esquemas de tratamiento, convencional y metronómico a la IC<sub>50</sub> en las líneas de retinoblastoma. Se muestran los resultados obtenidos en una de las líneas, WERI-Rb<sub>1</sub>.

Se observa una tendencia de las células de quedar arrestadas en la fase de síntesis (S/G<sub>2</sub>/M) en ambos tratamientos. Esta observación podría guardar una relación con el mecanismo de acción del topotecan, que al arrear a la topoisomerasa I produce segmentos de cadena simple que no permitirían que la célula pasara los puntos de control para ingresar en la fase siguiente.



### Melfalan

Los valores (mediana) de la IC<sub>50</sub> de melfalan obtenidos previamente bajo el esquema de tratamiento convencional en líneas celulares de retinoblastoma, Y79 y WER-Rb1, fueron de 9.75µM y 11.87µM respectivamente. En el caso de las líneas endoteliales humanas HUVEC, EPC y HMEC los resultados previamente obtenidos fueron 43.19µM, 66.75µM y 235.50µM, respectivamente.

En todos los casos se observa una reducción estadísticamente significativa de la IC<sub>50</sub> en el tratamiento metronómico respecto del convencional ( $p < 0.05$ )

**Tabla N°3:** Comparación de la IC<sub>50</sub> de melfalan según el esquema de tratamiento convencional o metronómico

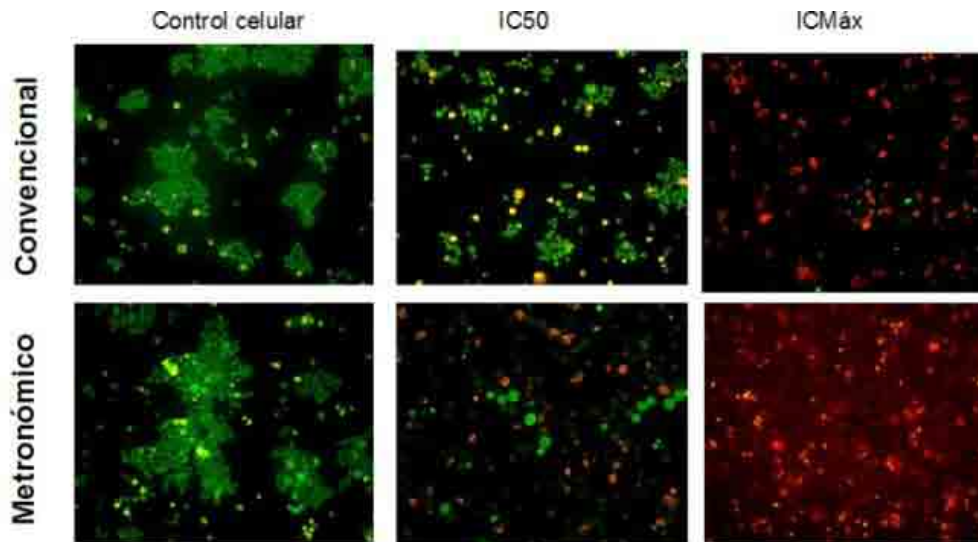
Línea celular	IC <sub>50</sub> tratamiento convencional (µM)	IC <sub>50</sub> tratamiento metronómico (µM)	IC <sub>50</sub> Convencional/IC <sub>50</sub> Metronómica
Y79	9.75 (8.90 - 12.30)	1.17 (0.90 - 2.91)	8.33
WERI-Rb1	11.87 (9.36 - 12.17)	0.88 (0.73-1.57)	13.48
HUVEC	43.19 (39.79 - 55.30)	1.96 (1.85-2.56)	22.03
EPC	66.75 (63.89 - 77.49)	7.49 (6.99-9.87)	8.91
HMEC	235.50 (213.54-279.50)	11.74 (11.33-15.58)	20.05

**Tabla N° 4:** Determinación del grado de apoptosis, por medio de citometría de flujo, comparación entre el tratamiento convencional y metronómico, a la IC<sub>50</sub> de melfalan

		Y79		HUVEC		EPC	
MELFALAN	% Células	IC <sub>50</sub> Convencional	IC <sub>50</sub> Metronómico	IC <sub>50</sub> Convencional	IC <sub>50</sub> Metronómico	IC <sub>50</sub> Convencional	IC <sub>50</sub> Metronómico
	Viables	45.7 (43.7-57.8)	58.2 (55.1-58.9)	61.6 (37.9-64.1)	48.3 (48.1-56.7)	47.7 (33.6-53.6)	44.2 (42.7-57.6)
	Apoptóticas tempranas	1.3 (0.1-2.3)	0.6 (0.0-1.8)	10.9 (2.0-13.2)	0.6 (0.4-0.9)	9.1 (0.7-9.9)	0.0 (0.0-0.2)
	Apoptóticas tardías	8.8 (6.9-13.7)	3.0 (0.0-10.1)	26.1 (22.1-38.3)	2.0 (0.0-3.1)	18.7 (10.1-21.7)	2.3 (1.2-13.5)
	Necróticas	37.6 (33.2-40.3)	43.2 (38.4-44.3)	1.3 (1.0-5.2)	54.3 (44.1-62.3)	17.2 (15.8-21.5)	36.7 (18.4-40.1)

Cada experimento fue repetido de manera independiente al menos tres veces. Los porcentajes de apoptosis se representa como la mediana de estos. Nuevamente se observa que a la IC<sub>50</sub> los valores de apoptosis son cercanos al 50% confirmándose los valores obtenidos previamente por los ensayos colorimétricos.

### **Confirmación de la IC<sub>50</sub> metronómica de melfalan en las distintas líneas celulares por tinción diferencial**



**Fotos Naranja de acridina/Bromuro de etidio, tratamiento *convencional* vs *metronómico* en líneas de retinoblastoma con MELFALAN**

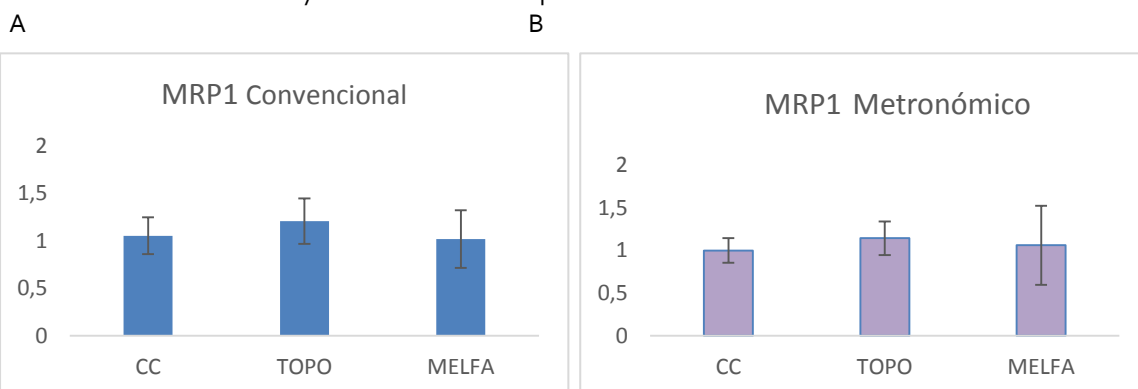
Se muestra los resultados obtenidos en una de las líneas celulares de retinoblastoma, Y79.

Se observa la disminución en el número de células viables, tal que el control celular muestra un alto porcentaje de células vivas (verdes), y a la IC<sub>50</sub>, existe una proporción similar de células viables y no viables (verdes y rojas), hasta llegar a la concentración máxima (100µM), donde todas las células han muerto (rojas). Es más, luego de los siete días del tratamiento metronómico, a la dosis máxima (100µM), se observa un gran número de células desintegradas, que han expulsado su contenido citoplasmático (fantasmas).

#### ***Proteínas de resistencia a múltiples drogas***

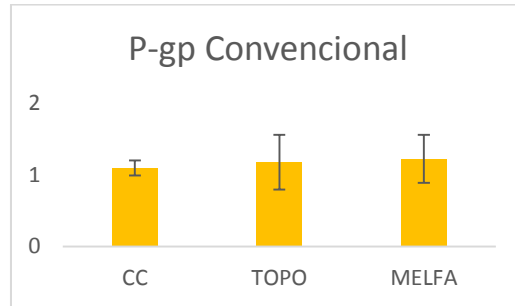
**Figura N°1:** Expresión de (A) MRP1 convencional, (B) MRP1 metronómico en Y79 comparado con la expresión de su respectivo control (normalizado con GAPDH)

Se muestran los resultados de la evaluación de la expresión de MRP1 y P-gp, en Y79, luego del tratamiento metronómico y convencional con topotecan o melfalan.



El tratamiento con topotecan o melfalan, convencional o metronómico, no produce una diferencia significativa en la expresión de MRP1 respecto de su control. A su vez no se observa una diferencia significativa entre tratamientos como se observa en las figuras A y B.

**Figura N°2:** Expresión de Pgp convencional, en Y79 comparado con la expresión del control (normalizado con GAPDH)



El tratamiento convencional con melfalan o melfalan convencional no conlleva a una diferencia significativa en la expresión de PGP.

**Docetaxel y Gemcitabina**

Inicialmente se determinó la IC<sub>50</sub> de docetaxel y gemcitabina bajo un esquema convencional, en las líneas celulares de retinoblastoma. Luego se evaluó el efecto de la combinación de estas drogas sobre la muerte celular.

**Tabla N° 5:** Determinación de la IC<sub>50</sub> de gemcitabina y docetaxel en líneas celulares de retinoblastoma

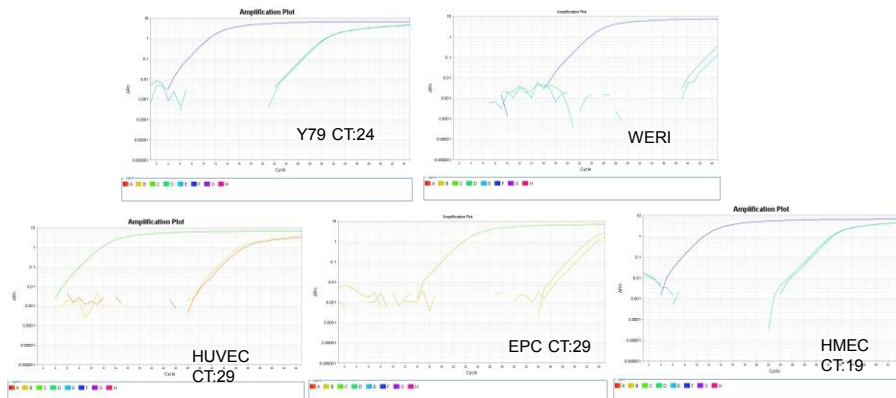
Línea celular	Gemcitabina	Docetaxel
Y79	2.2nM (1.7-3.6)	87.7nM (77.3 -103.6)
WERI-Rb1	7.1nM (6.6-9.7)	110.0nM (62.8 – 123.6)

Una vez determinada la IC<sub>50</sub> de gemcitabina y docetaxel administrados individualmente, se iniciaron los ensayos de combinación gemcitabina-docetaxel en la línea células de retinoblastoma Y79.

El análisis de los isobogramas demostró que la combinación docetaxel+IC<sub>25</sub>gemcitabina produce principalmente un efecto antagónico, obteniéndose un índice de combinatoria (CI) >1. Contrariamente, la asociación gemcitabina+IC<sub>25</sub>docetaxel produce principalmente una interacción sinérgica observándose un índice de combinatoria (CI) <1 tanto a la IC<sub>50</sub> de gemcitabina como a la IC<sub>90</sub>.

**Cinecalcet:** Evaluación de la expresión del receptor sensor de calcio (CaSR) por medio de qRT-PCR

Se muestran las curvas de amplificación de las líneas celulares de retinoblastoma, Y79 y WERI-Rb1, y las líneas endoteliales humanas, HUVEC, EPC y HMEC. Observamos que CaSR se expresa en todas las líneas endoteliales y en una de las líneas de retinoblastoma, Y79. No se expresa en WERI-Rb1.



## DISCUSIÓN/CONCLUSIONES/RECOMENDACIONES

El presente estudio abordó la caracterización de cuatro drogas con actividad contra el retinoblastoma, utilizadas en diferentes esquemas terapéuticos, con el fin de evaluar potencial efecto antitumoral y antiangiogénico *in vitro*. Utilizamos dos quimioterápicos comúnmente utilizados en el tratamiento del retinoblastoma (topotecan y melfalan) y otros agentes con evidencias clínicas en otros tumores pediátricos (docetaxel y gemcitabina), pero desde la perspectiva de la evaluación de nuevos esquemas de tratamiento con potencial aplicación y traslación a la terapéutica humana. La intención fue comparar el esquema convencional de administración, una única dosis, con el esquema metronómico, en el cual se utilizan dosis menores y consecutivas en el tiempo.

En el informe de beca de formación inicial en investigación se reportaron los valores obtenidos de la IC<sub>50</sub> de topotecan y melfalan en líneas celulares de retinoblastoma y el efecto antiangiogénico en 3 líneas endoteliales en el tratamiento convencional. Ahora bien, bajo un esquema de tratamiento metronómico, se comprobó la reducción significativa de la IC<sub>50</sub> de topotecan y melfalan respecto del tratamiento convencional en todas las líneas celulares evaluadas, tanto de retinoblastoma como endoteliales. Esto en parte, concuerda con publicaciones previas que reportaban la actividad antitumoral de topotecan bajo las pautas clínicas de uso "protracted" en la terapéutica clínica (dosis total administrada en 5 días consecutivos). Sería interesante evaluar en un modelo *in vivo* el tratamiento metronómico del retinoblastoma con topotecan y melfalan respecto del convencional en cuanto a control de la masa tumoral y dosis utilizadas.

En los estudios de apoptosis se pudo verificar el valor de IC<sub>50</sub> previamente establecido por los ensayos colorimétricos, observando que en todos los casos la apoptosis sería uno de los mecanismos por el cual, topotecan y melfalan, inducen muerte celular. En cuanto a los de tinción diferencial, luego del tratamiento metronómico o convencional con topotecan o melfalan, trabajando a la IC<sub>50</sub> y a 100µM (una concentración lo suficientemente alta para producir la muerte celular), se observaron valores similares a los obtenidos previamente por citometría de flujo.

Al estudiar la expresión del antígeno nuclear Ki-67 en las líneas celulares de retinoblastoma (Y79 y WER-Rb<sub>1</sub>), bajo tratamiento convencional y metronómico, con topotecan o melfalan, se observó una tendencia de las células tratadas con respecto al control, de quedar arrestadas en la fase S/G<sub>2</sub>/M. Esta tendencia fue más marcada en la línea celular Y79. Esto podría estar relacionado con el mecanismo de acción de la droga que podría producir un fallo en la replicación del material genético impidiendo que la célula supere los puntos de control del ciclo celular.

Además, en la búsqueda de nuevos agentes quimioterápicos, se presentan los avances obtenidos en los estudios de citotoxicidad de docetaxel y gemcitabina, en líneas celulares de retinoblastoma. Se determinó el valor de IC<sub>50</sub> convencional en las líneas celulares de retinoblastoma Y79 y WER-Rb<sub>1</sub>, que fueron respectivamente, para gemcitabina fue de 2.2nM y 7.1nM, y docetaxel de 87.7nM y 110.0nM. Así, comprobamos que ambas drogas presentan efecto citotóxico en el retinoblastoma.

Según reportes previos, la secuencia de administración afectaría la eficacia de la combinación. En estudios *in vitro* realizados en líneas celulares de carcinoma de mama y sarcoma se observaron efectos sinérgicos al administrar gemcitabina seguido de docetaxel. Sin embargo Ricotti y col reportaron en líneas celulares de cáncer gástrico que docetaxel seguido de gemcitabina produce una interacción sinérgica mientras que gemcitabina seguida de docetaxel un efecto antagonista. Sumado a esto, nuestros resultados sugieren que la combinación gemcitabina seguida de docetaxel tendría un efecto sinérgico, mientras que la combinación contraria, tendría un efecto antagonista en líneas celulares de retinoblastoma. Si bien resta completar los ensayos de combinación docetaxel-gemcitabina en la línea celular de retinoblastoma WER-Rb<sub>1</sub>. se podría pensar que la secuencia óptima para la adición de estos fármacos sea específica para cada línea celular [9,18].

Siguiendo la premisa de que el desarrollo de resistencia a la quimioterapia está íntimamente relacionado con el esquema de tratamiento, se evaluó, por medio de RT-qPCR, la expresión de tres proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples drogas. Puntualmente PGP y MRP<sub>1</sub>, que se localizan en la membrana celular en distintos tejidos principalmente relacionados con la absorción, distribución y eliminación, pertenecen a una familia de transportadores conocidos como transportadores ABC (ATP-binding cassette). En la línea celular de retinoblastoma Y79 no se observaron diferencias significativas en la expresión de MRP<sub>1</sub> luego de ser tratadas con topotecan o melfalan en un

esquema convencional o metronómico. Asimismo, tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de P-gp para topotecan y melfalan bajo un esquema de tratamiento convencional. Si bien resta completar los estudios en los transportadores los resultados preliminares podría apoyar el uso de terapias metronómicas para reducir los efectos secundarios sin producir resistencia a la terapia respecto del uso de dosis convencionales a dosis máximas.

Por último, en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos determinamos la expresión del receptor sensor de calcio (CaSR) en todas las líneas celulares. Este conocimiento permitiría plantear una nueva línea de tratamiento que tenga como objetivo modular este receptor.

Como conclusión, los resultados obtenidos y presentados en este trabajo, demuestran el efecto citotóxico de las drogas estudiadas (topotecan, melfalan docetaxel y gemcitabina) poseen en las líneas celulares de retinoblastoma y endoteliales humanas.

Estos resultados son potencialmente trasladables a la terapéutica de nuestros pacientes con retinoblastoma, brindando una segunda línea de tratamiento.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carcaboso A.M., et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:3761-7.
2. Chantada GL, et al. *Pediatr Blood Cancer.* 2014; 61(5):821-6
3. Chantada GL., et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009,50:1492-6.
4. Clements MK, et al. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;44(5):411-6.
5. de Torres et al. *Cancer* 2009; 15: 115 (12) 2792-803.
6. Inomata M., Kaneko A. *Jpn J Cancer Res,* 1987, 78:858–68.
7. Koomagi R. et al. *Anticancer Res* 1999 Sep-Oct;19(5B): 4333-4336
8. Lehnert M. et al. *Eur J Cancer* 1996;32A(6): 912-920.
9. Leu KM, et al. *J Clin Oncol.* 2004; 1;22(9):1706-12.
10. Maki R. et al. *J Pediatr hematol oncol* 2007: 31:723-29.
11. Marr BP et al. *Br J Ophthalmol.* 2012
12. Moreno F. et al. *Pediatr Blood Cancer* 2004, April.11
13. Morrow ChS. et al, *Cancer, Principles and Practice of Oncology.* 4th Edition. Editado por VT DeVita, S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincott Company, Philadelphia 1993: 340-348
14. Navid F. et al. *Cancer* 2008: 15; 113(2):419-25.
15. Panetta J.C., et al. *Clin Cancer Res.*, 14(1): 318-325 (2008).
16. Pasquier E, et al. *Transl Oncol.* 2011 Aug;4(4):203-11
17. Penel N, et al. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012 Apr;82(1):40-50.
18. Ricotti L, et al. *Clin Cancer Res.* 2003;9(2):900-5.
19. Saylor RL, et al. *J Clin Oncol* 2001;19:3463-9.
20. Schaiquevich P, Buitrago E, et al. *Retina.* 2012;32:387-95
21. Scharovsky OG, et al. *Curr Oncol.* 2009;16:7-15.
22. Shen J et al. *Cancer Res.* 2009;15:69 (14):5885-92.
23. Tan B. et al. *Current Opinion in Oncology* 2000; 12: 450-458

# EL TEJIDO ADIPOSO COMO INTERMEDIARIO ENTRE LOS ESTADOS TIROIDEOS Y EL CÁNCER DE MAMA

**Leila Ester Zyla**

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo - IMBECU

**Director:** Rubén Walter Carón

## RESUMEN

El presente trabajo pretende evaluar el rol que juega el tejido adiposo abdominal y mamario de ratas hiper-, hipo- y eutiroideas, sobre el desarrollo de tumores mamarios inducidos con dimetilbenzantraceno (DMBA). Tanto el hipo- como el hipertiroidismo experimental modifican la incidencia, latencia y progresión del cáncer de mama (CaM) inducido en ratas. Se pueden distinguir tanto efectos directos de las hormonas tiroideas (HT) sobre el tumor, como acciones indirectas a través de otros órganos o sistemas que influyen sobre el mismo. Con el fin de investigar la participación del tejido adiposo como posible intermediario entre los estados tiroideos y el CaM, evaluamos cambios en la proliferación, adhesión y migración de células epiteliales tumorales y no tumorales mamarias incubadas con los medios condicionados (MC) de tejido adiposo abdominal (TAA) y mamario (TAM) provenientes de ratas hiper-, hipo- y eutiroideas con tumores mamarios inducidos previamente. Nuestros resultados permiten concluir que tanto el hipotiroidismo como el hipertiroidismo producen modificaciones en la capacidad del tejido adiposo de secretar factores solubles que modifican la proliferación, la adhesión y la migración de células mamarias normales y tumorales. El hipertiroidismo actuaría en una forma más general, ya que ambos TAA y TAM poseen efectos similares. En cambio, el hipotiroidismo produciría cambios específicos sobre el TAM.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the role played by the abdominal and mammary adipose tissue from hyperthyroid, hypothyroid and normal rats on the development of mammary tumors induced by dimethylbenzanthracene (DMBA). Both experimental conditions, hyperthyroidism and hypothyroidism, modify the incidence, latency and progression of mammary cancer (MCa) induced in rats. Both effects of the thyroid hormones on the tumors, direct and indirect (mediated by various organs and systems) can be observed. In order to investigate the participation of the adipose tissue as a mediator between the two thyroid conditions and MCa, conditioned media from abdominal or mammary adipose tissue from hyper-, hypo- and euthyroid rats with mammary tumors previously induced with DMBA was obtained. In a second step, there were assessed changes in proliferation, adhesion and migration of tumoral and non-tumoral mammary epithelial cells incubated with the different conditioned media. The results show that both hyper- and hypothyroidism change the capability of adipose tissue to produce soluble factors able to modify proliferation, adhesion and migration of normal and tumor cells. Hyperthyroidism has a more general effect, acting on both abdominal and mammary adipose tissues. On the contrary, hypothyroidism seems to produce more specific effects on the mammary adipose tissue.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama ocupa a nivel mundial uno de los primeros puestos en las estadísticas de mortalidad y es el más frecuente en las mujeres de los países desarrollados. En la Argentina, cada año, mueren aproximadamente 5.400 mujeres y se estima que se diagnostican alrededor de 17.000 casos nuevos. Según el Informe final julio 2010: diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales de la Organización Panamericana de la Salud, la tasa de mortalidad por CaM estandarizada por edad y por región, por cada 100.000 mujeres en el período 2003-2007 en Argentina fue de 22,4 y en Mendoza de 23,9 [5].

Numerosos estudios señalan la influencia de factores exógenos y endógenos, vinculados entre sí, sobre la inducción y progresión tumoral mamaria [14]:

Factores exógenos: ambientales, hábitos dietéticos inadecuados, sedentarismo, etc.

Factores endógenos: genéticos (BRCA, etc.), hormonales (prolactina, progesterona, estrógenos, GH, y sus receptores), de crecimiento (miembros de la familia de los factores de crecimiento tipo insulina – IGF- o la familia de los factores de crecimiento epiteliales –EGF-), y celulares relacionados con procesos de proliferación, supervivencia y muerte (p53, familia de bcl-2, bax).

El proceso de modernización y reestructuración socioeconómica en países desarrollados y en vías de desarrollo ha modificado los patrones nutricionales y de actividad física [25] favoreciendo un balance energético positivo y desarrollo de obesidad. La obesidad, definida como un excesivo acúmulo de grasa corporal, está adquiriendo las características de una auténtica pandemia, constituyendo uno de los principales retos actuales para la salud pública mundial [38].

Los estudios epidemiológicos señalan que la obesidad es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de tumores malignos aunque los mecanismos exactos de esta relación aún necesitan ser determinados [39, 40]. Los mecanismos potenciales mediante los cuales esta patología podría iniciar, promover o favorecer la progresión del CaM son la síntesis de estrógenos en el tejido adiposo, la acumulación de tóxicos ambientales como los xenoestrógenos, agentes mutagénicos lipofílicos y metales pesados en la masa grasa, el síndrome metabólico coexistente, elevados niveles de leptina, bajos niveles de adiponectina y una excesiva acumulación de grasas saturadas [15]. Además, las adipocinas (leptina y adiponectina), polipéptidos biológicamente activos producidos por el tejido adiposo, estarían ligadas a mecanismos carcinogénicos incluyendo angiogénesis, proliferación celular, metástasis e inhibiendo la apoptosis [30, 23, 26].

Otras patologías altamente frecuentes son los desórdenes tiroideos. Sus manifestaciones varían según el área geográfica y están determinadas principalmente por la disponibilidad de iodo en la dieta. Casi un tercio de la población mundial vive en áreas con deficiencia de iodo, localizadas principalmente en zonas montañosas del Sureste de Asia, Latinoamérica y África Central. Tradicionalmente, Mendoza ha sido considerada zona de bocio endémico. El hipotiroidismo es una patología 10 veces más frecuente en mujeres que en hombres y se incrementa con la edad [7]. La incidencia de enfermedad sintomática es aproximadamente del 3-4% en la población general y aumenta hasta un 13-14% entre individuos mayores de 64 años [6]. Una proporción significativa de sujetos padece tiroiditis autoinmune crónica asintomática y el 8% de las mujeres (10% de mujeres mayores de 55 años) y 3% de los hombres tienen hipotiroidismo subclínico [16]. Según estadísticas locales, en Mendoza la incidencia de hipotiroidismo clínico es de 1-3% y de enfermedad subclínica de 3,5 -5% creciendo hasta un 15-22% en personas mayores de 60 años. Por su parte, el hipertiroidismo también es una patología frecuente y su prevalencia es de 0,5-2% a nivel mundial y de 1,5% en Mendoza.

Los estudios epidemiológicos han aportado resultados conflictivos sobre la asociación entre desórdenes tiroideos o sus tratamientos y riesgo de CaM [14]. En los años 50, los investigadores clínicos reportaron que aunque el CaM rara vez ocurría en mujeres hipertiroideas, parecía ser más frecuente que lo esperado en mujeres hipotiroideas [18]. La causa de dicha relación era desconocida. En 1975, Itoh y Maruchi sugirieron que las mujeres japonesas con tiroiditis de Hashimoto tenían una mayor incidencia de CaM que las mujeres sin enfermedades tiroideas [37]. Estos datos fueron confirmados pocos años después por investigadores europeos [2]. Contrariamente, Cristofanilli y colaboradores observaron que las pacientes con hipotiroidismo primario tenían un 61% de reducción del riesgo de desarrollar CaM invasivo, y aquellas que desarrollaron el tumor cursaron con una enfermedad más indolente y neoplasias más pequeñas [36].

Por su parte, dos estudios [21, 3] encontraron una asociación entre la administración de HT y el aumento de CaM. Los resultados de estudios epidemiológicos con respecto al hipertiroidismo en relación al CaM son poco claros y parecen depender de la inclusión de pacientes pre o post menopáusicas. Saraiva y colaboradores observaron una mayor incidencia de enfermedad tiroidea en pacientes con CaM que en controles (58 vs 18%,  $p < 0.05$ ) siendo el hipertiroidismo subclínico la

patología tiroidea más frecuentemente encontrada en pacientes post menopáusicas, no así en las pre menopáusicas [27].

Estudios experimentales [24, 9] y limitada evidencia clínica [19, 4] sostienen que las HT en concentraciones fisiológicas favorecerían la proliferación de células tumorales. El efecto proliferativo de las HT in vitro ha sido demostrado en células de glioma [29], en líneas celulares de CaM humano [9] y en cáncer de tiroides humano [24]. Específicamente, estudios con líneas celulares de CaM, han sugerido que las HT aumentarían la proliferación celular al activar la vía de la MAPK y modificarían la expresión genética [10].

Tanto el hipo como el hipertiroidismo tienen un alto impacto sobre el metabolismo y sus efectos sobre la síntesis, degradación y acumulación de lípidos han sido grandemente estudiados. Recientemente hemos demostrado que el hipotiroidismo experimental en ratas aumenta la cantidad de grasa del panículo mamario y la proporción de grasa abdominal con respecto a los animales eutiroideos o hipertiroideos. Sin embargo, las ratas hipotiroideas tienen un tipo disfuncional de grasa, al menos en lo que se refiere a la producción de leptina [35].

El tejido adiposo es un órgano endócrino bioactivo [33, 12] que no solamente secreta factores solubles sino que también contribuye de manera significativa a la composición de la matriz extracelular. Específicamente, el tejido adiposo tiene la capacidad de secretar numerosos mediadores inflamatorios tales como ILs (IL-1 $\beta$ , IL-6 y IL-10), quimocinas (IL-8 o CXCL8, CCL2 o MCP-1 y CXCL10) y factores de crecimiento (HGF, factor de crecimiento neural, VEGF y TNF $\alpha$ ). El tejido adiposo visceral es diferente del tejido adiposo periférico dado que elabora un conjunto único de factores de crecimiento y citoquinas [20]. Estudios recientes han demostrado que los factores de crecimiento y citoquinas secretadas por el tejido adiposo tienen un impacto significativo sobre la progresión de diferentes enfermedades, incluyendo el CaM [12, 31,17, 8, 22, 13]. Los adipocitos constituyen el tipo celular estromal predominante en el microentorno del tejido mamario [11], y están presentes en forma de preadipocitos, adipocitos maduros, y adipocitos en estadios de diferenciación intermedios. Recientemente se ha demostrado la importancia de los adipocitos estromales en el desarrollo normal de la glándula mamaria [1]. Asimismo, en los últimos años varios grupos han demostrado la importancia del diálogo que se establece en el frente invasivo, entre las células tumorales y los adipocitos estromales [11, 32]. Las células tumorales serían capaces de modificar el fenotipo de los adipocitos, los cuales a su vez, estimularían el comportamiento agresivo y la invasión local del tumor [22]. Se ha propuesto la participación de algunos factores en este diálogo tales como leptina, adiponectina, COLVI, IL-6, HGF y VEGF.

En un estudio recientemente publicado [35] en ratas tratadas con DMBA a los 55 días de edad y transformadas en hiper- o hipotiroideas, se observó una mayor latencia de aparición de los tumores en hipotiroideas (142.3 $\pm$  23.7 días) con respecto a hipertiroideas (91.5 $\pm$ 3.4 días) y a eutiroideas (104.2 $\pm$ 6.5 días). La incidencia fue significativamente menor en hipotiroideas (12%) que en hipertiroideas (74%) y en eutiroideas (71%). La velocidad de crecimiento tumoral fue menor en los tumores de las ratas hipotiroideas comparado con los otros grupos ( $p < 0.05$ ). El aspecto histopatológico fue similar en los tres grupos siendo mayoritariamente de tipo ductal. Un incremento en la apoptosis ( $p < 0.05$ ), evaluada por índice apoptótico y por TUNEL, fue hallado en los tumores de las ratas hipotiroideas; mientras que no se observaron diferencias significativas en el índice mitótico. Los niveles séricos de estradiol y de leptina fueron menores en las ratas hipotiroideas comparadas con las eutiroideas ( $p < 0.05$ ). En conclusión, el menor desarrollo tumoral mamario observado en las ratas hipotiroideas podría deberse a un aumento en la apoptosis explicado por niveles séricos bajos de estradiol y de leptina. Interesantemente, el porcentaje de grasa tanto del panículo adiposo mamario como del compartimento visceral de las ratas hipotiroideas fue significativamente mayor a las eutiroideas, sugiriendo una disfunción del tejido adiposo sometido a niveles bajos de hormonas tiroideas.

Por otro lado, estudios preliminares de este laboratorio muestran una localización nuclear aberrante de la  $\beta$ -catenina en tumores mamaros provenientes de ratas hiper o eutiroideas asociado a una mayor progresión tumoral. En cambio, la localización normal de la  $\beta$ -catenina en la membrana plasmática observada en las ratas hipotiroideas se encuentra relacionada con un menor crecimiento tumoral [34]. Los cambios en la localización celular y la expresión de la  $\beta$ -catenina sugerirían la participación de esta proteína en la regulación del crecimiento de los tumores de las ratas hiper- y eutiroideas. Interesantemente, en concordancia con otros autores hemos observado que la leptina puede inducir acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina estimulando el desarrollo del tumor [34, 28] lo que

podría constituir otro mecanismo para explicar la menor progresión tumoral en las ratas hipotiroideas (que tienen niveles séricos bajos de leptina).

Las células epiteliales mamarias se encuentran en constante crecimiento, desarrollo y diferenciación. El estroma juega un rol clave en la regulación de estos cambios a través de factores solubles que son liberados al entorno, así como también a través de factores no solubles que están presentes en el propio estroma. Hemos demostrado que factores solubles y no solubles presentes en los diferentes estadios de diferenciación de la línea celular de preadipocitos murinos 3T3-L1, regulan de manera diferencial el crecimiento y la migración de células epiteliales mamarias normales (NMuMG) y tumorales (LM3) [8]. Asimismo, se demostró recientemente que los medios condicionados (MC) de explantes de tejido adiposo humano provenientes de mamas tumorales regulan la proliferación, adhesión y migración de líneas celulares epiteliales tumorales mamarias; a diferencia de los MC de explantes de tejido adiposo provenientes de mamas normales [35].

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Animales de experimentación***

Ratas hembras Sprague Dawley de 48 días de edad fueron aleatoriamente asignadas en uno de los siguientes grupos: ratas hipotiroideas (por la administración crónica de 0,01% de propiltiouracilo – PTU-, Sigma P3755, en el agua de bebida), ratas hipertiroideas (por la inyección s.c. de 0.25 mg/kg/día de levotiroxina (T<sub>4</sub>), Sigma T2376, durante cinco días a la semana con dos de descanso) y ratas eutiroideas como controles. Una semana después, todos los animales fueron tratados por vía oral con una única dosis del cancerígeno DMBA (15 mg/rata). Se tuvieron en cuenta todos los controles necesarios, incluyendo aquellos a los que se les administró el PTU en el agua de bebida y levotiroxina a fin de revertir el hipotiroidismo, para descartar potenciales efectos directos del PTU, independientes de la disminución de hormonas tiroideas, sobre la tumorigénesis mamaria. A partir de los 30 días del tratamiento con DMBA las ratas fueron observadas diariamente durante 200 días o hasta la aparición de tumores palpables de mama.

### ***Toma de muestras:***

Todos los animales fueron pesados semanalmente y observados diariamente durante 200 días o hasta la aparición de tumores palpables en la mama. Se utilizó un calibre para medir los diámetros mayor (DM) y menor (dm) cada 72 hs y calcular el volumen tumoral ( $VT=dm \times DM/2$ ). La progresión tumoral fue evaluada mediante la velocidad de crecimiento ( $Vel=VT/[\text{día de sacrificio-día de detección}]$ ).

Se determinaron la latencia, la incidencia y la progresión de los tumores mamarios. La latencia fue considerada como el tiempo transcurrido desde la administración del DMBA hasta la aparición del primer tumor. La incidencia fue calculada como el porcentaje de ratas que presentaron tumores dentro del período estudiado.

Los animales fueron sacrificados por decapitación cuando el volumen tumoral alcanzó los 1000 mm<sup>3</sup> o al final del experimento en el día 200 post DMBA. En ese momento, se colectó sangre troncal para realizar los dosajes hormonales y se extrajeron la grasa intra-abdominal (TAA), la grasa peritumoral (TAM), los tumores y el tejido mamario normal.

La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y el suero separado fue mantenido a -20°C hasta el momento de los radioinmunoensayos (RIA). Se determinaron los niveles séricos de tetraiodotironina (T<sub>4</sub>) libre y total, y hormona estimulante de tiroideas (TSH) para confirmar los estados de hiper-, hipo- y eutiroidismo.

El TAA fue extraído, pesado y expresado como porcentaje del peso total. El TAM que rodea al tumor fue extraído con un margen no mayor a 1 cm.

Fragmentos de los diferentes tejidos adiposos obtenidos se incubaron durante 24 horas y se obtuvieron los MC a los cuales se les midió la concentración proteica con la técnica Micro BCA (Thermo Scientific). Luego, esos mismos fragmentos se fijaron en paraformaldehído y se preprocesaron para realizar los estudios histológicos e inmunohistoquímicos (IHQ). Los MCs se utilizaron para evaluar cambios en la proliferación, adhesión y migración de células epiteliales tumorales y no tumorales mamarias.

### **Metodología:**

Al momento del sacrificio se obtuvieron fragmentos de tejido adiposo visceral y de tejido adiposo mamario (que rodea al tumor, pero alejado no más de 1 cm del mismo). Este material fue procesado para obtener medios condicionados (MC) como se explica a continuación:

Inicialmente se lavó la muestra con PBS frío para remover células rojas. Luego se lavó el tejido adiposo con PBS a 37°C, se pesó y se colocó en una caja de Petri con medio de cultivo M199 (Invitrogen) suplementado con gentamicina 50 µg/ml (1g tejido/10 ml de M199). Después de la primera hora de cultivo se reemplazó el medio por medio fresco y se dejó incubando durante 24 horas. Se recolectó el medio condicionado, se centrifugó 3 min a 400g, se alícuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso. De esta forma se obtuvieron MC producidos por el tejido adiposo mamario (peritumoral) y abdominal de ratas hipo-, hiper- y eutiroides.

La actividad biológica de los MC se evaluó sobre las líneas tumorales mamarias MCF-7 (que expresan receptores de estrógenos), MDA-MB-231 (que no los expresan) y sobre una línea epitelial mamaria no-tumoral, MF-10A. Estas células fueron cultivadas en la forma habitual en medio DMEM F12 con 10% de suero fetal bovino (SFB) en estufa a 37°C con 5% de tensión de CO<sub>2</sub>. Al alcanzar el grado de confluencia apropiada para cada ensayo biológico, el medio de crecimiento fue reemplazado por el correspondiente MC, como se describe en los siguientes párrafos.

Se realizaron los siguientes ensayos biológicos:

**Ensayo de proliferación celular:** se determinó la proliferación de las células mamarias luego de ser incubadas por 24 y 48 horas con los diferentes MC obtenidos. Se utilizó el ensayo de MTT para células vivientes (Cell titer 96, AQ One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, EE.UU).

**Ensayo de cerrado de la herida:** para analizar la motilidad celular cultivos en monocapa confluentes de las distintas líneas se cortaron con una punta para pipetas de 200 µl. Después de realizar lavados con PBS para remover las células despegadas, se incubó con los MC o medio control. Los cultivos fueron observados y fotografiados inmediatamente luego del corte y después de 6, 12, 24 y 36 horas. Se utilizó el programa Image J (NIH) para cuantificar el área de la herida.

**Ensayo de adhesión:** Placas de 96 pocillos fueron cubiertas con 100 µl de los distintos MC durante 24 horas en estufa de cultivo. Los pocillos control fueron cubiertos con medio M199. Se realizaron tres experimentos por triplicado. Los pocillos luego fueron bloqueados con seroalbumina bovina a 37 °C durante 1 h. Después de lavar los pocillos con PBS, las células ( $5 \times 10^4$  células/pocillo) se resuspendieron en medio libre de suero y se sembraron para permitir adherirse a los pocillos cubiertos con MC, durante 1 h a 37 °C en estufa de cultivo. Luego de este tiempo las células no adheridas se aspiraron y los pocillos se lavaron con PBS. Se realizó luego un ensayo de MTT, como se describió antes.

### **Análisis de la información:**

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa GraphPad Prism 5 para Windows, versión 5.03 (GraphPad Software Inc.). Se analizaron las distintas variables para saber si se distribuyen normalmente, en cuyo caso se aplicaron pruebas paramétricas para la comparación entre grupos. Las variables que no respondieron a una distribución normal fueron comparadas mediante pruebas no-paramétricas o fueron transformadas mediante función logarítmica o similar. Para comparaciones múltiples se utilizó ANOVA I, o el test de Kruskal-Wallis en caso de variables no paramétricas. Se realizaron curvas de supervivencia de los animales y se compararon las fracciones de animales que sobreviven usando el método del producto límite de Kaplan-Meier o similar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA II y Bonferroni, o con la prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn, según la normalidad de la variable. Los porcentajes de incidencia se analizaron por el test de Fisher. La correlación entre los parámetros obtenidos y la velocidad de crecimiento tumoral se estimó estadísticamente mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson o de Spearman según la normalidad de la muestra. Todas las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para una probabilidad de error menor de 0.05.

## **RESULTADOS PRELIMINARES**

Se ha concretado la obtención del modelo animal empleado incluyendo todos los controles previstos en el proyecto original. Los estados tiroideos crónicos fueron evaluados mediante la medición de las concentraciones de TSH, T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> (Tabla 1). Las ratas tratadas con PTU (Hipo) presentaron bajas concentraciones circulantes de T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> y niveles de TSH elevados, todos ellos indicadores sensibles para el hipotiroidismo. Mientras, la administración de levotiroxina (Hiper) aumentó los valores de T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub>, y disminuyó la TSH circulante confirmando el estado de hipertiroidismo.

**Tabla 1.** Concentraciones séricas de TSH, T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> en ratas con diferentes estados tiroideos.

Se ha completado el estudio de la incidencia, la latencia de aparición de los tumores mamarios y la progresión tumoral, así como se han determinado la supervivencia, el porcentaje de grasa intraabdominal y la curva de crecimiento de las ratas utilizadas. Hemos observado que las ratas hipotiroideas tienen un tamaño y peso menores que las hipertiroideas y eutiroideas (Figura 1), no obstante las primeras tienen el mayor porcentaje de grasa intraabdominal (Figura 2). Estos resultados indican que el tratamiento con PTU es efectivo para producir un estado de hipotiroidismo, lo cual puede comprobarse con los valores de la Tabla 1.

**Figura 1.** Curva de crecimiento de los grupos estudiados. Las ratas hipotiroideas crecen en menor medida.

**Figura 2.** Porcentaje de grasa intraabdominal de los grupos empleados. Las ratas hipotiroideas tienen mayor porcentaje de grasa intraabdominal. Por otro lado vimos que el hipotiroidismo actuaría como factor protector frente al cáncer de mama en ratas, ya que no se generan tumores durante todo el experimento, las ratas hipotiroideas tienen la menor incidencia (Figura 3) y la mayor latencia de aparición de tumores (Figura 4). Estos resultados se acompañan de la curva de supervivencia (Figura 5).

**Figura 3.** Incidencia de tumores en los grupos experimentales. Las ratas hipotiroideas no generan tumores. La administración de levotiroxina aumenta la incidencia con respecto al grupo tratado solo con PTU.

**Figura 4.** Latencia de aparición de tumores. Las ratas hipotiroideas poseen la mayor latencia (tomado como el tiempo máximo de duración del experimento).

**Figura 5.** Curva de supervivencia. Las ratas hipotiroideas tienen mayor supervivencia. En cuanto a la velocidad de crecimiento de los tumores no se observó un comportamiento particular ligado a cada tratamiento, la progresión tumoral (Figura 6) no mostró cambios significativos.

**Figura 6.** Progresión tumoral. No se observaron cambios significativos en el crecimiento tumoral de los grupos que desarrollaron tumores. Recientemente se han realizado ensayos de proliferación sobre líneas celulares mamarias tumorales que expresan receptores de estrógeno (MCF-7), que no expresan (MDA-MB-231) y no tumorales (MCF-10A) incubándolas con MC provenientes de explantos de TAA y TAM de ratas con tumores de mama inducidos por DMBA. Las células incubadas con MC provenientes de animales hipertiroideos proliferan menos, independientemente de la línea celular y del tejido adiposo que dio origen al MC. También se puede apreciar que las células tratadas con MC provenientes de TAM de animales eutiroideos proliferan más que el resto.

**Figura 7.** Proliferación de las líneas celulares MCF-7 (A-B), MCF-10A (C-D) y MDA-MB-231 (E-F) incubadas durante 24 hs en MC de TAA y TAM. Las células incubadas con MC provenientes de animales hipertiroideos proliferan menos, independientemente de la línea celular y del tejido adiposo que dio origen al MC.

Se realizaron también ensayos de adhesión en las tres líneas celulares (Figura 8). No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en el ensayo con MC de TAA. Para el caso del ensayo con MC de TAM encontramos que la línea celular MCF-10A tratada con MC proveniente de animales hipertiroideos tienen mayor adhesión respecto a las tratadas con MC hipotiroideos e hipotiroideos con agregado de T<sub>4</sub>, siendo los primeros los que tienen menor adhesión. En el caso de las

MDA-MB-231 vemos que los MC provenientes de animales hipertiroideos permiten una mayor adhesión respecto al resto de los grupos experimentales. Para la línea celular MCF-7 no encontramos diferencias significativas.

**Figura 8.** Porcentaje de células MCF-7, MCF-10A y MDA-MB-231 adheridas tras 1 hora de tratamiento con MC de TAA (A) y TAM (B, C y D).

Se han completado los experimentos de migración mediante la técnica del cierre de herida y las fotografías están siendo cuantificadas para su análisis estadístico (Imágenes no mostradas).

Finalmente, se midieron las concentraciones de proteínas totales de los MC obtenidos a lo largo del estudio (Figura 9). Los provenientes de ratas hipotiroideas contienen la menor concentración proteica.

**Figura 9.** Concentración proteica de los MC obtenidos a partir de TAA y TAM.

## CONCLUSIONES

El tratamiento crónico con PTU retardó significativamente el crecimiento de los animales en comparación con los Hiper y los controles: eutiroideos (EUT) y los animales que recibieron PTU en el agua de bebida + levotiroxina s.c. (Hipo+T<sub>4</sub>) a fin de revertir el hipotiroidismo (Figura 1). Las ratas Hipo aumentaron de peso corporal de manera similar a las demás ratas durante las primeras cuatro semanas de tratamiento con PTU. Luego, mantuvieron el peso estable hasta el final del experimento siendo la diferencia significativa con los otros tres grupos. Las Hiper ganaron peso de manera constante y similar a las EUT e Hipo+T<sub>4</sub>. No obstante, la composición corporal de los animales fue diferente ya que el porcentaje de grasa intraabdominal en ratas Hipo fue significativamente mayor en comparación con los otros estados tiroideos (Figura 2).

Las ratas Hipo no desarrollaron tumores (0%) durante el periodo estudiado. La incidencia fue significativamente menor en las ratas Hipo+T<sub>4</sub> (63%) comparado en las Hiper (89%) y en EUT (86%) (Figura 3). La latencia de aparición de los tumores en las ratas Hipo (250 días o fin de experimento) fue mayor que la de las Hipo+T<sub>4</sub> (92.5 + 6.88 días), Hiper (133.1+ 18.7 días) y EUT (139.8 + 15.93 días) (Figura 4), resultando en una mayor supervivencia libre de tumores de los animales tratados con PTU únicamente (Figura 5). La velocidad de crecimiento tumoral no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos que desarrollaron tumores (Figura 6). El tratamiento con T<sub>4</sub> de las ratas Hipo, permitió revertir parcialmente los efectos del PTU. Estos resultados epidemiológicos nos permiten concluir que el hipotiroidismo actuaría como factor protector frente al cáncer de mama en ratas, ya que no se generan tumores durante todo el experimento aportando una mayor sobrevida a los animales.

Las células epiteliales mamarias se encuentran en constante crecimiento, desarrollo y diferenciación. El estroma juega un rol clave en la regulación de estos cambios a través de factores solubles que son liberados al entorno, así como también a través de factores no solubles que están presentes en el propio estroma. Se realizaron ensayos de proliferación sobre líneas celulares MCF-7, MCF-10A y MDA-MB-231 incubándolas con MC provenientes de TAA y TAM de ratas con diferentes estados tiroideos. Los MC provenientes de TAA de ratas Hiper redujeron significativamente la proliferación de las células MCF-7, MCF-10A y MDA-MB-231 a las 24 horas de tratamiento (Figura 7A, C y E respectivamente). En forma similar, los MC de TAM de las ratas Hiper inhibieron la proliferación de dichas células (Figura 7B, D y F), también lo hacen los MC provenientes de ratas Hipo sobre las líneas celulares MCF-7 (Figura 7B y D).

Estos resultados permiten concluir que tanto el hipotiroidismo como el hipertiroidismo producen modificaciones en la capacidad del tejido adiposo de secretar factores solubles que modifican la proliferación de células mamarias normales y tumorales. Dicho efecto es observable in vitro a las 24 h de incubación y se hace aún más evidente a las 48 h (resultados no mostrados). El hipertiroidismo actuaría en una forma más general, ya que ambos TAA y TAM poseen efectos similares. En cambio, el hipotiroidismo produciría cambios específicos sobre el TAM.

En el caso del hipertiroidismo, los efectos observados in vitro no explican los resultados en el modelo in vivo, ya que no se observan cambios en los marcadores de proliferación de los tumores. Por



su parte, en el hipotiroidismo, estos resultados podrían dar cuenta de la escasa incidencia y de la aumentada latencia de aparición de los tumores mamarios observados in vivo.

En cuanto a las pruebas de adhesión, para los MC de TAA no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (Figura 8A). Los MC de TAM de ratas Hipo disminuyeron significativamente la capacidad de adhesión de las células MCF-10A y MDA-MB-231 con respecto al resto de los MC (Figura 8B y D). De forma similar actúan los MC de TAM de ratas Hipo + T<sub>4</sub> (Figura 8B y D). Los MC del mismo tejido adiposo provenientes de ratas Hiper aumentan la adhesión de las líneas celulares MCF-10A y MDA-MB-231 (Figura 8B y D), los MC de TAM de ratas EUT aumentaron significativamente la adhesión de las células MCF-10A comparado con la adherencia en los pocillos expuestos a los MC provenientes de ratas Hipo + T<sub>4</sub> (Figura 8B). En el caso de las células MCF-7 no se observan cambios significativos entre los diferentes estados tiroideos (Figura 8C).

Esto indicaría que los MC de las ratas Hipo contienen menor cantidad de factores estimuladores de la adhesión de células epiteliales mamarias tumorales mientras que los MC Hiper y EUT parecen facilitar más la adhesión de las células no tumorales. Dichas observaciones pueden confirmarse en la Figura 9A donde para los MC Hipo obtenidos de TAM se observa una menor concentración proteica y para los EUT una tendencia a poseer la mayor concentración de proteínas. Esta menor concentración proteica es probablemente debida al estado de hipotiroidismo ya que este grupo de ratas no desarrolló tumores mamarios.

En cuanto a los ensayos de cerrado de la herida, para analizar la migración celular, se encuentran en fase de realización y análisis estadístico (datos no mostrados).

Como trabajo futuro y con el fin de continuar investigando la participación del tejido adiposo como posible intermediario entre los estados tiroideos y el CaM, evaluaremos la composición de los MC de tejido adiposo abdominal y mamario provenientes de ratas hiper-, hipo- y eutiroideas con tumores mamarios inducidos previamente con DMBA. Para ello, los MC obtenidos a partir de dichos tejidos serán evaluados mediante técnicas proteómicas. Ello corresponde al objetivo específico del proyecto presentado como continuación de la presente beca.

La dilucidación del papel desempeñado por el tejido adiposo en los distintos estadios tiroideos sobre la carcinogénesis mamaria puede tener implicancias importantes en el manejo del CaM en mujeres hipo e hipertiroideas. Igualmente, la identificación de los factores que participan como protectores o promotores puede aportar información para el diseño de herramientas terapéuticas novedosas.

El presente trabajo se ha realizado con total financiamiento del INC, subsidio número 11 según resolución 493/14 del Ministerio de Salud de la Nación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Cleary MP, Grande JP, Juneja SC, Maihle NJ. Diet induced obesity and mammary tumor development in MMTV-neu female mice. *Nutr Cancer* 2004; 50:174-80.
- 2) Cristofanilli M, Yamamura Y, Kau SW, Bevers T, Strom S, Patangan M, *et al.* Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer* 2005; 103:1122-8.
- 3) Davis FB, Tang HY, Shih A, Keating T, Lansing L, Hercborgs A, *et al.* Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Res* 2006; 66:7270-7275.
- 4) Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, *et al.* Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* 2001; 71:2455-2465.
- 5) Dong G, Callegari EA, Gloeckner CJ, Ueffing M, Wang H. Prothymosin- $\alpha$  interacts with mutant huntingtin and suppresses its cytotoxicity in cell culture. *J Biol Chem* 2011; 287: 1279-1289.
- 6) Dong G, Callegari EA, Gloeckner CJ, Ueffing M, Wang H. Mass spectrometric identification of novel posttranslational modification sites in Huntingtin. *Proteomics* 2012; 12: 2060-2064.
- 7) Ellerker AG. Thyroid disorders and breast cancer. A causal connection? *Med Press* 1956; 235:280-282.
- 8) Finley DS, Calvert VS, Inokuchi J, Lau A, Narula N, Petricoin EE, *et al.* Periprostatic adipose tissue as a modulator of prostate cancer aggressiveness. *J Urol* 2009; 182: 1621-1627.
- 9) Furuya F, Hanover JA, Cheng SY. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:1780-1785.
- 10) Hall LC, Salazar EP, Staci RK, Liu N. Effects of Thyroid hormones on Human Breast Cancer cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 109:57-66.
- 11) Han C, Zhang HT, Du L, Liu X, Jing J, Zhao X, *et al.* Serum levels of leptin, insulin and lipids in relation to breast cancer in china. *Endocrine* 2005; 26:19-24.
- 12) Housa D, Housova J, Vernerova Z, Haluzik M. Adipocytokines and cancer. *Physiol Res* 2006; 55:233-44.
- 13) Itoh K, Maruchi N. Breast cancer in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Lancet* 1975; 2:1109-1112.
- 14) Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA, *et al.* Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest* 2005; 115: 1163-76.
- 15) Kapdi CC, Wolfe JN. Breast cancer. Relationship to thyroid supplements for hypothyroidism. *JAMA* 1976; 236(10):1124-7.
- 16) Landskroner-Eiger S, Park J, Israel D, Pollard JW, Scherer PE, *et al.* Morphogenesis of the developing mammary gland: stage-dependent impact of adipocytes. *Dev Biol* 2010; 344: 968-978.
- 17) Lester SC, Cotran RS. La mama. En: Coltram RS, Kumar V, Collins T, Editores. *Patología estructural y funcional*. Editorial Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, 1999; p1137-1164.
- 18) Lin HY, Tang HY, Shih A, Keating T, Cao G, Davis PJ, *et al.* Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids* 2007; 72:180-187.
- 19) López Fontana C, Martínez González MA, Sánchez-Villegas A, Martínez, JA. Influencia de la pérdida de peso y la actividad física sobre factores de riesgo cardiovasculares de mujeres obesas. *Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN)* 2006; 2 (1), on line.
- 20) López-Fontana CM, Sasso CV, Maselli ME, Santiano FE, Semino SN, Cuello Carrión FD, *et al.* Experimental hypothyroidism increases apoptosis in dimethylbenzanthracene induced mammary tumors. *Onc Rep* 2013; 30:1651-60.
- 21) Marimuthu A, Feng W, Tagami T, Nguyen H, Jameson JL, Fletterick RJ, *et al.* TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor co repressor. *Mol Endocrinol* 2002; 16:271-286.
- 22) Markowska A, Malendowicz K, Drew K. The role of leptin in breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25:192-4.
- 23) Mustacchi P, Greenspan F. Thyroid supplementation for hypothyroidism. An iatrogenic cause of breast cancer? *JAMA* 1977; 237(14):1446-7.
- 24) OMS report. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Gêneva: WHO; 2000.
- 25) Park J, Euhus DM, Scherer PE. Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocrine Reviews* 2011; 32: 550-570.
- 26) Perera CN, Chin HG, Duru N, Camarillo IG. Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insight into leptin regulated mammary tumor growth and progression. *Journal of Endocrinology* 2008; 199: 221-8.
- 27) Pistone Creydt V, Fletcher SJ, Giudice J *et al.* Human adipose tissue from normal and tumoral breast regulates the behavior of mammary epithelial cells. *Clin Trans Oncology* 2013; 15:124-131.
- 28) Pistone Creydt V, Sacca PA, Tesone AJ, Vidal L, Calvo JC. Adipocyte differentiation influences the proliferation and migration of normal and tumoral breast epithelial cells. *Mol Med Report* 2010; 3:433-439.
- 29) Roberts GP, Ladenson PW. Hypothyroidism. *Lancet* 2004; 363:793-803.

- 30) Saraiva PP, Figueiredo NB, Padovani CR, Brentani MM, Nogueira CR. Profile of thyroid hormones in breast cancer patients. *Brazil J Med Biol Res.* 2005; 38(5):761-5.
- 31) Schaeffler A, Schoelmerich J and Buechler C. Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nature Clinical Practice* 2007; 3: 345-354.
- 32) Shering SG, Zbar AP, Moriarty M, McDermott EWM, O'Higgins NJ, Smith PPA. Thyroid disorders and breast cancer. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5:504-506.
- 33) Surmacz E. Obesity hormone leptin: a new target in breast cancer? *Breast Cancer Res* 2007; 9: 301.
- 34) Tang HY, Lin HY, Zhang S, Davis FB, Davis PJ. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology* 2004; 145:3265-3272.
- 35) Vanderpump MP, Tunbridge WM. Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 2002, 12: 839-47.
- 36) Vanderpump MPJ. *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. En: Braverman LE, Utiger RD, Editores. Werner and Ingbar's. JB Lippincott-Raven. 9na ed. Filadelfia; 2005. p 398-406.
- 37) Viniestra M, Paolino M, Arrossi S. Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. Informe final julio 2010: diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales. Organización Panamericana de la Salud, disponible en <http://www.msal.gov.ar/inc/publicaciones.php>
- 38) Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 28: 2745-2755.
- 39) Wang YY, Lehuédé C, Laurent V, Dirat B, Dauvillier S, Bochet L, *et al.* Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett* 2012; 324:142-151.
- 40) Wu Y, Kim JY, Zhou S, Smas CM. Differential screening identifies transcripts with depot-dependent expression in white adipose tissues. *BMC Genomics* 2008; 9: 397.

ANEXO

	Hipo	Hiper	Eut
TSH (ng/ml)	4.98 ± 0.43 <sup>**</sup>	0.52 ± 0.02 <sup>**</sup>	0.84 ± 0.06
T <sub>4</sub> (ng/ml)	20.96 ± 1.13 <sup>***</sup>	55.88 ± 6.93 <sup>*</sup>	33.29 ± 2.62
T <sub>3</sub> (ng/ml)	0.42 ± 0.06 <sup>*</sup>	0.91 ± 0.10 <sup>*</sup>	0.61 ± 0.06

Tabla 1. Concentraciones séricas de TSH, T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> en ratas con diferentes estados tiroideos.

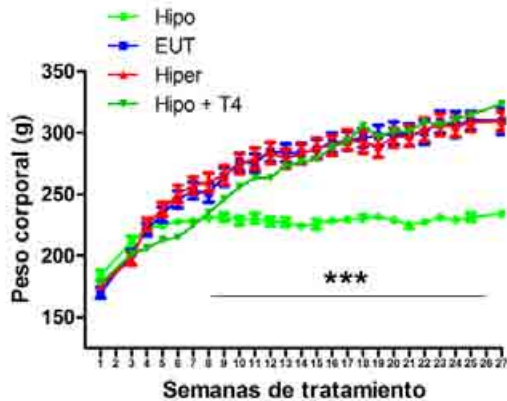


Figura 1. Curva de crecimiento de los grupos estudiados. Las ratas hipotiroideas crecen en menor medida.

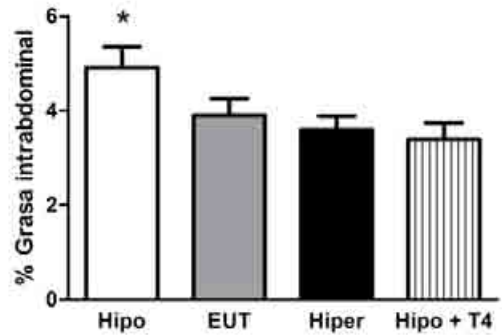


Figura 2. Porcentaje de grasa intraabdominal de los grupos empleados. Las ratas hipotiroideas tienen mayor porcentaje de grasa intraabdominal.

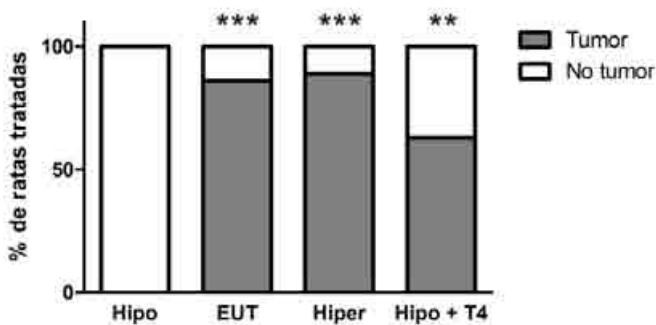


Figura 3. Incidencia de tumores en los grupos experimentales. Las ratas hipotiroideas no generan tumores. La administración de levotiroxina aumenta la incidencia con respecto al grupo tratado solo con PTU.

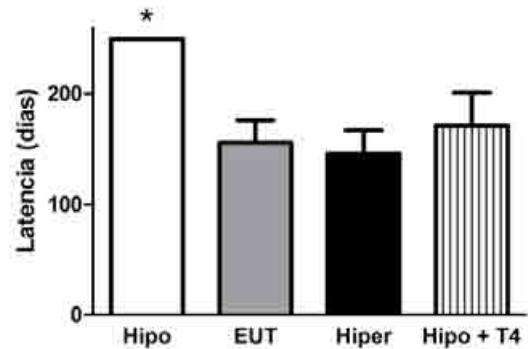


Figura 4. Latencia de aparición de tumores en los grupos utilizados. Las ratas hipotiroideas poseen la mayor latencia (tomado como el tiempo máximo de duración del experimento).



Figura 5. Curva de supervivencia. Las ratas hipotiroideas tienen mayor supervivencia.

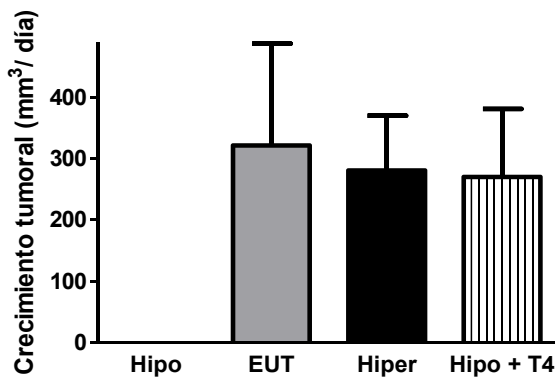


Figura 6. Progresión tumoral. No se observaron cambios significativos en el crecimiento tumoral de los grupos que desarrollaron tumores.

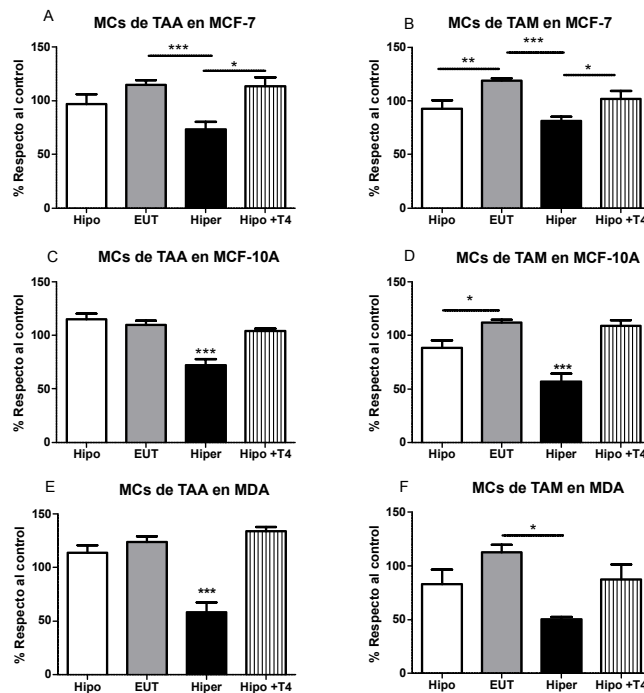


Figura 7. Proliferación de las líneas celulares MCF-7 (A-B), MCF-10A (C-D) y MDA-MB-231 (E-F) incubadas durante 24 h en MC de TAA y TAM. Las células incubadas con MC provenientes de animales hipertiroideos proliferan menos, independientemente de la línea celular y del tejido adiposo que dio origen al MC.

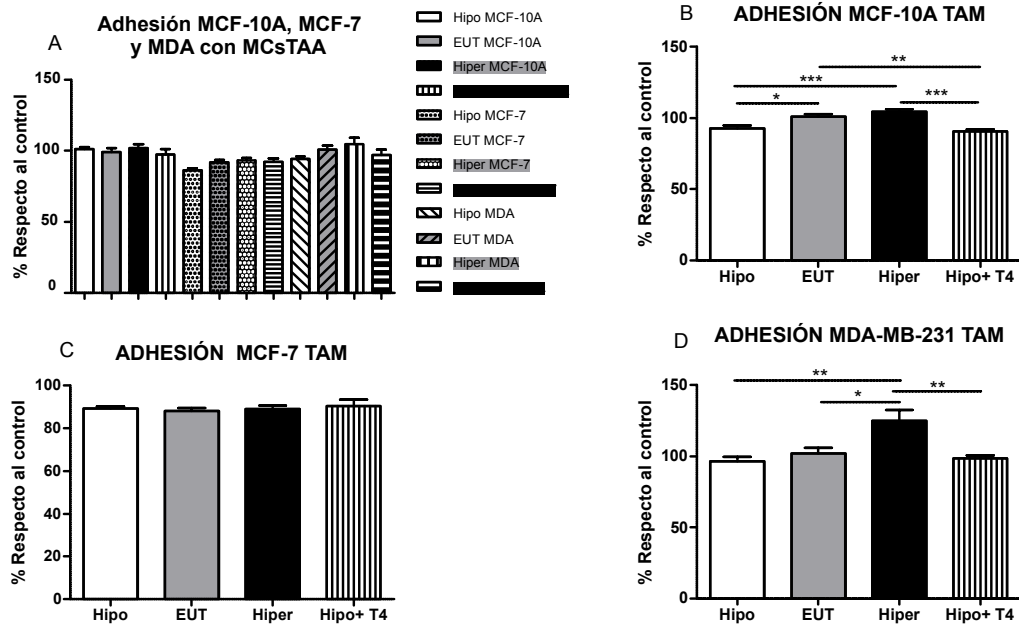


Figura 8. Porcentaje de células MCF-7, MCF-10A y MDA-MB-231 adheridas tras 1 hora de tratamiento con MC de TAA (A) y TAM (B, C y D).

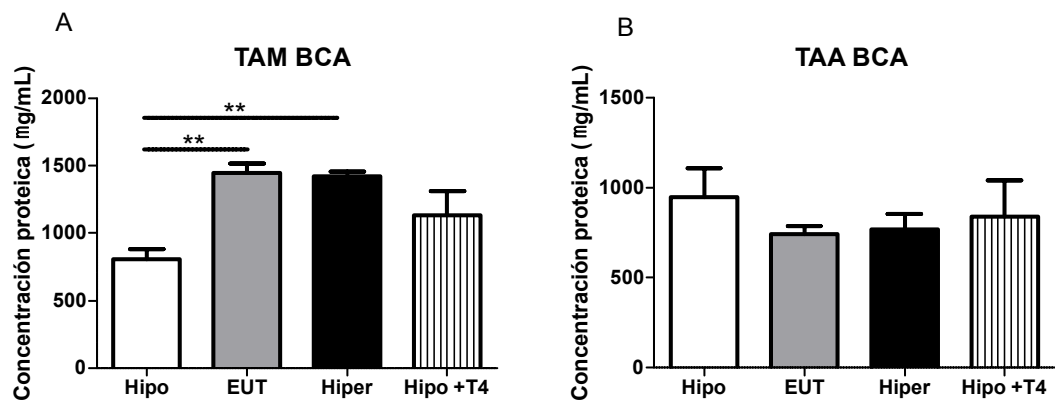


Figura 9. Concentración proteica de MC provenientes de TAM y TAA.

## RELACIÓN CÉLULA TUMORAL-MICROAMBIENTE EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

### ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE BCL-2 Y BECLIN-1 EN LA MUERTE CELULAR O SOBREVIDA INDUCIDA POR AUTOFAGIA

Melina del Valle Cloquell

Instituto Oncológico Universitario, Hospital Nacional de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba.

**Directora:** Cecilia María Rodríguez

#### RESUMEN

Autofagia es un proceso celular degradativo esencial, sin embargo ha demostrado un comportamiento dual en la progresión de tumores. **Objetivo:** estudiar el impacto de factores del microambiente tumoral en moléculas que participan de los mecanismos de autofagia, Bcl-2 y Beclin en LiB de pacientes con Leucemia Linfática Crónica (LLC) y su relación con factores de mal pronóstico, ZAP70 y CD38. **Métodos:** células mononucleares totales de pacientes con LLC fueron cultivadas con Rapamicina y CXCL12, la expresión de ZAP70 y CD38 y la modulación de la expresión de Bcl-2 y Beclin fue estudiada por Citometría de Flujo. La actividad autofágica se determinó por Western Blott e Inmunofluorescencia Indirecta. **Resultados:** la expresión de Bcl-2 disminuyó post estímulo con Rapamicina y aumentó en los cultivos con CXCL12, no hubo diferencias significativas en la expresión de Beclin con ambos estímulos. Los pacientes ZAP70 y CD38 positivos presentaron mayor expresión de Bcl-2 con respecto al grupo doble negativo. La presencia de autofagia se evidenció por medio de la conversión de LC3I a LC3II post Rapamicina. **Conclusión:** se observa un aumento en la expresión de Bcl-2 en pacientes con LLC que se correlaciona con la expresión de factores de mal pronóstico. Por otra parte, el tratamiento con Rapamicina podría impactar en factores que regulan la supervivencia de las células de LLC ya que indujo un aumento en la respuesta autofágica con una conjunta disminución de Bcl-2.

#### ABSTRACT

Autophagy is an essential degradation process; however, it has demonstrated a dual role in tumor progression. **Objective:** to study the impact of tumor microenvironment factors on molecules that participate in autophagy mechanisms, Bcl-2 and Beclin in B lymphocytes in patients with CLL and its relation with poor prognostic factors, ZAP-70 and CD38. **Methods:** total mononuclear cells were cultivated with rapamycin and CXCL 12, ZAP-70 and CD38 expression and the modulation of Bcl-2 and Beclin expression was studied by flow cytometry. Autophagic activity was determined by Western Blott and indirect immunofluorescence. **Results:** Bcl-2 expression decreased after rapamycin stimulation and increased with CXCL 12 stimulation, there were not major differences in Beclin expression with both stimulations. ZAP-70 and CD38 positive patients showed more expression of Bcl-2 respect to double negative group. The presence of autophagy was evident by means of LC3-I conversion to LC3-II. **Conclusion:** the increase in Bcl-2 expression was observed in patients with CLL and correlated with poor prognostic factors. Furthermore, rapamycin treatment could have an impact on factors that regulate CLL cell survival because it induced not only an increase in autophagic response but also a decrease in Bcl-2.

#### INTRODUCCIÓN

El desarrollo y progresión tumoral se sostiene a través de una estrecha interrelación entre las células neoplásicas y el estroma tumoral. Es ampliamente conocido que señales derivadas del microambiente, conducen a la progresión tumoral tanto en tumores sólidos como hematológicos [1-2]. La Leucemia Linfática Crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en personas adultas en

países occidentales. Esta neoplasia hematológica se caracteriza por su alta heterogeneidad clínica, alrededor del 30-40% de pacientes con enfermedad temprana progresan a estadios clínicos más avanzados con infiltración de médula ósea y órganos linfáticos secundarios [3].

Desde el punto de vista fenotípico, se caracteriza por la expansión clonal de Linfocitos B (LiB) CD5+/CD19+/CD23+ en sangre periférica (SP) [4]. Este pool de LiB circulantes se encuentran arrestados en fase Go/G1 del ciclo celular y se acumulan debido a fallas en la regulación de los mecanismos de apoptosis, entre los cuales se encuentran los altos niveles de expresión de Bcl-2 (proteína antiapoptótica). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que una proporción de LiB proliferan (0,1 -1% por día), tanto en médula ósea (MO) como tejido linfoide secundario (TLS), para lo cual los LiB migran repetidamente desde SP hacia MO y TLS donde contactan con células del microambiente como Fibroblastos (Fb), linfocitos T CD4, células tipo nodrizas o "nurse like cells" (NLC) y con factores solubles [5-6], recibiendo señales de sobrevida que promueven la progresión de la enfermedad [7]. El tráfico de los LiB hacia el microambiente especializado depende en gran medida de la secreción, por parte de las NLC, de CXCL12 o SDF-1, una quimiocina capaz de inducir la quimiotaxis, fosforilación de quinasas y aumentar la sobrevida de los LiB de LLC in vitro, jugando un importante rol en la recirculación y homing celular [8], por lo que el eje CXCR4-CXCL12 se ha convertido en un importante blanco terapéutico. Se ha demostrado también, la importancia de centros de proliferación de LiB neoplásicos en ganglio, bazo y médula ósea; sitios donde el contacto con las células endoteliales y LT del microambiente activan a los LiB a través de moléculas como CD38 y ZAP-70, promoviendo la proliferación y reforzando la resistencia a la apoptosis. La expresión de CD38 y ZAP-70 junto a un perfil de IgVH no mutado han surgido en los últimos años, como las herramientas de mayor valor pronóstico en la identificación de LLC agresivas [9].

La autofagia es un proceso degradativo activo por el cual las células remueven o reciclan proteínas de larga vida, lípidos y organelas, en respuesta al estrés celular, depleción de nutrientes, citoquinas, hipoxia, y daño oxidativo [10]. Estos componentes citoplasmáticos son capturados en autofagosomas y luego liberados al compartimiento lisosomal para ser degradados [11]. La autofagia es un proceso dinámico, de múltiples pasos que puede ser modulado tanto positiva como negativamente a distintos niveles. Ha sido considerada un proceso celular esencial y también reconocida su importancia en la progresión de tumores y sensibilidad de las células tumorales a la terapia [12-14]. Sin embargo, otros autores han demostrado dos funciones opuestas de la autofagia en la progresión de tumores [15]. Por un lado, permite a la célula neoplásica responder a cambios en las condiciones del medioambiente, prolongando su sobrevida. En contraposición, la autofagia puede inducir la muerte celular a través de una excesiva autodigestión y activación de la apoptosis, inhibiendo así la progresión del tumor. Más de 31 genes (ATG) y múltiples complejos de proteínas participan de los mecanismos de acción de la autofagia [16-17] entre ellas Beclin1, denominada inicialmente proteína de interacción con Bcl-2, es uno de los principales reguladores de autofagia. En condiciones basales Beclin se encuentra unido a Bcl-2/Bcl-XL y la disociación de estas proteínas es indispensable para la activación de la autofagia [18]. La pérdida alélica de Beclin altera los mecanismos de autofagia llevando al desarrollo de carcinomas hepatocelulares en ratones [19].

La Rapamicina, antibiótico macrólido lipofílico, es una de las drogas mejor caracterizadas en la activación de la autofagia, actuando a través de la inhibición de la quinasa mTOR (Target mamífero de Rapamicina) [20-23], arresta el crecimiento de determinados tipos de tumores. PI3K (fosfoinositol 3 quinasa)/AKT/mTOR es una vía de señalización clave en la modulación de la autofagia [12-14]. La activación de mTOR en respuesta a factores de crecimiento o altos niveles de nutrientes, suprime la autofagia (vía AKT y MAPK), mientras su inhibición la activa, vía AMPK y p53 [24].

El doble rol de la autofagia en la supresión y promoción de tumores representa un importante foco de investigación. El estudio de esta interrelación en la LLC ayudará a comprender su rol en la fisiopatología y progresión de la enfermedad.

Existen evidencias de que la expresión de Bcl-2 regula la respuesta autofágica dependiente de Beclin [26]. Por otra parte, factores del microambiente se han postulado como reguladores de la sobrevida en LiB de pacientes con LLC. Considerando lo anteriormente expuesto y resultados preliminares de nuestro grupo de investigación [27-28] se hipotetizó que existiría una relación entre la expresión de Bcl-2 y Beclin en LiB de LLC, la cual podría ser modificada por acción del microambiente tumoral impactando en la sobrevida de éstas células. En este proyecto se propuso



estudiar el impacto de factores del microambiente tumoral en moléculas que participan de los mecanismos de autofagia y muerte celular en LiB de pacientes con LLC, para lo cual se estudiaron los niveles basales de Bcl-2 y Beclin en LiB de LLC y su correlación con factores pronósticos clásicos como CD38 y ZAP-70. También se evaluaron los cambios en la expresión de Bcl-2 y Beclin en respuesta a activadores de autofagia como Rapamicina y finalmente se analizó el efecto de factores solubles del microambiente como CXCL12 en la expresión de Bcl-2 y Beclin.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Preparación de suspensiones de células mononucleares totales (CMT) para cultivo y criopreservación de las muestras.***

Sangre periférica (SP) de pacientes con LLC se obtuvieron en condiciones de esterilidad. Parte de estas muestras se utilizó para la obtención de suspensiones de CMT mediante centrifugación en gradiente de densidad (Histopaque-1077; Sigma Chemical Co.) para posterior cultivo y parte se resuspendió en SFB 20- DMSO y fueron criopreservadas en freezer a  $-180^{\circ}\text{C}$ . La viabilidad de las muestras criopreservadas se evaluó mediante citometría de flujo utilizando el colorante Ioduro de Propidio, las muestras con porcentaje de apoptosis mayores al 10% se descartaron.

### ***Análisis de Bcl-2 y Beclin por citometría de flujo***

Las (CMT) obtenidas de sangre periférica (SP) de pacientes con LLC fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales anti CD19-PERCP (BD) y CD5-APC (BD) durante 15 min. Fijadas, permeabilizadas (Intrastain Kit, DAKO) y finalmente marcadas con anti Bcl-2-FITC (DAKO, USA) y en otro tubo con anti Beclin-Dyligh488 (Novus Biologicals). Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo Facscalibur (BD Bioscience) y analizadas utilizando el programa Infinicyt. Se evaluó la intensidad de fluorescencia media (MIF) de Bcl-2 y Beclin en células CD19+/CD5+, correspondientes al clon leucémico. El mismo procedimiento se realizó en individuos normales del mismo grupo etario. La expresión de ZAP-70 y CD38 también se analizó por citometría de flujo en muestras de sangre entera, utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales anti ZAP-70 (clon 1E7.2, Cytognos) y anti CD38 APC (clon HB7 de BD). Según metodología descrita en la literatura (28-30).

### ***Cultivos de CMT y estimulación con Rapamicina y CXCL12***

Las CMT obtenidas en condiciones estériles, se contaron y cultivaron ( $5.0 \times 10^6$  células) en placas de 24 pocillos, en medio RPMI (Sigma Chemical Co.) suplementado con 5-10% de suero fetal bobino (SFB) y estreptomocina, en estufa de cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células en cultivo se trataron con y sin Rapamicina (Sigma-Aldrich) en distintas concentraciones (10, 50 o 100 ng/ml) durante 24, 48, 72 hs y 7 días. También se cultivaron  $5.0 \times 10^6$  células con y sin CXCL12 (10-100 ng/ml) durante 24, 48 y 72hs, 7 días. Se determinó el efecto, tanto de la Rapamicina como del factor soluble del microambiente CXCL12 sobre las células por medio de citometría de flujo utilizando la metodología anteriormente descrita. [31]

### ***Generación de células tipo nodrizas (NLC) en cultivos de CMT.***

Para la generación de las NLC, se cultivaron  $5-10 \times 10^6$  CMT de sangre periférica de pacientes con LLC en placas de 24 pocillos en RPMI-10%SFB, en estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , luego de 14 días de cultivo, las células no adherentes fueron removidas por lavado suave con Buffer Fosfato Salino (PBS) y las adherentes "NLC" (células grandes redondeadas) fueron despegadas cuidadosamente y caracterizadas fenotípicamente por citometría de flujo [31].

Para los co-cultivos, las células criopreservadas se re suspendieron en medio RPMI a una concentración de  $2.5 \times 10^6$  /ml células y posteriormente fueron cultivadas durante 2hs a  $37^{\circ}\text{C}$  en  $\text{CO}_2$  5%, para remover células adherentes por adherencia al plástico.

### ***Ensayo de Western Blotting para LC3 y Beclin***

La actividad autofágica en presencia o ausencia de Rapamicina se evaluó por medio de la conversión de la proteína LC3I a LC3II, a través de la técnica de Western Blott. Para ello se realizó la extracción de proteínas a partir de  $10 \times 10^6$ /ml células criopreservadas, obtenidas de cultivos de CMT

en medio solo o estimuladas con Rapamicina durante 24, 48 y 72 hs. Los lisados fueron sembrados (20  $\mu$ l/calle) en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12,5% y las proteínas resueltas en la corrida electroforética transferidas a membranas de nitrocelulosa. Para la determinación de LC3 y Beclin-1, las membranas se incubaron con anti-LC3 (Abgent rabbit) y anti-Beclin (Cell signaling), a 4°C durante 12 hs. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con TBS e incubaron con un anticuerpo secundario conjugado, durante 1 hora a T° ambiente. Como control de la reacción se utilizó la proteína constitutiva  $\beta$ -actina. La señal específica fue revelada y analizada por medio del sistema Odyssey Infrared Imaging System.

#### **Análisis estadístico de los datos**

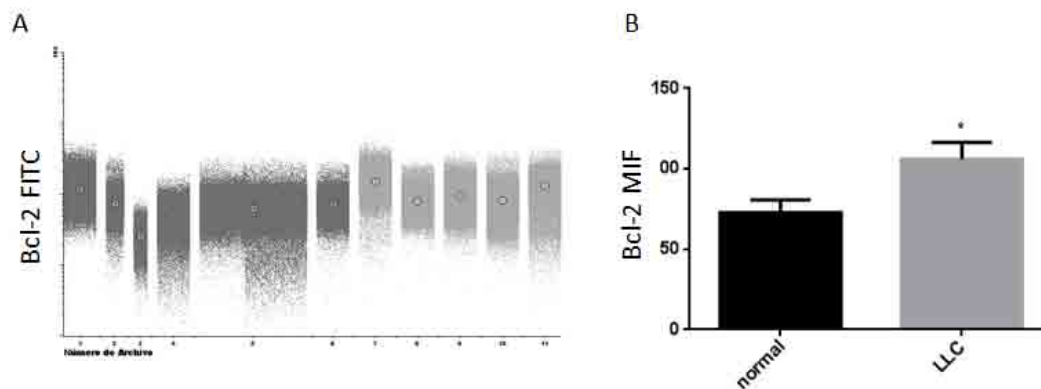
Para la determinación de la significancia estadística de los datos se utilizó el programa INSTAT con el apoyo de las herramientas de Excel (Microsoft). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando métodos paramétricos o no paramétricos según corresponda. El análisis de diferencias entre grupos se realizó a través del test T de Student para grupos independientes o datos apareados según corresponda. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **RESULTADOS PRELIMINARES**

#### **Expresión de Bcl-2 y Beclin en LiB de LLC y su correlación con la expresión de CD38 y ZAP-70.**

Se analizaron los niveles basales de Bcl-2 y Beclin en LiB en 13 pacientes (8 varones y 5 mujeres, rango de edad: 43 - 81 años) con LLC y en individuos normales. La intensidad de fluorescencia media (MIF) de Bcl-2 y Beclin en las poblaciones de LiB neoplásicos CD19/CD5+ y en LiB normales de individuos sanos se determinó por citometría de flujo.

Una expresión heterogénea de Bcl-2 fue observada entre los pacientes con LLC (Figura 1A). La MIF basal en los pacientes con LLC estudiados ( $n=13$ ) fue significativamente mayor ( $106,0 \pm 34,2$ ; media  $\pm$  SD) en relación a los valores obtenidos en LiB de individuos sanos ( $72,8 \pm 25,9$ ;  $p < 0,005$ , test t de Student) (Figura 1 B).



**Figura 1. Expresión de Bcl-2 en LiB de pacientes con LLC y en LiB de sujetos sanos. A)** Diagrama (Dot plot) de banda con las medianas representando la heterogeneidad de expresión de Bcl-2 en pacientes con LLC. **B)** Diagrama de barras donde se observa el aumento significativo de Bcl-2 (MIF) de los pacientes con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ).

El análisis de la expresión de Beclin en LiB de ambos grupos, no presentó diferencias significativas ( $p=0,07$ ; test t de Student).

De acuerdo a la expresión de ZAP-70 y CD38, se separaron los pacientes en 3 grupos, uno con ambos marcadores positivos, otro con ambos negativos y el tercer grupo con expresión discordante. Estos grupos fueron evaluados en relación a la intensidad de fluorescencia media de Bcl-2.

En la tabla 1, se observa que los pacientes ZAP-70(+) CD38 (+) presentaron una expresión mayor de Bcl-2 con respecto al grupo ZAP-70(-) CD38 (-), lo cual sugiere una posible asociación entre Bcl-2 y factores de mal pronóstico.

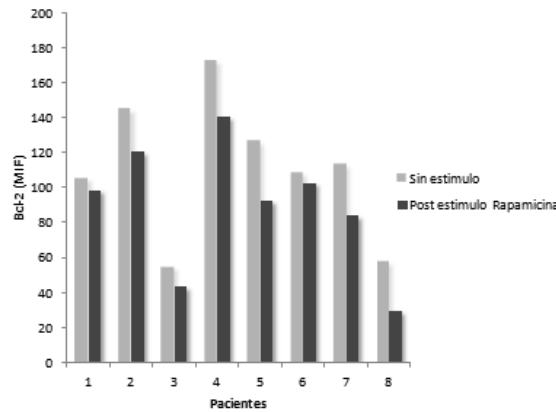
**Tabla I. Expresión de BCL-2 en pacientes ZAP-70(+) CD38 (+) y ZAP-70(-) CD38 (-)**

Pacientes totales n=11	Expresión de Bcl-2 (MIF) (Media ± SD )
ZAP-70 (+) CD38 (+) n=3	133,8 ± 25,5
ZAP-70 (-) CD38 (-) n=7	89,1± 24,7
Discordantes* n=1	125,9± 65,2

**Efecto de la Rapamicina sobre la expresión de Bcl-2 y Beclin en LiB de LLC.**

La expresión de Bcl-2 se analizó en LiB neoplásicos, luego del cultivo de CMT en presencia o ausencia de Rapamicina y los resultados se expresaron como MIF.

La expresión de Bcl-2 disminuyó en 8/13 pacientes estudiados luego de 72 hs posteriores a la incubación con Rapamicina (100nM) ( $117 \pm 37$  vs  $97 \pm 30$ ; pre y post Rapamicina;  $p \leq 0,05$ , test t apareado) (Figura2).



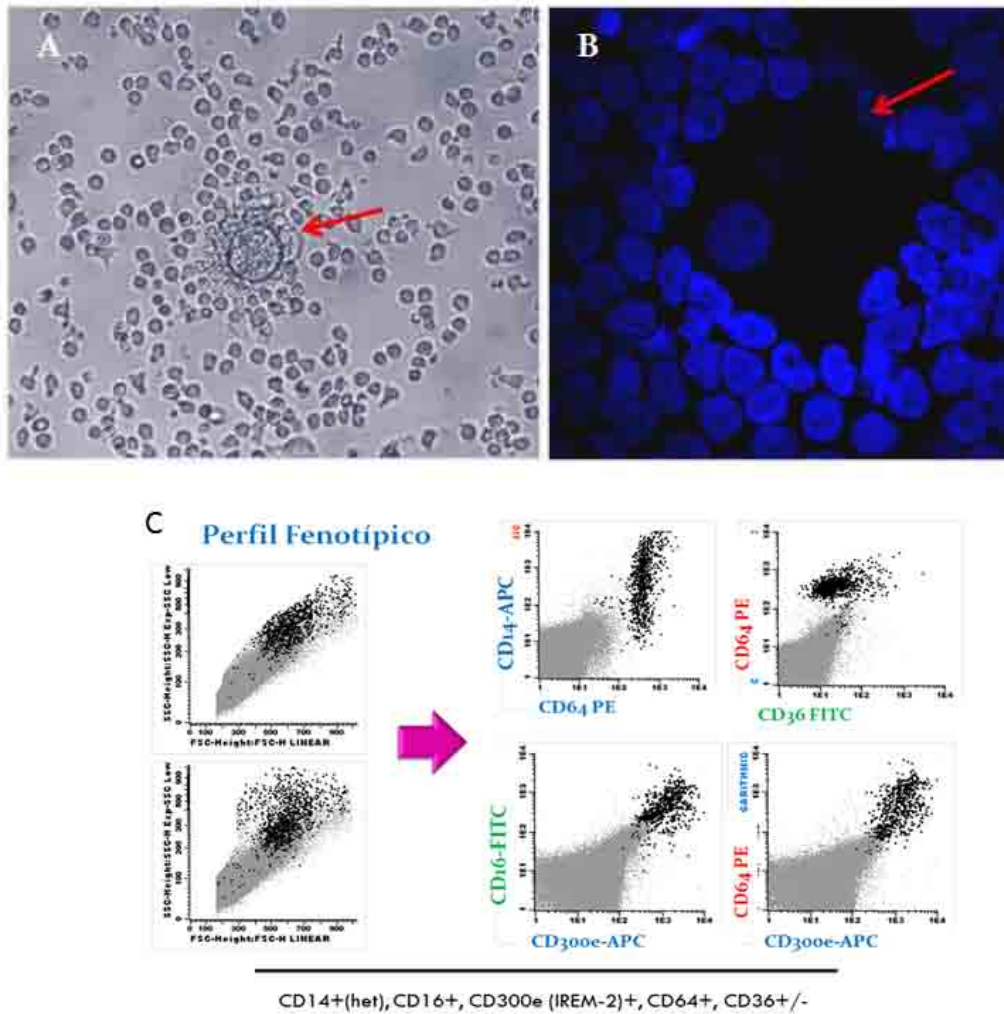
**Figura 2. Cambios en la expresión de Bcl-2, 72 hs posterior al estímulo con Rapamicina.** En 8/13 pacientes estudiados se observó una disminución en la expresión de Bcl-2.

Con respecto a la expresión de Beclin, no se observaron cambios luego de 72 hs post estímulo con Rapamicina.

**Obtención de NLC a partir de CMT y caracterización inmunofenotípica**

Con el fin de generar células nodrizas "NLC" a partir de CMT de pacientes con LLC, se cultivaron  $5-10 \times 10^6$  CMT obtenidas de sangre periférica en placa de 12 pocillos de acuerdo al método descrito por *Burger et al.* Luego de 4-5 días de cultivo se comenzó a observar el crecimiento de células grandes, redondas, adherentes, rodeadas de Linfocitos B pequeños (Figura 3 A). Luego de 14 días de cultivo, las células no adherentes fueron removidas y las adherentes (NLC), despegadas cuidadosamente para su caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo.

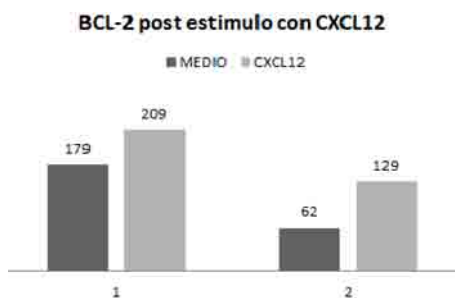
Se tipificaron las NLC utilizando los anticuerpos CD36, CD64, CD45, CD14 e IREM2 (CD300e) por citometría de flujo de 4 colores y se observaron morfológicamente por Microscopia de Epifluorescencia (Figura3).



**Figura 3. Generación de células tipo nodriza "Nurse Like Cells".** A) Microscopía de Contraste de fase, Nurse Like Cell (NLC), célula grande, redonda, rodeada de LiB-LLC B) Microscopía de Epifluorescencia. Núcleo de NLC y Li B-LLC coloreados con DAPI. C) Perfil inmunofenotípico, las NLC generadas a partir de cultivos de CMT de pacientes con LLC, presentaron características de alto FCS vs SSC (tamaño y complejidad citoplasmática) y el siguiente perfil inmunofenotípico: CD14+ heterogéneo, CD64+, CD16+, CD300 (IREM 2)+ y CD36+/- .

**Efecto de CXCL12 sobre la expresión de Bcl-2.**

Se evaluó el efecto del factor soluble CXCL12 sobre la expresión de Bcl-2 (MIF) en LiB de dos pacientes con LLC, luego de 24 hs de cultivo con CXCL12 (50 ng/ml) por medio de citometría de flujo en el clon leucémico CD19+/CD5+. En ambos pacientes se observó un aumento de BCL-2 después de la incubación con CXCL12.

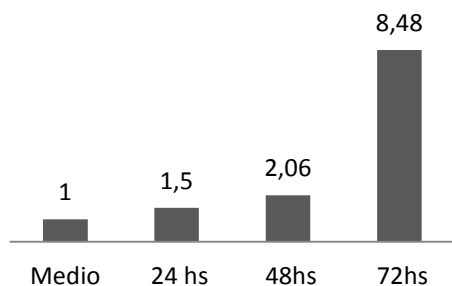


**Figura 4. Aumento de BCL-2 en dos pacientes cultivados con CXCL12.** Expresión basal de Bcl-2 (medio) en LB CD19+/CD5+ y post incubación con CXCL12 durante 24 hs. El N° sobre las columnas indica la MIF de BCL-2

### **Efecto de la Rapamicina en la Autofagia por conversión de LC3I a LC3II.**

Se evaluó la conversión de la proteína LC3I a LC3II, como reflejo de la actividad autofágica celular, en presencia de Rapamicina durante 24, 48 y 72 hs, por medio de la técnica de Western Blott, observándose un aumento progresivo de la banda LC3II a las 24, 48 y 72 hs post estímulo en relación a las células sin estímulo (medio) (Figura 5).

Aumento de LC3II con Rapamicina



**Figura 5. WB de un paciente post estímulo con Rapamicina.** Se graficó las veces de aumento de LC3II post estímulo con Rapamicina con respecto a las células sin estímulo (medio), normalizado con  $\beta$ -actina.

### **DISCUSIÓN**

Autofagia y apoptosis son vías catabólicas esenciales para la homeostasis del organismo. La autofagia es una vía de supervivencia normal que implica la degradación y reciclaje de las moléculas dañadas. Sin embargo, el exceso de la misma ha sido implicado en la muerte celular inhibiendo así la progresión de tumores. Se ha demostrado que autofagia y apoptosis están interconectadas por medio de moléculas claves, las cuales regulan ambas vías.

La Rapamicina es una de las drogas mejor caracterizada en la activación de la autofagia, actuando a través de la inhibición de la quinasa mTOR, arresta el crecimiento de determinados tipos de tumores, sin embargo no se conoce exactamente su rol en pacientes con LLC [20-23]. Existen evidencias de que la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 regula la respuesta autofágica dependiente de Beclin [25]. En este trabajo estudiamos el efecto de la inhibición de mTOR con Rapamicina en la expresión de moléculas involucradas tanto en la Apoptosis como Autofagia, Bcl-2 y Beclin. Observamos un aumento significativo en los niveles basales de Bcl-2 en LB de pacientes con LLC respecto a LB de individuos sanos [31], mientras no hubo diferencias significativas en la expresión de Beclin entre ambos grupos. La expresión de Bcl-2 fue heterogénea entre pacientes y se observó una asociación entre factores de mal pronóstico como la doble positividad de ZAP-70 y CD38 con mayor expresión de Bcl-2, a pesar de que algunos autores han demostrado que Bcl-2 no es un factor determinante en el comportamiento clínico agresivo o indolente de la LLC, ya que este puede modificarse por diferentes estímulos como los inducidos por el microambiente [31]. En este trabajo, si bien el número de pacientes estudiados fue bajo se puede observar una asociación entre altos niveles basales de Bcl-2 y factores de mal pronóstico.

Hay evidencias de que Bcl-2, no solo funciona como proteína antiapoptótica, también es antiautofágica a través de la interacción inhibitoria con Beclin. Esta función antiautofágica podría ayudar a mantener niveles de autofagia compatibles con mayor sobrevida celular, más que con la muerte celular [32]. Si bien en los cultivos con Rapamicina, se observó una disminución de Bcl-2 en 8/13 pacientes, no se observaron cambios en la expresión de Beclin medido por citometría de flujo aunque algunos autores han reportado el aumento de Beclin-RNA por métodos moleculares [33]. Los ensayos de Western Blott permitieron evidenciar la actividad autofágica de los LiB de LLC, por conversión de la banda LC3I en LC3II ante el estímulo con Rapamicina.

Los LB neoplásicos de LLC, expresan altos niveles del receptor CXCR<sub>4</sub>, lo cual le permite interactuar con el Factor Derivado del Estroma-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12), producido por las células estromales y NLC que forman parte del microambiente en el tejido linfóide secundario. Esta quimiocina no es solamente responsable de favorecer la migración de las células LLC hacia esos sitios sino que también incrementa la sobrevida del clon leucémico. En este trabajo se observó un aumento en los niveles de Bcl-2 cuando las células fueron cultivadas en presencia de CXCL12, sugiriendo mayor sobrevida de las células en contacto con esta quimiocina.

En conclusión, en este trabajo se observa un aumento de expresión de Bcl-2 en pacientes con LLC y este aumento se correlaciona con la expresión de factores de mal pronóstico como ZAP-70 y CD38. Por otro lado el tratamiento con Rapamicina indujo un aumento de la respuesta autofágica conjuntamente con una disminución de Bcl-2. Estas evidencias preliminares sugieren que la modulación de la autofagia mediante el tratamiento con Rapamicina podría impactar en factores que regulan la supervivencia de las células de LLC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. K Polyak, I Haviv and I Campbell. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet.* 2009; 25: 30–38
2. Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, et al. Stromal-Epithelial Metabolic Coupling in Cancer: Integrating Autophagy and Metabolism in the Tumor Microenvironment *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43: 1045–1051.
3. Rozman, C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333: 1052
4. V. El-Khoury et al. Disruption of autophagy by the histone deacetylase inhibitor MGCD0103 and its therapeutic implication in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014; 1:11.
5. Burger JA, The CLL cell microenvironment. *Adv Exp Med Biol,* 2013; 792: 25-45.
6. Burger JA, Montserrat E, Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia Cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood,* 2013; 121: 1501-9.
7. Burger JA, Montserrat E,. Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood* 2013; 121: 9-1501.
8. Nishio, M., et al. Nurse like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 2005; 106:1012-20.
9. D' Arena G et al. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematology* 2007; 82: 787
10. Beth Levine and Guido Kroemer. Autophagy in the Pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132: 27.
11. Autophagy in Human Health and Disease. *Nat Rev Cancer* 2013; 12: 401
12. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer Res* 2008; 68: 1485-94.
13. Kroemer G, Jaatela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2009; 124:1060-71.
14. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: Good, bad or both? *Cancer Res* 2006; 66: 9349-51.
15. Anja Apel, Zentgra H, Bûchler M W, and Herr I. Autophagy - A double-edged sword in oncology. *Int.J.Cancer* 2009; 125: 991.
16. Klionsky DJ, y col A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 2003; 5:539-45.
17. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating, 2005; 12: 1542-1552.
18. Vázquez CL, Colombo MI. Beclin1 modulates the anti-apoptotic activity of Bcl-2: insights from a pathogen infection system. *Autophagy* 2010; 6:177-8.
19. Autophagy in Human Health and Disease. *Nat Rev Cancer* 2013; 12: 401
20. Klionsky, D.J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2007; 8: 931–937.
21. Maiuri, MC, Zalckvar, E, Kimchi, A, Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol* 2007; 8: 741–752.
22. Mizushima, N., Klionsky, D. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2007; 27:19–40.
23. Rubinsztein, D.C, Gestwicki, J.E., Murphy, L.O, Klionsky, D.J. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat. Rev. Drug Discov* 2007; 6:304–312.
24. Hayun R, Okun E, Berrebi A, et al. Rapamycin and curcumin induce apoptosis in primary resting B chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2009; 50:625–632.
25. Trenti A, et al. Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2. *Biochem Pharmacol.*2014; 15: 89:197-209.
26. Rodríguez CM, Gilardoni M, Gaich P, Sastre D, Heller V, Donadio AC. El microambiente aumenta la expresión del inductor de metaloproteinasas de la matriz en leucemia linfática crónica. XX Congreso Argentino de Hematología. Mar del Plata 18 al 22 de noviembre de 2011
27. Rodríguez CM, Gilardoni MG, Bussi C, Sastre D, Heller V, Donadio AC, et al. Cambios en la expresión de CXCR4, CD38 y CD49d en linfocitos b neoplásicos de leucemia linfática crónica por su interacción con células del microambiente. Servicio de Oncohematología. Hospital Nacional de Clínicas. Córdoba. UNC. XXI Congreso Argentino de Hematología, VII Congreso del grupo Rioplatense de Citometría de Flujo. 29/10 al 1/11/2013, Mar del Plata.
28. Binet JL, Auquier A, Dighiero G. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48:198.
29. Goolsby C, Paniagua M, Tallman M, Gartenhaus RB. *Clin Cytom.* Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukemia. 2005; 63: 36-46.
30. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 2004; 363: 105-111
31. *Int J Clin Exp Pathol* (2009) 2, 574-582 [www.ijcep.com/IJCEP904003](http://www.ijcep.com/IJCEP904003) .Comparison of Bcl-2, CD38 and ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia.

32. Cell, Vol. 122, 927–939, September 23, 2005.
33. Eman A. Autophagy in chronic lymphocytic leukemia, molecular regulation and crosstalk with deregulated apoptosis Farrag Alexandria University, Egy.



## EXPERIENCIA EN DIAGNÓSTICO Y ASESORAMIENTO GENÉTICO EN CÁNCER HEREDITARIO PEDIÁTRICO EN UN HOSPITAL PÚBLICO EN ARGENTINA

**Marina Laura García De Rosa**

Hospital Garrahan

**Directora:** María Gabriela Obregón

### RESUMEN

El "cáncer esporádico" deriva de células somáticas, en individuos sin predisposición genética conocida. Cuando los casos se presentan con mayor frecuencia en una familia se designan como "Familiares o Hereditarios", y se relacionan con mutaciones genéticas en células en línea germinal. 10% del total de casos de cáncer en menores de 20 años están implicados con esta etiología. En el año 2013 se inició en el Hospital Garrahan un consultorio de atención de cáncer hereditario pediátrico al que concurren pacientes con retinoblastoma y sus familias así como con otras patologías, en especial tumores relacionados con el síndrome de Li-Fraumeni y otros menos frecuentes como los asociados a mutaciones en el gen DICER1. El objetivo de este estudio fue describir la presentación clínica de los pacientes evaluados en el consultorio de cáncer hereditario y la de los seleccionados para la realización de estudios moleculares, focalizando en aquellos en los cuales se pudo confirmar un síndrome de cáncer hereditario relacionado con mutaciones germinales en P53, DICER1 y RB1. 76 pacientes fueron evaluados. Se realizó estudio molecular de 25 pacientes; 9 para DICER1 (dos positivos), 6 para P53 (uno positivo), 10 para RB1 (6 positivos). Se identificaron 7 pacientes con retinoblastoma en un contexto sindrómico, y 5 de ellos presentaron alteraciones cromosómicas. Los estudios moleculares para cáncer hereditario en niños y el manejo de sus familias debe conducirse multidisciplinariamente y en cada caso considerar riesgos y beneficios de llevarlos a cabo, siempre con el objetivo de ayudar a categorizar el riesgo y mejorar el cuidado, pronóstico y vigilancia de los afectados y sus familias.

### ABSTRACT

"Sporadic cancer" is derived from somatic cells in individuals with unknown genetic predisposition. When cases occur most often in a family, they are designated as "Family or Hereditary" and are related to genetic mutations in germline cells. 10% of all cases of cancer in children under 20 years are related to this etiology. In the year 2013 began at Garrahan Hospital a medical office that specifically manages this issue from a pediatric point of view. This office attends retinoblastoma patients and their families, as well patients with other diseases, especially tumors associated with Li-Fraumeni syndrome and other less frequent as the associated with mutations in the gene DICER1. The aim of this study was to describe the clinical presentation of the patients evaluated in the clinic for hereditary cancer and selected to perform molecular studies focusing on those which could be confirmed as hereditary cancer syndrome related to germline mutations in P53, DICER1 and RB1. 76 patients were evaluated. Molecular study of 25 patients was performed; 9 for DICER1 (two positive), 6 to P53 (a positive), 10 for RB1 (6 positive). 7 patients with retinoblastoma were identified in a syndromic context, and 5 of them showed chromosomal alterations. Molecular studies for hereditary cancer in children and managing their families must be conducted by a multidisciplinary team and, in each case, consider risks and benefits, always aiming to help categorize the risk and improve care, prognosis and monitoring of affected patients and their families.

### INTRODUCCIÓN

El Cáncer constituye uno de los grupos de patologías con mayor prevalencia y está asociado con alta morbilidad y mortalidad. Se define como "cáncer esporádico" a las neoplasias que tiene un origen monoclonal derivadas de células somáticas a partir de mutaciones adquiridas, en individuos sin antecedentes familiares relacionados o predisposición genética conocida. Si bien es esencialmente una enfermedad genética a nivel celular, generalmente no se asocia con un patrón de herencia claramente

definido. Cuando los casos de cáncer se presentan con mayor frecuencia entre los miembros de una familia con respecto a la población general se designan como "Familiares o Hereditarios", y se relacionan con mutaciones genéticas en células en línea germinal que incrementan el riesgo de carcinogénesis. A pesar de que la causa de la mayoría de los cánceres pediátricos es desconocida, el estudio del cáncer hereditario y los avances en biología molecular han contribuido con la identificación de alteraciones genéticas importantes durante la progresión de la enfermedad y han permitido explicar la etiología de cuadros poco frecuentes, en ocasiones sobre la base de pocos casos o familias únicas. En este contexto, se calcula que 1 a 10% del total de casos de cáncer en menores de 20 años están implicados con esta etiología [22] e incluso estudios más recientes [9] reportaron prevalencias de 29% para población pediátrica específicamente.

En Oncología Pediátrica existen al menos dos poblaciones de pacientes en las que los factores genéticos juegan un papel importante. En primer lugar, se encuentran aquellos pacientes que presentan síndromes que cursan con dismorfias, trastornos del desarrollo o malformaciones asociadas, y se conoce que tienen un riesgo incrementado para formación y desarrollo de tumores, pero la presencia de estos tumores no es siempre la manifestación más característica (por ejemplo los pacientes con neurofibromatosis, hemihiperplasias, S. de Beckwith-Weidemann, S. Simpson-Golabi, Aniridia- Tumor de Wilms, Anemia de Fanconi, etc). Consideramos a este grupo **pacientes de riesgo asociado a síndromes dismórficos/ malformativos**.

En segundo lugar se encuentran aquellos pacientes sin dismorfias pero que por el tipo tumoral que presentan o por sus antecedentes familiares, tienen riesgo de presentar mutaciones genéticas en línea germinal. Consideramos a éste grupo de pacientes como **pacientes de riesgo probablemente asociados a síndrome de cáncer familiar o hereditario** [11].

En el año 2013 se inició en el Hospital de Pediatría J.P. Garrahan un consultorio de atención de cáncer hereditario pediátrico al que concurren pacientes con retinoblastoma y sus familias así como con otras patologías, en especial tumores relacionados con el síndrome de Li-Fraumeni y otros síndromes menos frecuentes como los asociados a mutaciones en el gen DICER1.

El retinoblastoma (RB) (MIM #180200) es la neoplasia ocular maligna más frecuente de la infancia. El tumor deriva de las células primitivas de la retina (retinoblastos) que poseen mutaciones en ambos alelos del gen RB1 (locus 13q14.2) y puede ser unifocal o multifocal. Afecta aproximadamente 1: 20.000 niños [15] 90% antes de los 5 años de edad. En la forma *hereditaria*, la primera mutación ocurre en las células de la línea germinal. Puede ser transmitida por un progenitor con un mecanismo autosómico dominante, o tratarse de una mutación *de novo* en el individuo. La segunda mutación es somática (células tumorales). En la forma *no hereditaria*, ambas mutaciones ocurren en células de la retina. Las alteraciones del gen RB1 por anomalías cromosómicas que involucran al cromosoma 13, son del 1 al 5% [13]. El 40% de los casos de RB son tumores bilaterales, de aparición más precoz (entre 8 y 15 meses) y de estos niños el 90% presenta mutaciones germinales en RB1. El 60% son unilaterales, de aparición más tardía (media de 25 meses) y se producen por mutaciones somáticas (adquiridas), sin embargo 15% de estos niños poseen mutaciones germinales [20]. Los pacientes con este tipo de alteración genética en línea germinal tienen riesgo aumentado para el desarrollo de otras neoplasias no-oculares, especialmente sarcomas por lo que deberían controlarse periódicamente durante toda su vida [14]. El diagnóstico clínico de RB se establece mediante el examen oftalmoscópico. Los estudios de imágenes pueden ser utilizados para apoyar el diagnóstico y establecer la etapa del tumor. El estudio molecular de RB1 en el ADN de glóbulos blancos en sangre puede identificar una variante patógena en línea germinal en más del 95% de los individuos con predisposición hereditaria a RB; dependiendo de si el tumor es bilateral o unilateral, si la historia familiar es positiva o negativa, y la sensibilidad de la metodología utilizada [1]. El asesoramiento genético para los familiares de un individuo afectado con RB también dependerá de estas características.

El Síndrome de Li Fraumeni (LFS) (MIM #151623) es un síndrome de predisposición a cáncer con un mecanismo de herencia autosómico dominante, de alta penetrancia, asociado a mutaciones germinales en el gen supresor de tumores TP53 (locus 17p13.1). Existe un amplio espectro de tumores que se presentan en el complejo fenotipo de esta patología, desde la niñez hasta la edad adulta, sin embargo se identificaron ciertos tipos clave (*corecancers*) que se presentan en el 80% de los afectados: sarcomas de partes blandas, osteosarcomas, cáncer de mama en pre-menopausia, tumores cerebrales, carcinoma adrenocortical y de plexos coroideos [7,19].

Los criterios para el diagnóstico clínico de síndrome de Li Fraumeni han sido modificados en sucesivas etapas [3] desde los originalmente enunciados por Frederick Li y Joseph Fraumeni en 1988 [12] con el objetivo de ampliar la detección de patologías probablemente relacionadas con mutaciones de TP53. Estos criterios (designados como "criterios de Chompret") tienen en cuenta principalmente tres situaciones clínicas sugestivas de LFS: 1) Presentación familiar: Caso índice con tumor del espectro del LFS enunciados previamente menor de 46 años y un familiar de primer o segundo grado con tumor del espectro LFS diagnosticado antes de los 56 años o con múltiples tumores; 2) Múltiples tumores primarios: dos de los cuales pertenezcan al espectro del LFS diagnosticados antes de los 46 años; 3) Tumores peculiares o poco frecuentes: Adenocarcinoma y tumor de plexos coroides, independientemente de que existan o no antecedentes familiares.

El 70-80% de los afectados con síndrome de LFS tienen mutaciones detectables en TP53 [16].

A pesar de ser un síndrome con alta penetrancia (50% a los 30 años, 90% a los 60 años y se reportaron estudios con 40% a los 16 años) (organov) la expresividad varía ampliamente, siendo los sarcomas y el cáncer de mama los más frecuentes [17] y aunque neoplasias como el carcinoma adrenocortical y el tumor de plexos coroides son más raras, tienen elevada posibilidad de presentar mutaciones germinales en P53, aún en ausencia de antecedentes familiares [10].

#### Edad promedio de diagnóstico de los tumores del espectro del Li Fraumeni.

(Olivier, 2003)

TUMOR	EDAD PROMEDIO DE DIAGNOSTICO
SARCOMAS	14 años
CÁNCER DE MAMA	32 años
TUMORES CEREBRALES	12-15 años
CARCINOMA ADRENOCORTICAL	3 años.

Los trastornos relacionados con mutaciones germinales en el gen DICER1 (locus 14q32.13) ("DICER1-Related Disorders") o Síndrome DICER1 (MIM \*606241) constituye síndrome de predisposición a cáncer que primeramente se asoció con blastomapeuropulmonar (PPB, tumores embrionarios poco frecuentes de localización pulmonar) en la infancia, generalmente en lactantes o menores de 6 años. Hay estudios que demostraron que 60-70% de estos tumores se relacionan con mutaciones germinales de DICER1. [4] Posteriormente se encontraron mutaciones en DICER1 en otros tipos tumorales como tumor de ovario de células de Sertoli-Leydig [3], nefroma quístico [5] y las neoplasias de tiroides (bocio multinodular, adenomas o cáncer diferenciado de tiroides). Tumores menos comúnmente observados son meduloepitelioma cuerpo ciliar, rhabdomyosarcoma embrionario, sarcoma renal, blastoma pituitario y pineoblastoma. Actualmente continúa ampliándose el fenotipo de éste síndrome [6]. La edad de presentación varía pero la mayoría de los casos en menores de 40 años de edad.

El objetivo de este estudio fue describir la presentación clínica de los pacientes evaluados en el consultorio de cáncer hereditario y la de los seleccionados para la realización de estudios moleculares, focalizando en aquellos en los cuales se pudo confirmar un síndrome de cáncer hereditario relacionado con mutaciones en P53, DICER1 y RB1.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio observacional, descriptivo. Los criterios de derivación al consultorio de cáncer fueron:

- 1) Niños con tumores que típicamente se presentan en adultos (mama, colon)
- 2) Pacientes con tumores de estirpes histológicas reconocidamente asociadas a síndromes de cáncer hereditario.
- 3) Pacientes con tumores bilaterales, multifocales o dos o más tumores primarios
- 4) Antecedente de familiares afectados con tipos tumorales similares o que se encuentren dentro del espectro de un síndrome de cáncer hereditario específico; así como familiares con tumores que se presentaron a edades tempranas, bilaterales o múltiples en un individuo; o cuando en el análisis genealógico pueda identificarse un patrón de transmisión definido.

Se realizó entrevista y evaluación clínica de los pacientes. Los criterios de inclusión para la realización de estudios moleculares específicos fueron:

Para RB1: Pacientes con diagnóstico de retinoblastoma (uni o bilateral; uni o multifocal) por evaluación oftalmológica y confirmación histopatológica.

Para TP53: Pacientes con sospecha clínica de Síndrome de Li Fraumeni, de acuerdo a los criterios de Chompret enunciados previamente.

Para DICER1: Pacientes con diagnóstico histopatológico de tumores asociados a mutaciones germinales en DICER1 enunciados previamente.

En el caso que los pacientes que presentaron patología tumoral con las características mencionadas pero además asociada a retraso madurativo y/o dismorfias o malformaciones congénitas se realizó estudio citogenético.

Se incluyeron tanto a los pacientes con diagnóstico reciente así como a los que hubieran sido diagnosticados en el pasado; que se encontraran disponibles y accedieran a participar del estudio (o sus familiares).

Los datos clínicos o variables de estudio que registraron son:

- Edad, sexo y grupo étnico.
- Tipo de tumor/es diagnosticado/s (definido por diagnóstico histopatológico).
- Edad de diagnóstico.
- Tratamiento/os recibido/os.
- Existencia o no de antecedentes familiares de cáncer (referidos por los familiares del paciente).
- Realización de estudio molecular pertinente (tanto del paciente como de los padres y/o hermanos, en caso de haberse realizado).
- Resultado del estudio molecular.

Se utilizó un consentimiento informado aprobado por la coordinación de Investigación y el Comité de Ética del Hospital Garrahan.

Se realizaron los estudios moleculares y/o citogenéticos de los pacientes seleccionados en una primera etapa. En los casos con resultado positivo para mutación/es o anomalías cromosómicas, y a los fines de establecer si se trata de una alteración esporádica o heredada y realizar el asesoramiento genético correspondiente; se incluyeron muestras de los padres de los afectados y en el caso de pacientes con hermano/a afectado/a con algún tumor compatible con probable síndrome de cáncer hereditario, también se realizó estudio molecular y/o citogenético pertinente. Los hermanos menores de edad y asintomáticos no se incluyeron en este estudio.

Los estudios se efectuaron en el laboratorio Biología Molecular y Citogenética del Hospital J.P. Garrahan. Los estudios moleculares se realizaron mediante técnica de secuenciación automática. En el caso de TP53 se analizó la región codificante completa (exones 1-11), utilizando cebadores específicos de ADN que flanquean a cada uno de los exones del gen. En el caso de RB1 se analizaron los 27 exones y región promotora del gen. En el caso del DICER 1 se analizó la región codificante completa del gen y región promotora.

Los estudios citogenéticos se realizaron mediante cultivo celular de linfocitos obtenidos a partir de punción de sangre periférica y tinción con bandeado G con alta resolución.

Los datos clínicos se registraron en una plantilla de Microsoft Excel.

### ***Devolución o Entrega de resultados del estudio realizado***

Tratándose de información inherente a datos genéticos, y por lo tanto, con implicancias para los familiares de los pacientes afectados, la devolución de los resultados estuvo a cargo de un equipo multidisciplinario integrado por genetistas, oncólogos y personal del Servicio de Salud Mental del hospital.

## **RESULTADOS**

Se evaluaron un total de 76 pacientes en el consultorio de cáncer hereditario. Los motivos de consulta se enumeran en la tabla 1. Seis de los consultantes presentaban cuadros de patología tumoral asociada a retraso madurativo y/o dismorfias o malformaciones congénitas (referidos como

"sindrómicos" en la tabla 1) y cinco pacientes tenían sólo antecedentes familiares oncológicos de relevancia como motivo principal de consulta.

Se realizó estudio molecular de 25 pacientes, de los cuales 9 fueron para DICER1, 6 para P53, 10 para RB1 (tabla 2, 3, y 4). Se identificaron además 7 pacientes con retinoblastoma en el contexto de otras anomalías, y de este grupo, 5 presentaron alteraciones cromosómicas (tabla 5).

De los 9 pacientes en los que se realizó estudio molecular para DICER1, se obtuvo resultado positivo para 2 de ellos, cuyos tipos tumorales fueron tumor ovárico de células de Sertoli-Leyding. Ambos casos fueron sospechados por presentar síntomas clínicos de virilización (voz grave e hirsutismo). En el caso del paciente 1, el diagnóstico fue a los 3 años (tratamiento mediante ooforectomía) con un segundo tumor primario de idéntica estirpe histológica en el ovario contralateral a los 6 años. No presentó antecedentes familiares ni otros antecedentes personales de relevancia. Se realizó estudio molecular a los padres de esta paciente, resultando la mutación heredada del padre, que tenía 30 años al momento del estudio y se encontraba asintomático. En el caso del paciente 2, el diagnóstico fue a los 14 años (tratamiento mediante ooforectomía y quimioterapia). A los 15 años se diagnosticó adenoma folicular tiroideo en lóbulo derecho. No presentó otros antecedentes personales relevantes. Antecedente de una tía por vía paterna con diagnóstico de cáncer de ovario a los 34 años, sin saber especificar tipo histológico. Se realizó estudio molecular a la madre de esta paciente que resultó negativo. El padre no se encontraba disponible para este análisis.

De los 6 pacientes en los que se realizó estudio molecular para TP53, se obtuvo resultado positivo para 1 de ellos. Se trató de una niña de 11 años al momento del diagnóstico con un osteosarcoma de fémur distal izquierdo, sin otros antecedentes personales de relevancia. Antecedente familiar de una hermana fallecida a los 9 años de edad con osteosarcoma en tibia derecha. Abuela por vía materna con cáncer de útero a los 40 años y tía por vía materna con cáncer de mama a los 37 años. Los padres de esta niña tenían 39 y 40 años y se encontraban asintomáticos al momento de la evaluación pero no se realizaron el estudio molecular.

De los 10 pacientes en los que se realizó estudio molecular para RB1, 6 resultaron positivos para mutaciones germinales en este gen. Las edades de diagnóstico estuvieron entre los 20 días de vida y los 8 meses y todos fueron de afectación bilateral. Cuatro de estos pacientes tuvieron antecedentes familiares: 2 con algún progenitor y 2 con hermanos con antecedentes de retinoblastoma (en estos dos últimos casos el antecedente surgió de la anamnesis pero no se realizaron los estudios moleculares de los hermanos afectados ni de los padres). Los otros dos pacientes sin antecedentes familiares relacionados tuvieron resultado de estudio molecular para ambos padres de cada uno negativo.

Siete pacientes presentaron retinoblastoma en el contexto de retraso madurativo y dismorfias ("sindrómicos"). Se realizó estudio citogenético, 2 pacientes tuvieron cariotipo con alta resolución normal y 5 de ellos presentaron anomalías cromosómicas que involucran al cromosoma 13; en 4 de estos casos las anomalías fueron heredadas y en un caso fue *de novo*.

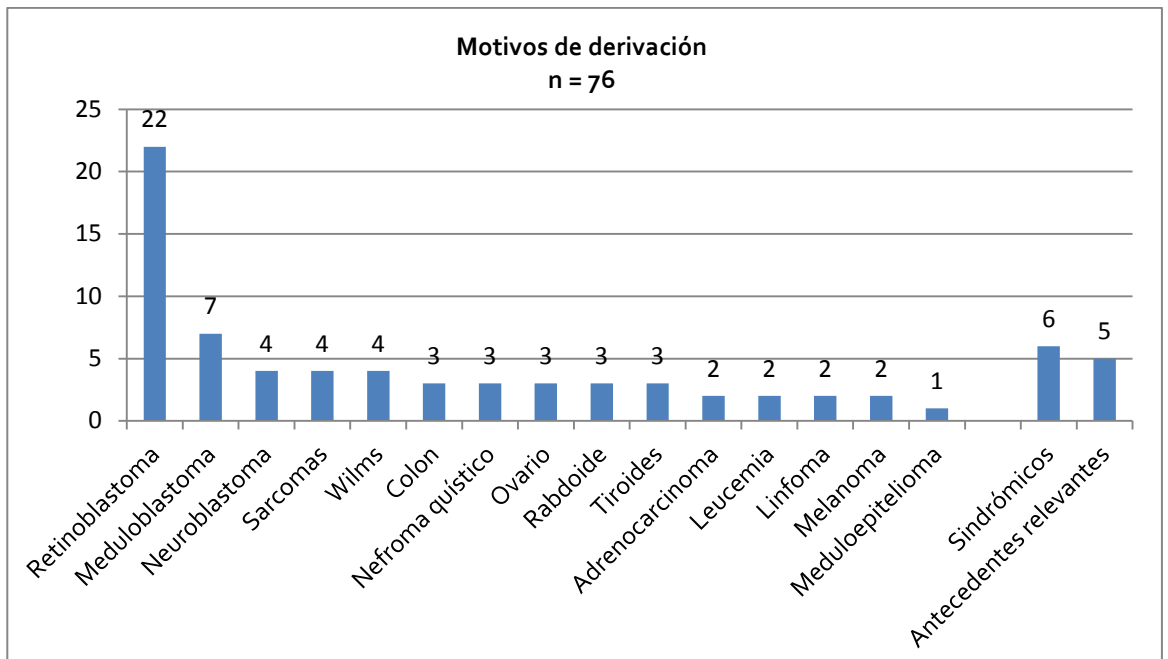


Tabla 1. Motivos de derivación al consultorio de cáncer hereditario

Tabla 2: DICER 1

Pte.	Tipo tumoral	Sexo	Edad al Dx	Estudio molecular	Ant. Fliar	Estudio de padres
1	Ovario Sertoli-Leyding bilateral.	F	3 años y 6 años	Mut. frameshift	No	Padre + Madre -
2	Ovario sertoli-Leyding + Adenoma folicular tiroideo.	F	14 años	Mut. missense	Si	Madre – Padre NR.
3	Ovario células de la granulosa	F	11 años	negativo	no	
4	Nefromaquistico	M	15 años	negativo	no	
5	Nefromaquistico	M	9 años	negativo	no	
6	Nefromaquistico	M	12 años	negativo	no	
7	Tumor tiroideo	M	16 años	negativo	si	
8	Meduloepitelioma de nervio optico	M	11 años	negativo	no	
9	Tumor tiroideo	F	13 años	negativo	si	

NR: no realizado.

Tabla 3: P53

Paciente	Edad	Sexo	Tumor	Estudio molecular	Antecedentes familiares	Estudio de padres
1	11 a	F	Osteosarcoma femur	Mut missense	si	NR
2	9a	F	adrenocarcinoma	negativo	no	
3	7a	F	adrenocarcinoma	negativo	no	
4	4a	F	RMS de vulva	negativo	si	
5	5a	M	RMS cervical	negativo	si	
6	3a	M	RMS de pelvis	negativo	si	

Tabla 4: RB1

Paciente	Edad Dx	Sexo	RB Uni o bi lateral	Estudio molecular	Antecedentes familiares	Estudio de padres
1	1a	F	unilateral	negativo	no	negativo
2	2m	M	bilateral	Mut nonsense	si	Madre +
3	6m	M	bilateral	Mut frameshift	no	negativos
4	2m	F	bilateral	Mut nonsense	si	Padre +
5	8m	F	bilateral	Mut frameshift	Si (hno)	NR
6	2oddv	M	bilateral	Mut frameshift	no	negativo
7	2m	F	bilateral	Mut. Frameshift	Si(hno)	NR
8	9m	F	unilateral	negativo	no	negativo
9	4m	M	unilateral	negativo	no	NR
10	11m	M	unilateral	negativo	no	NR

Tabla 5: RB sindromicos

Pte.	Edad Dx	Sexo	RB uni o bi lateral	Anomalía asociada	Cariotipo	Ant. Fliares	Cariotipo de padres
1	4m	M	unilateral	RM+dismorfias	46,XY,del(13)(q12.3 q 21.1)	si	Madre ins.
2	2m	M	bilateral	RM+dismorfias	Derivado 1 y 13 (ver referencia al pie)	si	Madre+( ver referencia)
3	5m	M	unilateral	RM+dismorfias	Transl.Compleja	si	Madre+(ver referencia)
4	1 mes	M	bilateral	RM+baja talla+hemangiomas	46,XY,del(13)(q12q31)	no	Padres normales
5	12m	M	unilateral	RM+ dismorfias	46,XY,del(13)(q14.1q21.1)	no	Madre 46,XX,inv(13)(q14.2q21.2)

Cariotipo materno pacientes 2 y 3 : 46,XX,der(1)t(1;13)(p32.1;q14.2)ins(18;13)(q21.3;q14.2q21.2), der(13)t(1;13)ins(18;13),der(18)t(1;13)ins(18;13)[20].

## DISCUSIÓN

Este reporte constituye el resumen de la experiencia de trabajo de un consultorio multidisciplinario creado con la intención de abordar de manera específica, la compleja problemática del cáncer hereditario desde el punto de vista pediátrico. La gran mayoría de los conocimientos actuales sobre tumores familiares y hereditarios se basan en población adulta, sobre todo europea y norteamericana. La epidemiología de estas patologías en Argentina es desconocida, por lo cual nos parece importante generar información pertinente a cuál es la situación local.

El hospital Garrahan es centro de derivación regional de retinoblastoma, con una importante casuística e investigaciones respecto de estos tumores típicos de la infancia, es por ello que aproximadamente el 30% de los pacientes evaluados tenían este diagnóstico.

Coincidentemente con la bibliografía, los pacientes con mutaciones germinales tuvieron afectación bilateral y a edades tempranas. Está descripto que el 10% presenta antecedentes familiares pero en nuestra casuística el 40% presenta antecedentes familiares, esto probablemente puede relacionarse con el hecho de que los familiares afectados de estos niños también fueron en su momento atendidos en esta institución. Aproximadamente 15% de los pacientes con tumores unilaterales tiene mutación germinal en RB1 [13]. Ninguno de los pacientes con afectación unilateral evidenció mutación RB1 en línea germinal. Entre un 1 y 5% de los pacientes pueden portar alguna anomalía cromosómica que involucre al locus de RB1 en el cromosoma 13. Se halló que el 30% de estos pacientes con anomalias cromosómicas, en los cuales el retinoblastoma, se produjo en un contexto sindrómico que asociaba retraso madurativo y dismorfias.

Con respecto al síndrome de Li Fraumeni, Los pacientes fueron seleccionados por los criterios de Chompret enunciados previamente y se halló un paciente con osteosarcoma familiar con mutación de tipo missense en TP53. Se calcula que el 50-80% de los pacientes con adenocarcinoma de presentación previa a los 3 años de vida tiene mutación germinal en TP53 [10]. Los dos pacientes que se estudiaron tenían 9 y 7 años al momento del diagnóstico y no presentaron mutación, probablemente esto refuerza el criterio de la edad de aparición previa a los 3 años de vida como más fuertemente asociada con mutación germinal en TP 53. Todos los pacientes con RMS de esta serie a los que se les solicitó el estudio de TP53 tenían antecedentes familiares de patología tumoral, aunque ninguno de los tumores definidos como "corecancers" del síndrome de Li Fraumeni. Se sabe que los criterios clínicos pueden no ser tan sensibles o específicos en este síndrome donde el espectro tumoral y la edad de presentación son altamente variables.

Los tumores relacionados con mutaciones germinales en el gen DICER1 ("DICER1-Related Disorders") o Síndrome DICER1 han sido recientemente descriptos y como se mencionó previamente el fenotipo continúa ampliándose. De los 9 pacientes que se testearon por presentar alguno de estos tumores, las dos niñas con tumor ovárico de células de Sertoli-Leyding resultaron positivas, lo cual coincide con estudios que demostraron asociación de hasta 60% de este tipo de tumores con mutaciones germinales en DICER 1 y amplio rango en la edad de presentación [21].



Las familias de todos los pacientes en los que se detectó mutación recibieron asesoramiento genético. Para aquellas familias de retinoblastoma en las que se detectó alteración cromosómica también se realizó asesoramiento genético, se informó el riesgo de recurrencia para futuros embarazos y se sugirió diagnóstico prenatal

De acuerdo a los registros del ROHA (Registro Oncohospitalario Argentino) existe en nuestro país una incidencia media anual de tumores del SNC de 23,5 por millón de niños menores de 15 años, y dentro de este grupo, 12% corresponden a tumores de plexos coroideos. La incidencia media anual de tumores de partes blandas es de 7,7 por millón; de los cuáles 50% corresponden a rabdomiosarcomas. La incidencia media anual para RB es de 4,4 por millón en menores de 15 años. Si pensamos que un porcentaje variable de estos tumores podrían estar asociados a mutaciones germinales que se relacionen con alto riesgo de desarrollar cáncer en distintas etapas de la vida y que además podrían involucrar aspectos familiares, es evidente la necesidad de seguir investigando sobre la caracterización clínico-molecular de estas complejas patologías con el objetivo de ayudar a categorizar el riesgo y mejorar el cuidado, pronóstico y vigilancia de los pacientes afectados y sus familias.

La indicación de estudios moleculares para cáncer hereditario en niños y el manejo de las familias de los pacientes debe ser conducido por equipos multidisciplinarios y cada caso cuidadosamente evaluado considerando siempre riesgos y beneficios de llevar a cabo estos estudios.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Albrecht P, Ansperger-Rescher B, Schöler A, et al. Spectrum of gross deletions and insertions in the RB1 gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Hum Mutat.* 2005;26:437-45.
- 2- Chivukula M, Hunt J, Carter G, et al. Recurrent gynandroblastoma of ovary-A case report: a molecular and immunohistochemical analysis. *Int J Gynecol Pathol.* 2007;26:30-3.
- 3- Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugieres L, Pages S, Feunteun J, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet* 2001;38:43-7.
- 4- de Kock L, Plourde F, Carter M, Hamel , et al. Germ-line and somatic DICER1 mutations in a pleuropulmonary blastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2013a;60:2091-2.
- 5- Doros L, Rossi C, Yang J, et al. DICER1 mutations in childhood cystic nephroma and its relationship to DICER1-renal sarcoma. *Mod Pathol.* 2014;27:1267-80.
- 6- Foulkes W, Bahubeshi A, Hamel N, et al. Extending the phenotypes associated with DICER1 mutations. *Hum Mutat.* 2011;32:1381-4.
- 7- Gonzalez K, Buzin C, Noltner K, Gu D, Li W, Malkin D, et al. High frequency of de novo mutations in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet.* 2009;46:689-93.
- 8- Hisada M, Garber J, Fung C, Fraumeni J, Li F. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Apr 15;90(8):606-11.
- 9- Knapke S, Nagarajan R, Correll J, et al. Hereditary cancer risk assessment in a pediatric oncology follow-up clinic. *Pediatr Blood Cancer* 2012;58:85-89.
- 10- Laloo F, Varley J, Ellis D, et al. Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet* 2003;361:1101-2.
- 11- Lapunzina P, López R, Rodríguez-Laguna M , et al. Impact of NGS in the medical sciences: Genetic syndromes with an increased risk of developing cancer as an example of the use of new technologies. *Genet Mol Biol.* 2014 Mar;37(1 Suppl):241-9.
- 12- Li F, Fraumeni J, Mulvihill J, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1988;48:5358-62.
- 13- Lohmann D, Brandt B, Höpping W, et al. The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 1996;58:940-9.
- 14- Marees T, Moll A, Imhof S, et al. Risk of second malignancies in survivors of retinoblastoma: more than 40 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:1771-9.
- 15- Naumova A, Sapienza C. The genetics of retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 1994 Feb;54(2):264-73.
- 16- Ognjanovic S, Olivier M, Bergemann TL, Hainaut P. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: A review of the IARC TP53 database. *Cancer.* 2012;118:1387-96
- 17- Olivier M, Goldgar D, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003;63:6643-50.
- 18- Registro Oncohospitalario Argentino. Incidencia 2000-2009. Instituto Nacional de Cáncer. Ministerio de salud de la Nación.
- 19- Ribeiro R, Rodriguez-Galindo C, Figueiredo B, Mastellaro M, West A, Kriwacki R, et al. Germline TP53 R337H mutation is not sufficient to establish Li-Fraumeni or Li-Fraumeni like syndrome. *Cancer Lett* 2007;247:353-5.
- 20- Rushlow D, Piovesan B, Zhang K, et al. Detection of mosaic RB1 mutations in families with retinoblastoma. *Hum Mutat.* 2009;30:842-56.
- 21- Slade I, Bacchelli C, Davies H, et al. DICER1 syndrome: Clarifying the diagnosis, clinical features and management implications of a pleiotropic tumour predisposition syndrome. *J Med Genet* 2011;48:273-278.
- 22- Strahm B, Malkin D. Hereditary cancer predisposition in children: genetic basis and clinical implications. *Int J Cancer* 2006 Nov 1;119(9):2001-6.
- 23- Tischkowitz M, Rosser E. Inherited cancer in children: practical/ethical problems and challenges. *Eur J Cancer* 2004 Nov;40(16):2459-70.

# BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA POSITIVO PARA RECEPTORES HORMONALES

**Cecilia Perrone**

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)

**Directora:** Virginia Novaro

## RESUMEN

La terapia endócrina es la terapia sistémica de primera línea para carcinomas mamarios que expresan receptores hormonales (HR+). Si bien se ha asociado la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR con la resistencia a esta terapia, aún no hay en la clínica un método validado de detección de actividad de la vía que pueda servir como marcador pronóstico en pacientes.

En el presente trabajo, se logró poner a punto por inmunohistoquímica distintos marcadores de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en muestras parafinadas de pacientes con cáncer de mama HR+. Analizamos proteínas implicadas en la vía como Akt fosforilada (pAkt) y S6 fosforilada (pS6). Se halló que pS6 es el mejor marcador de activación de la vía por la reproducibilidad de los resultados y la fidelidad de los anticuerpos comerciales. Además, se propuso aislar ADN de estas muestras parafinadas por distintos métodos, aunque se obtuvo un bajo rendimiento. Cuando se logre aislar ADN de todas las muestras, se analizará su genotipo para PIK3CA y PTEN.

Este estudio aporta al desarrollo de un sistema de detección basado en inmunohistoquímica que puede ser utilizado rápida y eficientemente en cualquier laboratorio clínico para determinar el nivel de la vía PI3K/Akt/mTOR en biopsias de archivo de pacientes con cáncer de mama.

## ABSTRACT

Endocrine therapy is the first line systemic therapy for hormone-receptors positive (HR+) breast carcinomas. Even though it has been reported that activation of PI3K/Akt/mTOR pathway is associated with endocrine resistance, there is yet no consensus in clinical practice on the method to detect pathway activation to use as a prognostic marker for patients.

In this study, we set up by immunohistochemistry the screening of different PI3K/Akt/mTOR pathway activation markers in HR+ breast cancer paraffin-embedded samples. It was determined the level of phosphorylated Akt (pAkt) and phosphorylated S6 (pS6), proteins implicated in the PI3K pathway. It was found that pS6 was the best activation biomarker according to the reproducibility of results and fidelity of the commercial antibodies. Apart from this, it was intended to isolate DNA from the paraffin-embedded samples using different methods, although yield was rather poor. When DNA isolation from all samples is achieved, there will be analyzed for their genotype regarding PIK3CA and PTEN.

This approach has contributed to set up a detection system based in immunohistochemistry to easily assess the activation level of PI3K/Akt/mTOR pathway in patient biopsies.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres en el mundo [18]. De acuerdo a estadísticas tomadas del Instituto Nacional del Cáncer, en Argentina el cáncer de mama es el de mayor incidencia en mujeres, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres [6]. Además, constituye la mayor mortalidad por cáncer en mujeres, con una tasa de 18 por cada 100.000 mujeres.

La terapia endócrina es la terapia sistémica de primera elección en tumores de mama positivos para receptores hormonales (HR+), que son los más frecuentes. A pesar de que dicha terapia ha sido una herramienta exitosa en el tratamiento del cáncer de mama, una alta proporción de tumores desarrollan resistencia a la misma [11] o no responden desde el inicio (resistencia constitutiva). Algunos trabajos postulan que la resistencia podría estar relacionada con la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR [3].

Esta vía de señalización comienza con la activación de receptores tirosin-quinasa (RTK) y receptores acoplados a proteínas G, que resulta en la fosforilación por parte de PI3K del lípido fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), sintetizando el mensajero secundario fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Este lípido trifosforilado recluta a la proteína Akt a la membrana celular, donde es fosforilada (pAkt) y activada por PDK1, desencadenando una cascada de fosforilaciones en diversos sustratos que promueven la tumorigénesis. Entre ellos, pAkt fosforila al complejo 2 de tuberoesclerosis (TSC2), que a su vez activa al complejo mTORC1 (complejo 1 del *target of rapamycine*, mTOR). Este complejo induce la activación de la proteína ribosomal S6, que al ser fosforilada (pS6) desencadena señales de crecimiento y proliferación celular. La vía es regulada por el supresor tumoral PTEN, una fosfatasa que transforma PIP<sub>3</sub> en PIP<sub>2</sub>, desencadenando la terminación de la señalización (Figura 1).

Diversos trabajos estudian cómo se relacionan la progresión del cáncer de mama y la respuesta terapéutica con el nivel de activación de PI3K/Akt/mTOR [1] [2] [12]. Sin embargo, hasta el momento no hay consenso sobre qué marcadores utilizar para evaluar la actividad de esta vía. La fosforilación de S6 (pS6) ha sido propuesta como marcador de activación de TORC1 para evaluar efectividad terapéutica en la clínica [11] [5]. Otro marcador posible, son las mutaciones en componentes de la vía PI3K/Akt/mTOR, ya que cerca del 55% de los tumores mamarios presentan alguna mutación [9]. La mayoría de estas mutaciones ocurren en el gen *PIK3CA*, que codifica para la subunidad catalítica p110 $\alpha$ . Otras mutaciones frecuentes producen el silenciamiento del supresor tumoral PTEN. Sin embargo, las alteraciones genéticas en *PIK3CA* o *PTEN* no siempre se asocian con aumento en la actividad enzimática de PI3K [21] ni correlacionan con la prognosis y la respuesta terapéutica [4]. Estos hechos hacen necesario abordar un estudio exhaustivo que resuelva qué marcador de activación de la vía utilizar para determinar la participación de PI3K/Akt/mTOR en la progresión y regresión terapéutica del cáncer de mama HR+.

En base a lo mencionado, en el presente trabajo se propuso poner a punto el análisis de biomarcadores de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en una cohorte reducida de muestras de pacientes con cáncer de mama positivo para receptores hormonales. En ellas, se evaluó por inmunohistoquímica el nivel de pAkt y pS6, utilizando un *tissue microarray* para estandarizar el procedimiento.

La hipótesis es que alteraciones moleculares en la vía de PI3K/Akt/mTOR se asocian con la progresión de la enfermedad y con la resistencia al tratamiento endócrino en el cáncer de mama. Además, los tumores donde la activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR se asocie con los parámetros de migración y remodelado tisular, tendrán mayor capacidad de hacer recidivas y metástasis. Por eso, a partir de este estudio piloto, aplicaremos el análisis a un mayor número de muestras de pacientes, para intentar relacionar el nivel de actividad de la vía con marcadores de activación de receptores endócrinos, vías de proliferación y sobrevida, recurrencia, migración e invasión tisular.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Obtención de muestras***

Para el presente estudio se utilizaron 20 muestras de pacientes con cáncer de mama de estadios II, III y IV. Las mismas fueron recibidas del archivo del Centro Oncológico Riojano Integral (CORI) y corresponden a biopsias obtenidas en el momento de la cirugía o previo a la misma, fijadas con formalina e incluidas en parafina por el Servicio de Patología del CORI. Los tacos de estas muestras se mantienen identificados con un código realizado por el Dr. Diego Kaen, responsable clínico del estudio, de forma de preservar la confidencialidad de las pacientes.

Los procedimientos de obtención y manipulación de las muestras fueron aprobados tanto por el Comité de Docencia e Investigación del CORI como por el Comité de Ética del IByME, instituto donde se desarrolló el trabajo, incluido el modelo del Consentimiento Informado para el uso del material biológico para investigación, que fue firmado por las pacientes.

### ***Procesamiento de las muestras***

Cada muestra tumoral se analizó por tinción con hematoxilina y eosina, y un médico patólogo (Dra María May) eligió aquellas regiones del tejido que se consideraron más representativas del tumor. A partir de ellas se realizó un Tissue Microarray (TMA) utilizando el *EZ-TMA™ Manual Tissue Microarray*

*Kit 3 - 3 mm x 24 Core* (IHC world, LLC), con el fin de estandarizar y agilizar el procedimiento de inmunohistoquímica en 24 muestras simultáneamente.

Utilizando los sacabocados de 3 mm provistos por el kit, se extrajo una porción del tumor y se colocó en el bloque de parafina de 24 hoyos. Completamos el *array* con las 20 muestras de pacientes del CORI, 1 de tejido de mama normal (no tumoral) y 1 de tejido tumoral mamario (ambas, muestras de archivo de la Dra. María May), junto con 2 xenotransplantes en ratón de la línea tumoral humana T47D, uno *wild type* (T47Dwt) y otro transformado con la forma miristoilada de la isoforma Akt1, constitutivamente activada (T47Dmyr1). El cassette con las muestras incorporadas se llevó a un servicio de Histología que procedió a realizar cortes de 3 µm.

### **Análisis de datos clínicos**

El Servicio de Patología del CORI proporcionó las historias clínicas de las pacientes de forma codificada, conteniendo tanto la descripción histológica de los tumores como parámetros clínicos (edad, tamaño tumoral, sitio metastásico, receptores hormonales, estadio, tiempo a la recurrencia de la enfermedad, tipo de terapia recibida, etc.). Estos parámetros serán utilizados a futuro para evaluar su correlación con el nivel de los biomarcadores de la vía PI3K/Akt/mTOR, luego de incorporar un mayor número de muestras al análisis.

### **Inmunohistoquímica**

A partir de los cortes en blanco del TMA, se realizó la inmunomarcación siguiendo un protocolo estándar para todos los anticuerpos. Inicialmente, se desparafinaron los tejidos en xileno durante al menos 30 minutos, y luego fueron hidratados utilizando una serie de alcoholes de graduación decreciente (100°, 96° y 70°). Se procedió a bloquear la peroxidasa endógena incubando los cortes durante 30 minutos en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% en etanol 70%, seguido de dos lavados con agua destilada y la recaptura del anticuerpo, que consistió en colocar los vidrios en buffer citrato 10mM pH6 en un baño térmico a 90°C durante 50 minutos.

Pasado este período, se lavaron los cortes con agua destilada y con PBS 1X previo a realizar el bloqueo con una solución de albúmina (BSA) 2,5% en PBS 1X durante al menos 30 minutos en cámara húmeda. Seguidamente, se incubaron con el anticuerpo primario deseado diluido en BSA 2,5% en la concentración pertinente (ver más abajo) en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se procedió a lavar con PBS 1 X antes de incubar los vidrios durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente, con una dilución 1:400 en PBS 1X del anticuerpo secundario (conejo o ratón según corresponda, Vector). Nuevamente se realizaron lavados con PBS 1X y los cortes fueron incubados 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente con una solución 1:50 de Complejo Avidina Biotina (ABC kit Vectastain; Vector). A continuación, se procedió a revelar la reacción en microscopio, utilizando 3,3'diaminobencidina (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako). Para obtener una marcación homogénea, luego de colocar 30 µl de solución de DAB, se colocaron films plásticos sobre los cortes, de manera que, rápidamente y en forma homogénea, se cubriera toda la superficie. La reacción se detuvo agregando agua corriente. Consecutivamente, se utilizó hematoxilina durante 5-7 segundos para teñir los tejidos. Finalmente, se dejaron secar los cortes durante toda la noche al aire y se incubaron con xileno por 30 minutos antes de ser montados en medio sintético (DPX, Sigma) para su visualización en el microscopio.

Para visualizar y obtener fotografías de las inmunohistoquímicas realizadas, se utilizó un microscopio confocal (Nikon), disponible en el IByME, donde se llevó a cabo el trabajo. Las imágenes fueron tomadas en varios aumentos (40x, 100x, 200x y 400x). Para contabilizar el porcentaje e intensidad de las células tumorales marcadas para cada anticuerpo, cada tumor del TMA fue analizado en su totalidad por dos personas (la Lic. Cecilia Perrone y la Médica Patóloga Dra. María May). Se compararon los resultados y se generó un *score* multiplicando el porcentaje de células positivas para la marca (0-100%) por la intensidad de la misma (0-3). En los casos donde no fue posible evaluar la marca por el estado del tejido, se informó como "no evaluable" (n/e).

### **Anticuerpos**

Los siguientes anticuerpos fueron puestos a punto en xenotransplantes de células T47Dwt en ratón, o en cortes de muestras humanas de mama de archivo. Una vez realizada esta puesta a punto, la dilución determinada como óptima fue utilizada para los cortes del TMA:

**pS6 (Ser 240/244):** Marca: Cell Signaling. Catálogo: 2215. Especie: conejo. Concentración: 1:500. **Akt (1,2,3):** Marca: Santa Cruz. Catálogo: sc-8312. Especie: conejo. Concentración: 1:100. **pAkt (Ser473):** Marca: Santa Cruz. Catálogo: sc-7985. Especie: conejo. Concentración: 1:500.  **$\alpha$ -SMA:** Marca: Dako. Catálogo: Mo851. Especie: ratón. Concentración: 1:250. **E-cadherina:** Marca: Cell Signaling. Catálogo: 3195. Especie: conejo. Concentración: 1:100. **Vimentina:** Marca: Sigma. Catálogo: V6630. Especie: ratón. Concentración: 1:200. **PTEN:** Marca: Cell Signaling. Catálogo: 9188. Especie: conejo. Concentración: 1:100. (*No se observó marca en el TMA a pesar de haber sido puesto a punto previamente en muestras humanas de mama y colon*). **Ki67:** Marca: ABCAM. Catálogo: ab15580. Especie: conejo. Concentración: 1:500. **ER:** Marca: Dako. Catálogo: IR084. Especie: ratón. Concentración: *Ready to use*. **PR:** Marca: Dako. Catálogo: IR068. Especie: ratón. Concentración: *Ready to use*.

### **Extracción de ADN**

De los bloques de parafina se cortaron secciones de 5-10  $\mu$ m y se colocaron en tubos *ependorf* de 1,5 ml libres de DNAsas y RNAsas. La parafina se removió con xileno (Cicarelli), realizando dos pasajes de 10 minutos y agitando vigorosamente. El aislamiento de ADN se efectuó mediante el kit QIAamp DNA FFPE Tissue (catálogo 56404, Qiagen) y se procedió como indica el fabricante. El pellet fue lavado con etanol, centrifugado y resuspendido en 180  $\mu$ l de buffer de lisis (ATL, Qiagen) y 20  $\mu$ l de proteinasa K (Qiagen). Se mezcló e incubó a 56°C durante al menos una hora (digestión del tejido) y luego a 90°C durante una hora. Las muestras fueron tratadas con RNasa A para evitar contaminaciones. El ADN fue extraído con columnas MinElute (Qiagen) como recomienda el fabricante, utilizando un volumen de elución final de 50  $\mu$ l.

Alternativamente, se realizó una extracción utilizando el agente TRIzol (Invitrogen). En un tubo *ependorf* de 1,5 ml con 5-7 cortes de 5-10  $\mu$ m de cada taco de parafina, se agregó 500  $\mu$ l de TRIzol, se agitó vigorosamente y se realizó la disgregación mecánica del material con pipeta y jeringa. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido del agregado de 100  $\mu$ l de cloroformo, agitación e incubación por 3 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar y descartar la fase acuosa, se procedió a precipitar el ADN con etanol 100%, que luego fue lavado con una solución de citrato de sodio 0,1 M en etanol 10% dos veces antes de resuspenderlo en etanol 75%. Se dejó incubando durante 20 minutos, se centrifugó y finalmente se resuspendió en una solución 8 mM de NaOH. Para guardarlo por más tiempo, se ajustó el pH de la solución a 8 con HEPES.

Para ambos casos, la concentración de los extractos se midió en NanoDrop (Thermo) y los mismos fueron corridos en un gel de agarosa 1,2% para comprobar su calidad.

Asimismo, se extrajo ADN de líneas celulares que contenían diversas mutaciones en PIK3CA y PTEN para utilizarlos como control (Tabla 1).

### **PCR y análisis de mutaciones**

El análisis de las mutaciones en los genes PIK3CA y PTEN se realizó por amplificación a partir de ADN genómico (ADNg) de las muestras y líneas celulares utilizando los *primers* detallados en la Tabla 2 [17] [20], sintetizados en *GenBiotech*. La PCR se realizó con las siguientes condiciones: un paso de 94°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de: 1) 94°C durante 40 seg. 2) 55°C durante 1 minuto 3) 72°C durante 1 minuto; luego un ciclo final a 95°C durante 2 minutos y 8 minutos a 72°C.

Los productos de PCR, junto con un control negativo (PCR mix sin muestra), fueron luego corridos en un gel de agarosa 2% utilizando un marcador de 100 pb para corroborar la presencia de los amplicones y asegurar la pureza del producto.

Los geles fueron observados en un transiluminador por presencia de bromuro de etidio.

## **RESULTADOS PRELIMINARES**

### **Análisis por IHQ de marcadores de PI3K/Akt/mTOR**

En principio, se utilizaron para la puesta a punto de los anticuerpos seleccionados, cortes de tumores murinos [7] y de xenotransplantes de células T47D, IBH-6 e IBH-7 [13] [14] [19]. Como primera aproximación, evaluamos la marcación de Akt (isoformas 1,2,3), pAkt, pS6 y PTEN. Luego de probar

varias concentraciones y recapturas, se obtuvieron las condiciones óptimas para la utilización de estos anticuerpos (véase Materiales y Métodos).

La evaluación de algunas proteínas con los anticuerpos que poseíamos resultó difícil o incluso infructuosa, como ser la de p-p70S6K (quinasa de S6 fosforilada), pAkt1 (isoforma Akt1 fosforilada), pAkt2 (isoforma Akt2 fosforilada), CD31 (marcador de células endoteliales), IGF-1 y VEGF (factores de crecimiento). En estos casos, no se continuó intentando poner a punto la marcación pero se hará en un futuro, así como con otros marcadores que aún no se han podido adquirir o testear (PAR-4, CK-14, etc).

Para aquellos marcadores en que resultó exitosa la inmunohistoquímica, continuamos con el análisis de los mismos directamente en el *Tissue Microarray* (TMA), utilizando las concentraciones y condiciones ya determinadas. En el caso de PTEN, el anticuerpo funcionó tanto en xenotransplantes de T47D como en cortes de tumores de mama de archivo, pero no así en el TMA, a pesar de haber probado con varias recapturas y concentraciones. Debido a que las muestras incluidas en el TMA tienen cierta antigüedad, es posible que el anticuerpo de PTEN de *Cell Signaling* utilizado no funcione adecuadamente. Es por eso que probaremos en el futuro con otro anticuerpo que reconozca esta proteína, que pueda resultar funcional en estos tejidos.

De acuerdo a nuestro interés en evaluar el nivel de activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR, comenzamos evaluando los cortes marcados con pAkt y pS6 y realizamos el *score* correspondiente como se detalló en la sección anterior. Los valores obtenidos fueron volcados en una tabla junto con las características histopatológicas y clínicas de las pacientes (Tabla 3). Si bien Akt total también fue medido por inmunohistoquímica, la marca es más difusa que para pAkt y pS6, y además no necesariamente representa el nivel de activación de la vía, ya que mide niveles totales de proteína que podría estar inactiva. Es por eso que decidimos continuar con la evaluación de pS6 y pAkt.

A pesar de que pAkt dio positivo en casi todas las muestras, esto no se reflejó en la marca de pS6, donde sólo algunas fueron positivas (Figura 2). Encontramos marca para pS6 sólo en aquellas muestras con alto nivel de pAkt, por lo que podemos decir que pS6 es un marcador más fiel de la activación de la vía de PI3K/Akt que la fosforilación de Akt. También es posible que S6 sea fosforilado a través de la vía MEK/ERK [10] por lo que próximamente evaluaremos el nivel de pERK en las mismas muestras.

Por otra parte, observamos que la marca de pS6 es citosólica en todos los casos y se encuentra exclusivamente en el parénquima de los tumores analizados en este TMA y no en el estroma. En un trabajo reciente con la Dra. Polo [13], evaluamos pS6 por inmunohistoquímica en muestras de pacientes sometidas a una terapia antiestrogénica neoadyuvante. En estos casos, la presencia de este marcador en el estroma se asoció con el porcentaje de regresión tumoral luego de la terapia. De esta forma, hipotetizamos que mientras la presencia de pS6 epitelial se relaciona con el crecimiento tumoral, su presencia en el estroma se relaciona con la respuesta terapéutica.

Progresivamente, pusimos a punto nuevos marcadores para analizar en el TMA. Resultados obtenidos con la Lic. Riggio sugieren que las isoformas de Akt tendrían un rol diferencial en la invasión y migración celular, siendo que el silenciamiento de Akt1 (shAkt1) genera un aumento en la adhesión, migración e invasión en células de cáncer de mama humano T47D mientras que el silenciamiento de Akt2 (shAkt2) genera el efecto opuesto [15]. De acuerdo con estos resultados, se decidió evaluar en el TMA marcadores de adhesión y migración celular por inmunohistoquímica, entre ellos E-cadherina, vimentina e integrina  $\beta$ 1. Este último no se ha logrado poner a punto en el TMA, aunque sí se logró que funcione en xenotransplantes de células T47D e IBH-6.

La marca obtenida para E-cadherina en el TMA fue evaluada con un *score* como el ya descripto, excepto en aquellas muestras que no se encontraban en buenas condiciones en el corte del TMA y por lo tanto no eran evaluables (n/e), (Tabla 3 y Figura 3). La marca de vimentina, por otra parte, no fue fácil de evaluar por su disposición difusa en el estroma y en el citoplasma de las células tumorales por lo que aún no hemos establecido un *score* (Figura 3).

Otro marcador utilizado fue  $\alpha$ -SMA, que marca células estromales activadas. En el trabajo mencionado anteriormente [13] correlacionamos la presencia de este marcador con pS6 en el estroma y con la regresión tumoral, por lo que nos interesó describir lo que sucede en las muestras del TMA, que fueron tomadas previo al tratamiento de las pacientes. La marca de  $\alpha$ -SMA en muestras previo al tratamiento es muy tenue (Figura 3), y no se observan áreas de remodelado tisular, como sí se habían observado en las muestras de las pacientes tratadas [13].

### **Extracción de ADN y PCR**

Se realizó la purificación de ADN a partir de tejidos en parafina utilizando el método por columnas (kit Qiagen). En las primeras extracciones, se notó que la parafina no era debidamente disuelta por el xileno y se decidió mejorar este paso aumentando los pasajes por el solvente y los tiempos de incubación. Sin embargo, no se pudo mejorar la extracción de manera considerable.

Por otra parte, la medición del ADN obtenido en el NanoDrop fue casi nula en estas primeras extracciones y tampoco se pudo obtener bandas de ADN en un gel de agarosa. Se halló que gran parte del ADN (cerca de 500 ng/ $\mu$ l) quedaba en el primer eluido de las columnas. Se hizo la consulta pertinente con la empresa, pero no se logró resolver el problema.

Se decidió entonces utilizar el método de TRIzol para extraer ADN de las muestras en parafina, con el fin de mejorar el rendimiento. Mediante este método se logró desparafinar más y mejorar la disgregación del tejido, pero no se obtuvo una mayor cantidad de ADN.

Finalmente, se consideró que era posible que, si bien la cantidad de ADN no era detectable en un gel de agarosa, quizás fuera suficiente para lograr la amplificación por PCR de los fragmentos. Por ende, pensamos en realizar directamente la reacción luego de obtener los extractos, para lo cual se utilizó, a modo de ensayo, una muestra de tejido de ratón en parafina a la que se le aisló el ADN por ambos métodos. Los *primers* utilizados fueron los disponibles en el laboratorio, correspondientes a los genes del receptor de progesterona (PR) y GAPDH (ambos correspondientes a esta especie). Estos productos de PCR, junto con un control positivo de la reacción (ADN copia de ratón), fueron corridos en un gel de agarosa 2%. En el mismo, se observó la presencia de una banda de baja intensidad correspondiente al amplicón de PR en la fracción correspondiente al kit de Qiagen. De esta forma se entiende que, mejorando el proceso de disolución de la parafina, podremos lograr una extracción suficiente para la amplificación y posterior aislamiento del producto. En este procedimiento se está trabajando ahora.

Una vez que se haya puesto a punto exitosamente este paso, se procederá a secuenciar los productos para la genotipificación de las muestras humanas tanto para PTEN como para PIK3CA.

### **DISCUSIÓN**

En el presente trabajo, se logra poner a punto la determinación de biomarcadores de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR por inmunohistoquímica, utilizando muestras de archivo de pacientes con cáncer de mama de diverso tipo y estadio. A partir de estas muestras se realizó un *tissue microarray* (TMA) para agilizar y estandarizar la inmunomarcación. En cortes en blanco del TMA, se miden los niveles de pAkt y pS6. Debido a que la marcación de pS6 es más reproducible y confiable que la de pAkt, se considera que el primero es mejor marcador para determinar el nivel de activación de la vía. A pesar de que S6 puede ser fosforilado por la vía MEK/ERK [10], aquellas muestras con presencia de pS6 también presentan alto nivel de pAkt. En base a esto, se puede asumir que la activación de S6, al menos en parte, proviene de la vía de PI3K/Akt/mTOR.

Además, se observa que la marca de pS6 en las muestras del TMA (pacientes no tratadas) se encontraba exclusivamente en el epitelio tumoral, consistente con lo observado en un trabajo reciente de nuestro grupo [13]. En este trabajo, correlacionamos la presencia de pS6 en el estroma con la regresión tumoral, consecuencia del tratamiento recibido por las pacientes y en modelos pre-clínicos.

Por otro lado, en resultados anteriores de nuestro grupo de trabajo [15] se halló que las isoformas de Akt, Akt1 y Akt2, tienen roles opuestos en la adhesión, migración e invasión de células T47D *in vitro*. En base a esto, se decidió evaluar por inmunohistoquímica la presencia de E-cadherina (proteína relacionada con la adhesión célula-célula) y vimentina en los TMA, ambas importantes en el proceso de migración.

Queda aún por analizar la correlación entre estos biomarcadores y distintos parámetros clínicos como el tiempo de recurrencia de la enfermedad y el tiempo de supervivencia de las pacientes. Para poder sacar conclusiones en este aspecto, requeriremos extender el análisis a más muestras de pacientes en las mismas condiciones de estudio. Para ello, contamos con la aceptación de tres Centros Oncológicos que han comenzado a enviarnos muestras que aún no han sido procesadas en su totalidad. Ya estamos generando nuevos *arrays* de tejidos de forma similar a lo realizado con las muestras presentadas en este trabajo y en ellos evaluaremos estos y nuevos marcadores que puedan surgir. Con la información obtenida en nuevas cohortes de pacientes, buscaremos entonces si existe relación entre



el nivel de expresión de los marcadores de la vía PI3K/Akt/mTOR, la respuesta terapéutica y la progresión de la enfermedad.

Por otra parte también se quiso evaluar, en las muestras analizadas por inmunohistoquímica, la presencia de mutaciones frecuentes en cáncer de mama, en los genes PIK3CA (exones 9 y 20) y PTEN. Se plantea que estas mutaciones estarían asociadas al desarrollo de resistencia a la terapia endócrina [3].

La extracción de ADN a partir de cortes en parafina normalmente resulta de bajo rendimiento por las dificultades técnicas que se presentan, debidas principalmente a la prolongada fijación del tejido. En base a esto, se decidió utilizar un kit comercial que consiste en la separación del ADN por columnas. Sin embargo, luego de intentar diferentes métodos de disolución de la parafina y digestión del tejido (incluyendo el indicado en la guía provista por el kit), el rendimiento de la extracción resultó ser muy bajo.

Con el fin de obtener una mayor cantidad de ADN, necesaria para amplificar por PCR los genes de interés, procedimos a utilizar otro método de extracción. En este laboratorio se utiliza de rutina el TRIzol Reagent (Invitrogen) para la extracción de ARN, y siendo que puede utilizarse también para extracción de ADN y proteínas, se intentó realizarlo por este método. No obstante, el rendimiento no fue mucho mayor, aunque sí se logró extraer ADN de líneas celulares que se utilizarán como control de las mutaciones en PIK3CA y PTEN (véase Materiales y Métodos).

Luego de consultar con el Dr. Martín Abba, de la Universidad de La Plata, quien ha realizado extracciones de ADN a partir de muestras parafinadas, hemos decidido testear la extracción con un nuevo protocolo que él nos proporcionó. Consiste en desparafinar exhaustivamente con xileno a tiempos y temperaturas mayores a las utilizadas, y realizar una larga digestión del tejido con proteinasa K y buffer de digestión. Luego, la muestra es sometida a una purificación utilizando una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Una vez extraído, se realizará la amplificación de PIK3CA (exones 9 y 20) y PTEN con los *primers* que ya se poseen (Tabla 2), los amplicones serán separados mediante electroforesis en gel de agarosa y luego enviados a secuenciar para analizar las mutaciones pertinentes.

Mientras tanto, se está poniendo a punto la reacción de PCR para cada set de *primers* en las líneas celulares correspondientes usadas como control (Tabla 1).

Creemos que el presente estudio contribuye al avance inicial del desarrollo de una técnica sencilla y efectiva, aplicable en un laboratorio clínico, para evaluar el nivel de activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR, que se ha propuesto está implicada en la progresión de la enfermedad y en el desarrollo de resistencia endócrina de tumores positivos para receptores hormonales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beelen K (a), Opdam M, Severson TM, Koornstra RH, Vincent AD, Wesseling J, et al. PIK3CA mutations, phosphatase and tensin homolog, human epidermal growth factor receptor 2, and insulin-like growth factor 1 receptor and adjuvant tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Can Res.* 2014 Jan 27;16(1):R13.
2. Beelen K (b), Opdam M, Severson TM, Koornstra RH, Vincent AD, Wesseling J, et al. Phosphorylated p-70S6K predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients randomized between adjuvant tamoxifen versus no systemic treatment. *Breast Can Res.* 2014 Jan 21;16(1):R6.
3. Brown KK, Tokar A. The phosphoinositide 3-kinase pathway and therapy resistance in cancer. *F1000Prime Rep.* 2015 Feb 3;7:13.
4. Ciruelos Gil EM. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014 Aug;40(7):862-71.
5. Elkabets M<sub>1</sub>, Vora S, Juric D, Morse N, Mino-Kenudson M, Muranen T, et al. mTORC<sub>1</sub> inhibition is required for sensitivity to PI3K p110 $\alpha$  inhibitors in PIK3CA-mutant breast cancer. *Sci Transl Med.* 2013 Jul 31;5(196):196ra99.
6. Instituto Nacional del Cáncer. Análisis de la situación del cáncer en Argentina (sitio en internet). Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>. Acceso el 1 de julio de 2015.
7. Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MC, et al. The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Jun;16(2):333-50.
8. Lasarge CL, Danzer SC. Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. *Front Mol Neurosci.* 2014 Mar 14;7:18.
9. López-Knowles E, O'Toole SA, McNeil CM, Millar EK, Qiu MR, Crea P, et al. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer.* 2010 Mar 1;126(5):1121-31.
10. Ma L, Teruya-Feldstein J, Bonner P, Bernardi R, Franz DN, Witte D, et al. Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. *Cancer Res.* 2007 Aug 1;67(15):7106-12.
11. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):224.
12. Paplomata E, O'Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol.* 2014 Jul;6(4):154-66.
13. Polo ML, Riggio M, May M, Rodríguez J, Perrone MC, Stallings-Mann M, et al. Activation of PI3K/Akt/mTOR signaling in the tumor stroma drives endocrine therapy-dependent breast tumor regression. *Oncotarget* 2015 Jun (Epub ahead of print). Disponible en: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5b%5d=4203>.
14. Riggio M, Polo ML, Blaustein M, Colman-Lerner A, Lüthy I, Lanari C, et al. PI3K/AKT pathway regulates phosphorylation of steroid receptors, hormone independence and tumor differentiation in breast cancer. *Carcinogenesis.* 2012 Mar;33(3):509-18.
15. Riggio M, Polo ML, May M, Perrone MC, Rodríguez MJ, Lanari C, et al. Opposite roles of Akt<sub>1</sub> and Akt<sub>2</sub> in ccell migration and invasion through  $\beta$ 1-integrin regulation. Presentado en The Third South American Spring Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine (SISTAM); 2015 Abr 1-6; Bariloche, Argentina.
16. Sanchez CG, Ma CX, Crowder RJ, Guintoli T, Phommaly C, Gao F, et al. Preclinical modeling of combined phosphatidylinositol-3-kinase inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011 Mar 1;13(2):R21.
17. Sandell S, Schuit RJ, Bunyan DJ. An intronic polymorphic deletion in the PTEN gene: implications for molecular diagnostic testing. *Br J Cancer.* 2013 Feb 5;108(2):438-41.
18. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015 Jan-Feb;65(1):5-29.
19. Vázquez SM, Mladovan A, Garbovesky C, Baldi A, Lüthy IA. Three novel hormone-responsive cell lines derived from primary human breast carcinomas: functional characterization. *J. Cell. Physiol.*, 199, 460-469.
20. Vorkas PA, Poumpouridou N, Agelaki S, Kroupis C, Georgoulas V, Lianidou ES. PIK3CA hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high-resolution small amplicon melting analysis method. *J Mol Diagn.* 2010 Sep;12(5):697-704.
21. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110 $\alpha$  of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 19;105(7):2652-7.

## ANEXO

**Tabla 1.** Líneas celulares humanas utilizadas como control para las mutaciones en PI3K y PTEN. (Tomado de Sánchez et al., 2011<sup>[16]</sup>)

Línea celular	Origen	Genotipo
MCF-10A	Línea celular epitelial de mama	Wild type
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama HR+	PIK3CA E545K
T47D	Línea celular de cáncer de mama HR+	PIK3CA H1047R
ZR75	Línea celular de cáncer de mama HR+	PTEN mutado

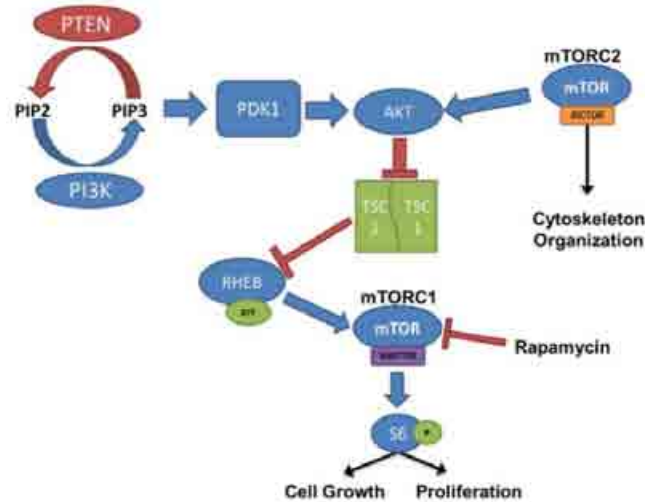
**Tabla 2.** Secuencias de los oligonucleótidos de PIK3CA y PTEN utilizados en este estudio.

Gen	Zona	Set de primers	Secuencia (F: forward; R: reverse)	Tamaño amplicón
PIK3CA	Exón 9	S9	F: 5'-GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA-3'	92 pb
			R: 5'-TCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC-3'	
		L9	F: 5'-ATCCAGAGGGGAAAAATATG-3'	261 pb
			R: 5'-ATGCTGAGATCAGCCAAAT-3'	
	Exón 20	S20	F: 5'-GAGGCTTTGGAGTATTTTCAT-3'	70 pb
			R: 5'-AATCCATTTTTGTTGTCCAG-3'	
L20		F: 5'-TCATTTGCTCCAAACTGACCAA-3'	352 pb	
		R: 5'-TGGAATCCAGAGTGAGCTTTCA-3'		
PTEN	Intrón 1 – exón 2	PTEN	F: 5'-AAATCAACTCAATCATGTGAAAGC-3'	Normal: 1752 pb Mutado: 853 pb
			R: 5'-GGTGACCAGCATTTTATGGAG-3'	

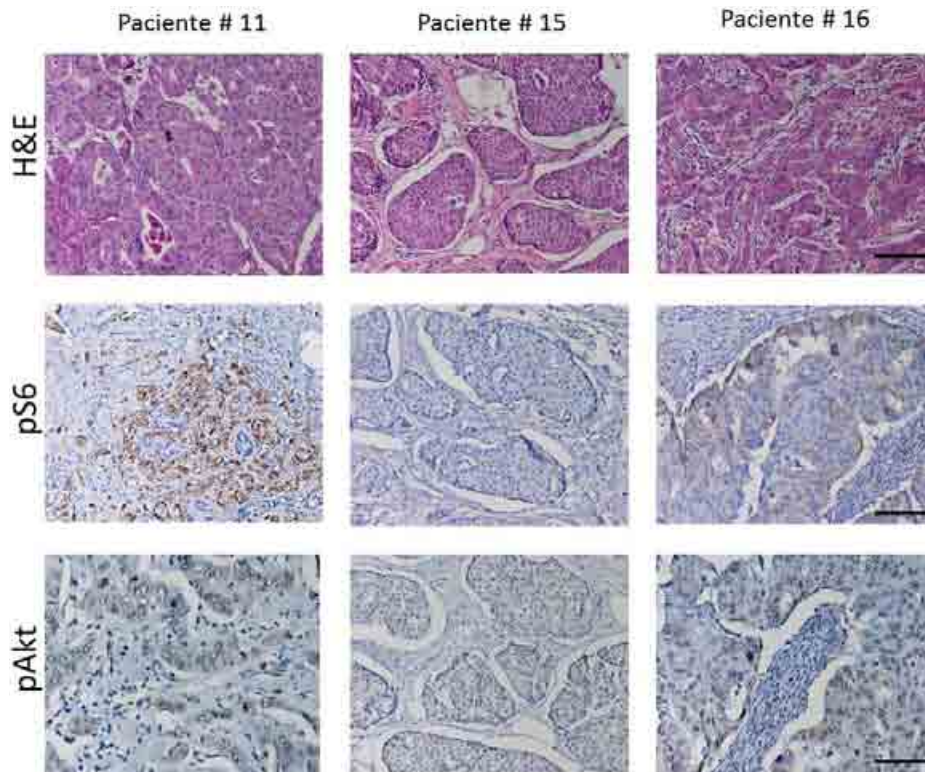
**Tabla 3:** Características de las pacientes con cáncer de mama del CORI.

# Paciente	Edad (años)	Tamaño tumoral (cm)	Nodo (+/nodos totales)	Metástasis	Datos histopatológicos y factores pronóstico								
					Subtipo	Grado	ER (%)	PR (%)	HER-2	Ki-67 (%)	pAkt score*	pS6 score*	E-cad score*
1	42	2	3/11	Hueso	CDI	II	80	80	Neg.	40	85	0	0
2	64	2	4/10	Hueso	CDI	I	90	70	Neg.	20	170	0	0
3	72	2,5	0/6	Hueso	CDI	III	80	40	Neg.	10	40	0	40
4	72	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c
5	74	1	n/d	Hueso/Pulmón	SE	n/c	70	40	Neg.	10	160	0	n/e
6	38	2	n/d	Hueso/Pulmón	CDI	II	90	50	Neg.	30	297	297	n/e
7	38	2	n/d	Hueso/Pulmón	CDI	II	90	50	Neg.	30	0	0	0
8	64	1,3	n/d	n/d	CDI	II	80	20	Neg.	60	160	0	160
9	86	n/d	n/d	Hueso	SE	n/c	30	0	Neg.	2	0	0	0
10	36	0,4	0/5	Hueso/Piel	CDI	II	80	80	Neg.	20	180	0	0
11	59	1,7	n/d	Hueso	CDI	III	90	80	Neg.	30	240	225	150
12	45	n/d	n/d	Hueso	SE	III	70	60	Neg.	5	40	0	0
13	73	2	n/d	Hueso	SE	III	90	70	Neg.	10	60	0	0
14	74	n/a	n/d	No	n/d	n/d	100	80	Neg.	60	80	0	n/e
15	66	2,3	2/10	No	CDI	II	90	80	Neg.	5	80	0	0
16	63	1,5	0/1	Hueso	CDI	III	30	0	Neg.	60	45	90	0

**Figura 1. Esquema de la vía PI3K/Akt/mTOR.** mTOR es activado por la señalización a través de la vía PI3K/Akt, regulando el crecimiento y la proliferación celular. PTEN actúa como regulador negativo de la vía, y su pérdida lleva a sobreactivación de mTOR, y así de la proliferación, mediante la fosforilación de S6. (Tomado de LaSarge et al., 2014)

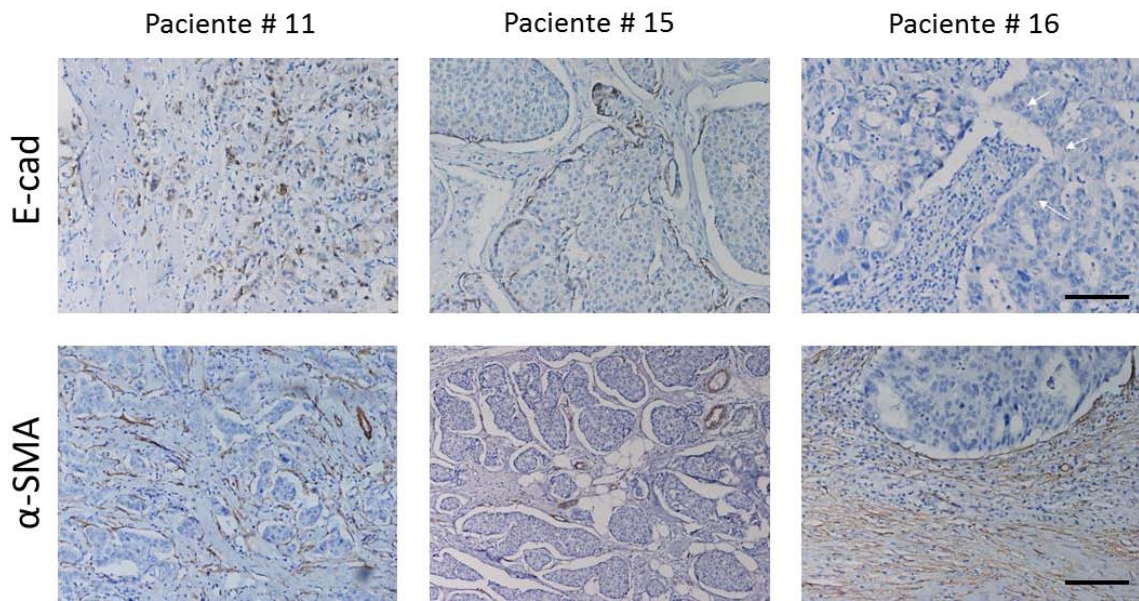


**Figura 2. Inmunohistoquímica de muestras representativas del TMA.** *Arriba:* Tinción con hematoxilina y eosina. *Medio:* marca para pS6, se pueden observar 3 niveles muy distintos de activación de la vía (paciente 11 muy alta, paciente 15 nula, paciente 16 baja, ver Tabla 3.). *Abajo:* marca para pAkt, se encuentra activo en las 3 muestras, aunque la marca es más intensa en aquellas pS6 positivas. Barra: 100 µm.



**Figura 3. Inmunohistoquímica de muestras representativas del TMA.** *Arriba:* marca para E-cadherina, proteína de adhesión celular. Los niveles de E-cadherina varían de acuerdo a los tumores, y normalmente están relacionados con la capacidad migratoria de las células. En el paciente 16 se observa que las células que están invadiendo el tejido circundante (flechas), son negativas para E-

cadherina. *Abajo*: marca para  $\alpha$ -SMA, marcador de activación de células estromales. Si bien en todas estas muestras se observan células estromales, no todas son  $\alpha$ -SMA positivas, indicando que en distintos tejidos, la activación de estas células varía. Barra: 100  $\mu$ m.



# CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE BIOPSIAS DE CÁNCER DE MAMA DE PACIENTES ARGENTINAS: CORRELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS Y DE RESPUESTA A LA TERAPIA NEOADYUVANTE

Juan Martín Sendoya

Fundación Instituto Leloir

Directora: Andrea Sabina Llera

## RESUMEN

La incidencia del cáncer de mama en Argentina es de 88,1 casos cada 100.000 habitantes. Por ser una enfermedad de compleja base genética y clínicamente heterogénea, es un desafío en su diagnóstico y tratamiento. Este estudio se propuso estudiar la expresión de genes (perfil molecular) de pacientes argentinas mediante biopsias de cáncer de mama sin evidencias de metástasis, y utilizar los datos de perfil molecular para clasificarlas en subtipos intrínsecos (luminal A, luminal B, basal y enriquecido en HER2) definidos por la matriz de genes PAM50. De esta manera, se obtuvieron datos de expresión de genes de 236 pacientes por microarreglos, que luego fueron subtipificados bioinformáticamente por PAM50. Luego, se buscó correlacionarlos mediante pruebas estadísticas  $\chi^2$  de Pearson con datos clínico-patológicos, de ancestría autorreferida y de respuesta a la terapia neoadyuvante. Como resultado, fue posible distinguir los mismos subtipos que en el resto del mundo y se obtuvo un panorama de la frecuencia de aparición de cada uno de ellos. Se hallaron correlaciones de los mismos con estadio clínico, receptores inmunohistoquímicos y ancestría [ $p$  ( $\chi^2$  Pearson) 0,0397; <0,0001 y 0,015 respectivamente]. La integración de estos análisis es el primer paso hacia nuevas herramientas moleculares que puedan cambiar el paradigma del tratamiento del cáncer de mama en Argentina.

## ABSTRACT

In Argentina, the incidence of breast cancer is 88.1 cases/100,000 individuals. Given its complex genetic basis and clinical heterogeneity, the current diagnosis and treatment of breast cancer remains a challenge. This study is aimed to obtain gene expression data (molecular profile) from Argentine patients' breast cancer biopsies without evidence of metastasis, and use it to classify them into intrinsic subtypes (luminal A, luminal B, basal and HER2-enriched) defined by the PAM50 gene matrix. Thus, the group generated gene expression data from microarrays of 236 patients, who were then subtyped by PAM50 bioinformatic algorithms. Next, the possibility of correlation of gene expression patterns with clinical, pathological, autoreferencial ancestry, and response to neoadjuvant therapy data was evaluated using Pearson  $\chi^2$  tests. As a result, it was possible to classify our population within the same subtypes described for the rest of the world, while obtaining a trend of their distribution among the population. Correlations were found with clinical stage, immunohistochemical receptors and ancestry data [ $p$  ( $\chi^2$  Pearson) 0.0397; <0.0001 and 0.015 respectively]. The integration of these analyses is the first step towards new molecular tools that may change the treatment paradigm for breast cancer in Argentina.

El proyecto que dio origen al plan de trabajo de Juan Martín Sendoya es un proyecto regional y multicéntrico de la red *United States-Latin America Cancer Research Network* (US-LACRN) y se encuentra protegido por **tratados de confidencialidad vigentes** en todos los países participantes y con todos los centros activos. Recién después de la primera publicación conjunta de resultados de US-LACRN, que reconocerá debidamente el apoyo financiero del Instituto Nacional del Cáncer (INC)-Ministerio de Salud de la Nación, se liberará la publicación del informe completo de Juan Martín Sendoya, el cual fue evaluado en confidencialidad y aprobado por el INC.



**ESTUDIO PROSPECTIVO, OBSERVACIONAL, DE CORTE TRANSVERSAL Y  
MULTICÉNTRICO DE PACIENTES CON TUMORES HEPATO-BILIO-PANCREÁTICOS  
(HBP) MEDIANTE EL REGISTRO INSTITUCIONAL DE TUMORES DE LA ARGENTINA  
(RITA) Y BASE HBP**

**Pin Ying Chen**

Instituciones participantes

Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo, CABA.

Hospital Centro de Salud Zenón Santillán, provincia de Tucumán.

Fundación Oncológica Rodríguez Alzola, provincia de Salta.

Hospital Universitario de la Fundación Favaloro, CABA.

Hospital Interzonal San Juan Bautista, provincia de Catamarca.

Sanatorio Pasteur, provincia de Catamarca.

**Directora:** Marcela A. Carballido

**RESUMEN**

**Antecedentes:** Los cánceres HBP forman un grupo heterogéneo que se distingue por su alta morbi-mortalidad, diagnóstico tardío, complejidad de manejo, escasez de terapéuticas efectivas y de trabajos cooperativos.

**Objetivos:** Aplicar el RITA en casos HBP. Aportar información sociodemográfica, estadio y sobrevida. Estimular el trabajo intra e interinstitucional.

**Materiales y método:** Se incluyeron pacientes con diagnóstico imagenológico y/o histológico de cáncer HBP desde 1/junio/2013 hasta 31/mayo/2015 en los hospitales de Gastroenterología Udaondo (HBU), CABA; Zenón Santillán, Tucumán; Fundación Oncológica Rodríguez Alzola (FORA), Salta; Favaloro, CABA; San Juan Bautista y Sanatorio Pasteur, Catamarca.

**Resultados:** Se registraron 490 pacientes: 296 (60%) del HBU, 88 (18%) del Zenón Santillán, 44 (9%) del FORA; 41 (8%) Favaloro; 12 (3%) Sanatorio Pasteur y 9 (2%) San Juan Bautista. Rango etario mayoritario: 60-64 años. hombres 260 (53%) y mujeres 230 (46%). Estadios a la presentación (E): Eo, 1%; E1, 7%; EII, 15%; EIII, 26%, EIV, 42% y desconocido 10%. Performance Status (PS): PSo, 14%; PS1, 41%; PS2, 22%; PS3, 13%; PS4, 2% y desconocido 7%. Supervivencia global: 6,5 meses.

**Conclusión:** Este registro nos ha permitido conocer el estado de situación en HBP. Constituye una herramienta fundamental para detectar las dificultades existentes a fin de mejorar los resultados en salud.

**ABSTRACT**

**Background:** The HBP cancers are a heterogeneous group distinguished by its high morbidity and mortality, delayed diagnosis, management complexity, lack of effective therapeutic and cooperative works.

**End points:** Apply the RITA in patients with HBP cancers. Provide social-demographic information, stage at presentation and survival. Stimulate intra and inter-institutional working.

**Materials and method:** 490 patients with imaging and/or histological diagnostic of HBP cancer were recorded since June 1<sup>st</sup>, 2013 until May 31<sup>th</sup>, 2015, from the following hospitals: Gastroenterology Udaondo (HBU), CABA; Zenón Santillán, Tucumán; Oncologic Foundation Rodríguez Alzola (FORA), Salta; Favaloro Foundation, CABA; San Juan Bautista and the Pasteur Clinic, Catamarca.

**Results:** 490 patients were recorded: 296 (60%) from HBU, 88 (18%) Zenón Santillán, 44 (9%) FORA; 41 (8%) Favaloro; 12 (3%) Pasteur and 9 (2%) San Juan Bautista. Majority age range: 60-64 years-old. 260 (53%) men and 230 (46%) women. Stage (S) presented: So, 1%; S1, 7%; SII, 15%; SIII, 26%; 42%, SIV and 10% unknown. Performance Status (PS): PSo, 14%; PS1, 41%; PS2, 22%; PS3, 13%; PS4, 2% and 7% unknown. Overall survival: 6.5 months.

**Conclusions:** The RITA allows to know the state of the art in HBP. It is a fundamental tool to detect the existing difficulties as to improve health results.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son en la actualidad la principal causa de mortalidad mundial. En el mundo, de los 57 millones de defunciones que se produjeron en 2008, casi las dos terceras partes se debieron a ENT. De estas defunciones, el cáncer figura como la segunda causa - responsable de 7,6 millones de muertes, de las cuales más de dos terceras partes ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos.

En cuanto a incidencia, la Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172.3-242.9/100000 habitantes), de acuerdo a las estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) para el año 2012. Esta estimación corresponde a más de 100.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres. Con estos números, la IARC ha estimado para la Argentina una incidencia en ambos sexos de 217 casos nuevos por año cada 100.000 habitantes [1]. Esta situación es suficiente para considerar al cáncer como problema prioritario de salud pública para la Argentina.

Entre los tumores malignos, los hepato-bilio-pancreáticos constituyen un grupo heterogéneo que se distingue por su alta morbi-mortalidad. A diferencia de la mayoría de los cánceres, éstos están aumentando su incidencia -se estima que el tumor maligno de páncreas constituya la segunda causa de mortalidad por cáncer en el mundo para el 2020. La supervivencia a 5 años para este grupo de pacientes en general no supera el 10%, siendo cirugía la única modalidad terapéutica que puede ofrecer posibilidad de curación, pero esto sucede sólo en pocos pacientes dado que la mayoría se presentan en estadíos inoperables (Tabla 1) [2].

Argentina	N	(%) Acumulado	Centro	Cuyo	NEA	NOA	Sur
Pulmon	9218	15,9	Pulmon	Pulmon	Pulmon	Pulmon	Pulmon
Colon-recto	6772	27,6	Colon-recto	Mama	Colon-recto	Mama	Colon-recto
Mama	5450	37,1	Mama	Colon-recto	Mama	Próstata	Estómago
Pancreas	3786	43,6	Pancreas	Próstata	Próstata	Colon-recto	Mama
Próstata	3753	50,1	Próstata	Pancreas	cervix	Pancreas	Mal def.
Mal def.	3415	56,0	Mal def.	Estómago	Estómago	Estómago	Pancreas
Estómago	2795	60,8	Estómago	Mal def.	Mal def.	Hígado/V.Bil.	Próstata
Esófago	1831	64,0	Riñon/Vías U.	Hígado/V.Bil.	Pancreas	cervix	Esófago
Hígado/V.Bil.	1755	67,0	Leucemia	Esófago	Esófago	Vesicula	Leucemia
cervix	1744	70,1	Esófago	cervix	Leucemia	Esófago	Riñon/Vías U.
Total	57839	100,0	72,1	7,6	6,9	7,8	5,7

Tabla 1. Principales localizaciones registradas en la mortalidad por cáncer de hombres y mujeres de Argentina y sus regiones. Boletín de vigilancia epidemiológica del INC. Año 1. N° 1. Octubre 2013

Los tumores HBP se caracterizan por el diagnóstico tardío, la complejidad en el manejo, la relativa escasez de terapéuticas efectivas, y la falta de trabajos cooperativos sobre estas patologías. Dadas las particularidades que nuestro país presenta y las marcadas variaciones regionales observadas en estos tumores, los registros locales cobran aún mayor importancia, ya que los promedios nacionales no siempre reflejan las realidades regionales, y la extrapolación no necesariamente es acertada. Esto genera la necesidad imperiosa de desarrollar registros que permitan una mejor comprensión, y así promover el desarrollo de líneas de investigación para mejorar los resultados.

Si bien para poder tener un panorama de la incidencia de cáncer en Argentina es conveniente contar con registros poblacionales en zonas con características geográficas, demográficas y culturales



distintas, y con tamaños poblacionales que permitan una buena cobertura, los registros monográficos pueden ser la excepción. Es decir, registros que se dedican solo a un tumor específico o a determinados grupos etarios debido a la poca cantidad de casos que se presentan por año en comparación con otros tumores.

Mediante este proyecto, se aplicó por segundo año consecutivo el Registro Institucional de Tumores de la Argentina (RITA) diseñado por el Instituto Nacional del Cáncer, en pacientes con tumor maligno primario HBP en instituciones localizadas en distintas regiones geográficas del país. Se buscó aportar información en relación a las características sociodemográficas, el estadio a la presentación y la morbi-mortalidad de este grupo de pacientes en la Argentina.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

Diseño del estudio: prospectivo, observacional, de corte transversal y multicéntrico.

Criterio de inclusión: paciente con sospecha clínica y diagnóstico imagenológico, y/o histológico de cáncer de hígado, vesícula, vía biliar, ampolla de Vater y páncreas que concurrieron a las instituciones participantes durante el período de 01 de junio del 2013 hasta el 31 de mayo del 2015, sea para diagnóstico, tratamiento o en busca de segunda opinión.

Se excluyeron los casos de tumores neuroendócrinos puros, pues actualmente ya existe un registro multicéntrico activo.

Los centros participantes fueron 6:

- 1) En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, el Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo, mediante la Dra. Marcela Carballido.
- 2) En la Provincia de Tucumán, en San Miguel de Tucumán, el Hospital Centro de Salud Zenón J. Santillán, mediante el Dr. Rodrigo Segovia.
- 3) En la Provincia de Salta, en Salta capital, la Fundación Oncológica Rodríguez Alzola dirigido por el Dr. Gerardo Arroyo.
- 4) En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, el Hospital Universitario de la Fundación Favaloro mediante el Dr. Guillermo Méndez.
- 5) En la Provincia de Catamarca, el Hospital Interzonal San Juan Bautista mediante el Dr. Hernán Cáceres.
- 6) En la Provincia de Catamarca, el Sanatorio Pasteur mediante el Dr. Hernán Cáceres.

Todos estos centros se caracterizan por contar con un Comité de Tumores en donde se realiza regularmente la discusión interdisciplinaria de patologías complejas.

El material utilizado para el registro consistió en el programa informático RITA diseñado por el Instituto Nacional del Cáncer con plataforma virtual y sus fichas de registro, además de una Base sitio-específico HBP.

El RITA es un sistema de información centralizado sobre una plataforma web, en el cual se almacena la información en bases de datos relacionales, y representa un pilar fundamental del Sistema de Vigilancia Epidemiológica y reporte del Cáncer (SIVER-Ca) de la Argentina.

La metodología de relevo de datos ha sido primero de forma manual mediante el llenado de la Base sitio-específico HBP de los pacientes con tumores HBP. Luego, dichas fichas fueron remitidas a la becaria de manera personalizada o virtual para ser transcritas a la plataforma virtual RITA, la cual se accede con una contraseña entregada por el INC.

La plataforma del RITA provee un foro de discusión abierta a los miembros integrantes que permite evacuar dudas, reportar errores, proponer mejoras y debatir sobre temas de controversias en codificación y manejo del software.

La fuente principal de relevo de casos en todos los centros son las historias clínicas, y centros como el Htal. Universitario Fundación Favaloro y el Sanatorio Pasteur que cuentan con historia clínica electrónica.

En el caso del hospital público monovalente de gastroenterología, intervinieron los siguientes departamentos:

1. Archivo Hospitalario
2. Departamento de Estadística
3. Servicio de Anatomía Patológica (informe de citologías, biopsias y piezas quirúrgicas)
4. Servicio de Oncología Clínica
5. Servicio de Cirugía
6. Consultorios externos específicos relacionados con HBP (consultorio de páncreas y consultorio de cirugía)
7. Comité de Tumores: comité de hígado y comité bilio-pancreático.

Para definir la topografía y la morfología nos regimos según la clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología (CIE-O 3ª edición).

Para la estadificación se utilizó la 7ª edición del Manual de Estadificación TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC).

La sobrevida global fue medida desde la fecha del diagnóstico hasta la del último contacto, y para su análisis estadístico se utilizó el programa informático MedCalc para construir las curvas de Kaplan-Meier y el análisis de regresión Cox.

El seguimiento de los casos se dejó a criterio de cada institución participante, con previo conocimiento de que los casos "perdidos" y de visita única deben ser excluidos del cálculo de supervivencia.

En el caso particular del Htal. de Gastroenterología Udaondo, fueron aplicados 2 métodos de seguimiento:

- Seguimiento pasivo: llegada de información acerca del paciente mediante recepción de llamadas telefónicas de familiares o del propio paciente, mensajes de texto y novedades reportados en las reuniones de Comité de Tumores.
- Seguimiento activo: búsqueda dirigida de los datos faltantes en las diversas fuentes de información hospitalaria y llamadas telefónicas semestrales a los pacientes perdidos, independientemente de su lugar de residencia.

Este registro no requiere de pedido de consentimiento informado a los pacientes por las normativas de confidencialidad y disociación de datos descriptos en la Ley 25.326 de Protección de Datos Personales y su Decreto Reglamentario 1558/2001-Protección de Datos Personales.

## RESULTADOS

Desde el 1<sup>ro</sup> de junio de 2013 al 31 de mayo de 2015 inclusive, se registraron un total de 490 casos que cumplían con el criterio de inclusión en los centros intervinientes. Del total de casos, 296 (60%) correspondían al Htal. de Gastroenterología Udaondo, 88 (18%) al Htal. Zenón Santillán, 44 (9%) a la FORA; 41 (8%) a Favaloro; 12 (3%) al Sanatorio Pasteur y 9 (2%) al Htal. San Juan Bautista. (Figura 1)

## RITA multicéntrico Hepato-Bilio-Pancreático

- Htal. de Gastroenterología Udaondo. CABA   ■ Htal. Universitario Favaloro. CABA
- Htal. Zenón Santillán. TUCUMAN   ■ FORA. SALTA
- Htal. San Juan Bautista. CATAMARCA   ■ Sanatorio Pasteur. CATAMARCA

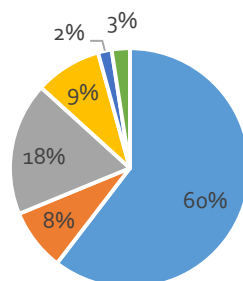


Figura 1

En la distribución por sexos: 260 (53%) casos fueron hombres y 230 (46%) fueron mujeres. El rango etario más frecuente para ambos sexos fue de 60 a 64 años (Figura 2).

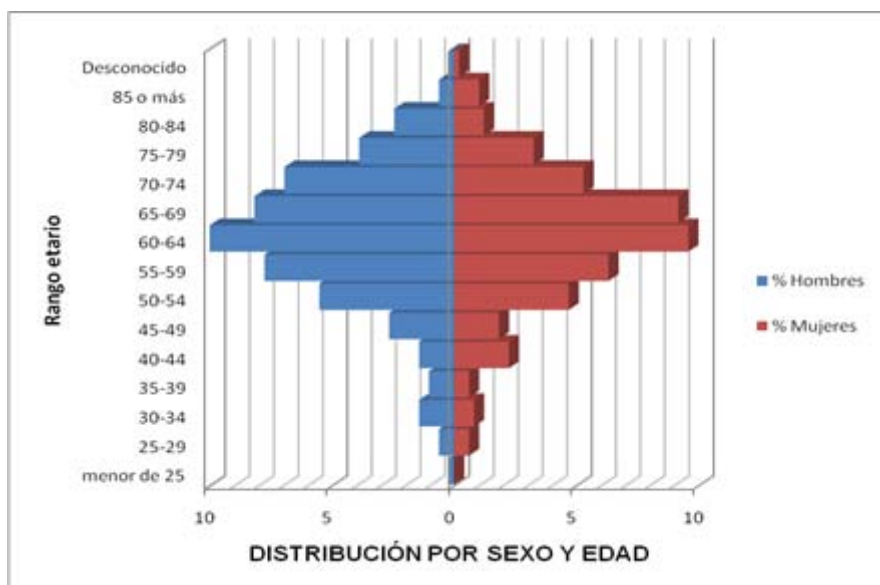


Figura 2

El performance status de los pacientes a la presentación fue: PS0, 14%; PS1, 41%; PS2, 22%; PS3, 13%; PS4, 2% y desconocido 7%. (Figura 3)

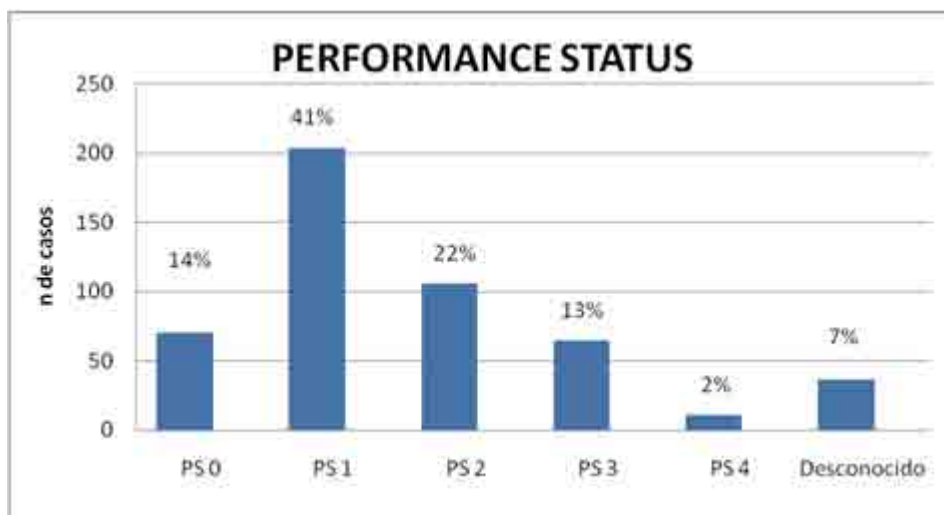


Figura 3

Los estadios a la presentación para todos los tipos tumorales fueron los siguientes: Eo, 1%; EI, 7%; EII, 15%; EIII, 26%; EIV, 42% y desconocido 10%. (Figura 4)

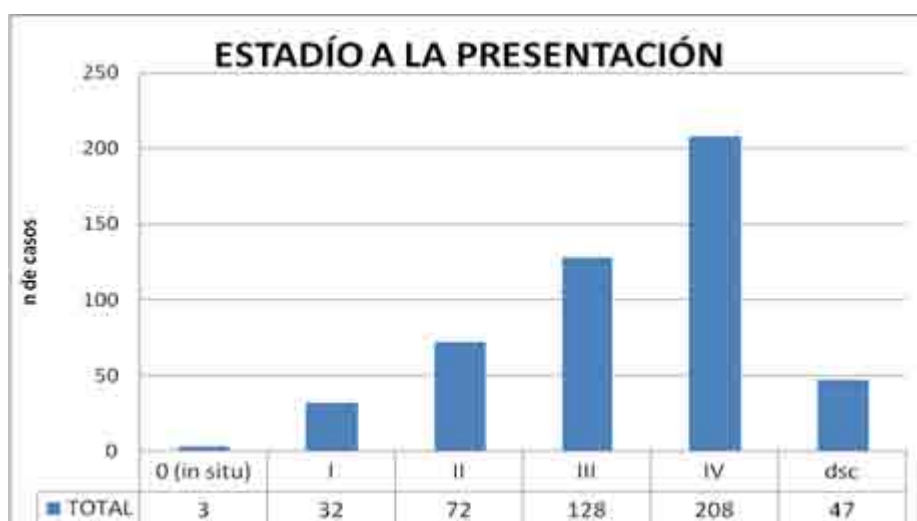


Figura 4

La distribución de los pacientes por topografía en los centros intervinientes fue según se ilustra en la Figura 5.

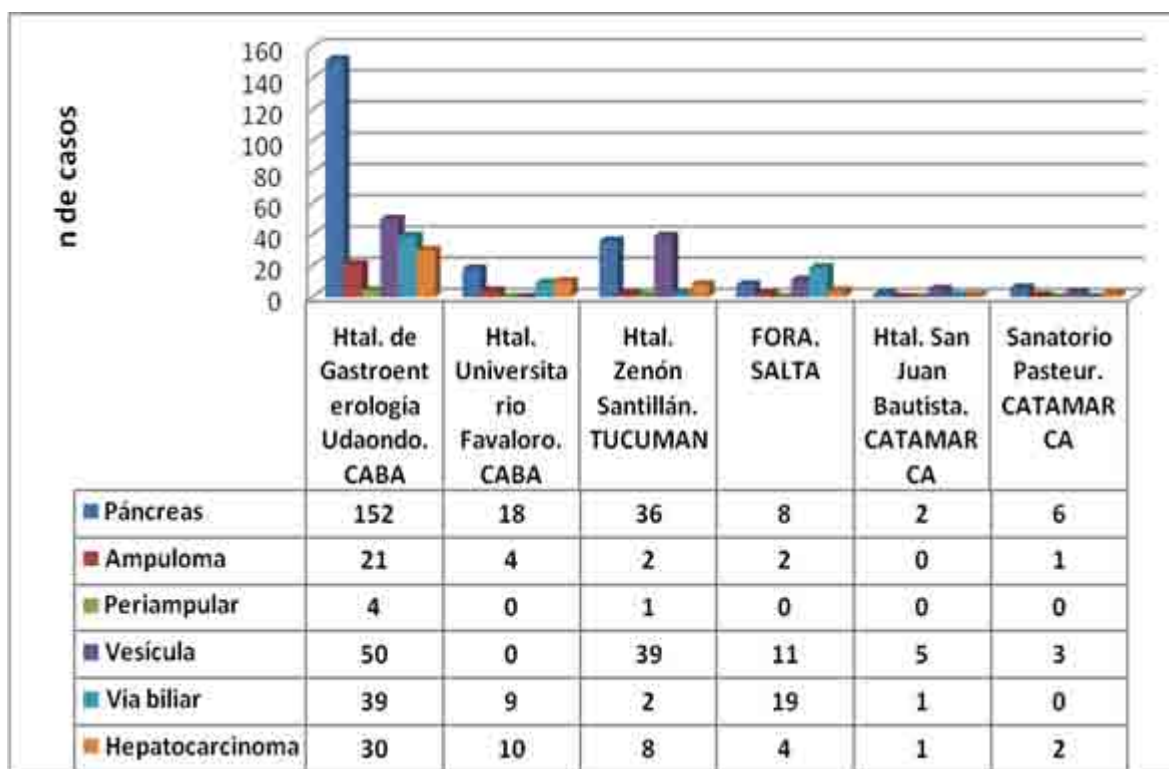


Figura 5

El estado de último contacto de los pacientes son: (Tabla 2)

RITA multicéntrico HBP	Páncreas	Ampuloma	Periapular	Vesícula	Vías biliares	Hígado
Óbitos	83	4	3	42	28	17
Vivos	48	20	1	15	10	14
Visita Unica	39	1		6	12	3
Perdidos*	52	5	1	45	20	21
<b>Total de casos</b>	<b>222</b>	<b>30</b>	<b>5</b>	<b>108</b>	<b>70</b>	<b>55</b>

Tabla 2

\* NOTA: Se considera "perdido" a los casos en que no se obtuvieron novedades en los últimos 3 meses. Hay que considerar que algunos centros reciben en su gran mayoría "casos de visita única o segunda opinión", por ejemplo: FORA de la provincia de Salta.

La supervivencia global de los pacientes fue de 6,5 meses para todos los pacientes HBP en general (Figura 6) y en la Figura 7 se ilustra la curva de supervivencia por topografía.

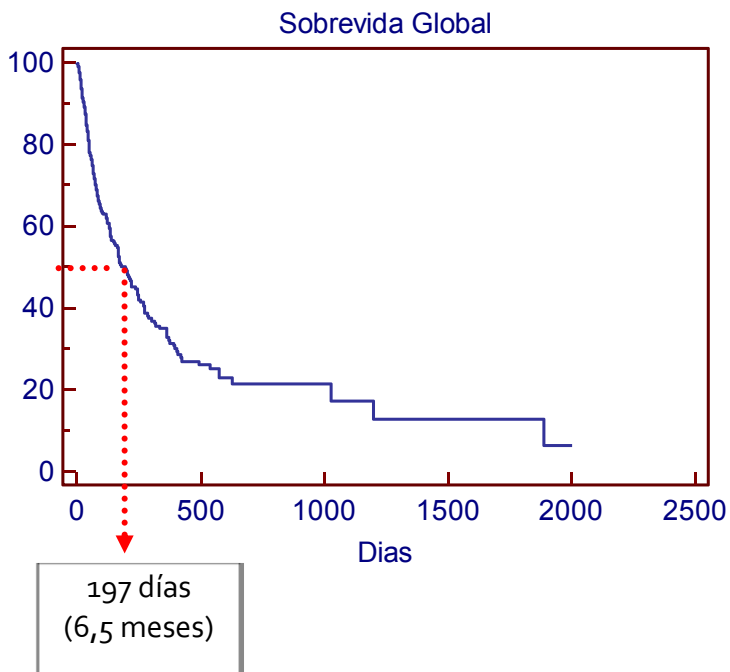


Figura 6

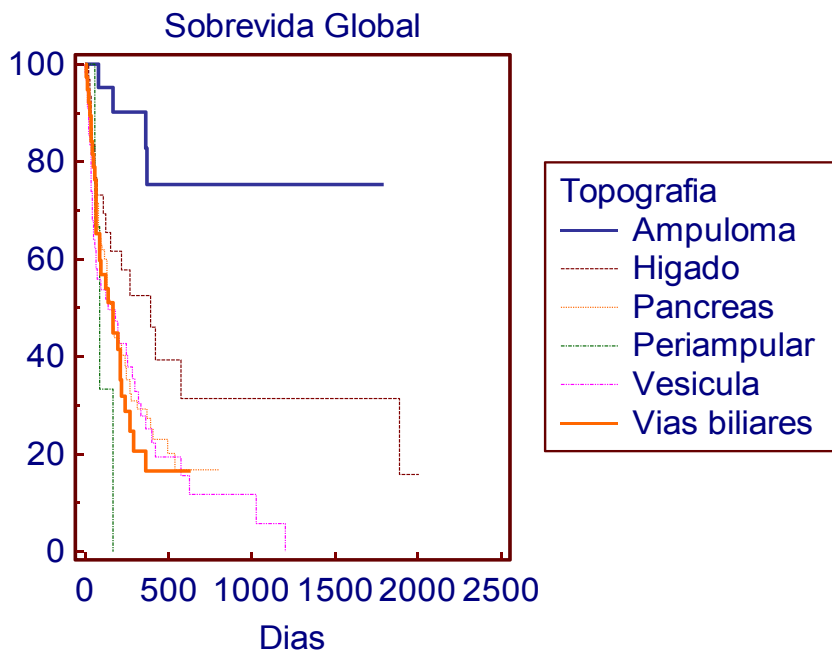


Figura 7

La calidad del registro multi-institucional fue analizada y se califica en relación al porcentaje de datos ausentes, según los estándares definidos por el INC: "muy bueno", "bueno" o "regular" (Tabla 3 y tabla 4).

Variables	Calidad del registro institucional de acuerdo al porcentaje de datos faltantes		
	Muy bueno	Bueno	Regular
Fundamentales	< 5%	5-10%	> 10%
Primarias	< 20%	20-30%	> 30%
Secundarias	< 30%	30-45%	> 45%

Tabla 3

Total de casos HBP multicéntrico		490		
Variable	Categoría	Desconocidos (n de casos)	Porcentaje de desconocidos	Calidad
<b>Datos del paciente</b>				
Nombre	Fundamental	0	0%	Muy bueno
Apellido	Fundamental	0	0%	Muy bueno
Sexo	Fundamental	0	0%	Muy bueno
<b>Antecedentes familiares oncológicos</b>				
Comorbilidades	Primaria	162	33%	Regular
<b>Nivel de instrucción</b>				
Cobertura de obra social	Secundaria	240	49%	Regular
<b>Datos del tumor</b>				
Fecha de inicio de síntomas	Fundamental	56	11%	Regular
Fecha de 1ª consulta	Fundamental	0	0%	Muy bueno
Fecha de diagnóstico	Fundamental	0	0%	Muy bueno
Edad al diagnóstico	Fundamental	0	0%	Muy bueno
<b>CIE-O 3</b>				
Morfología	Fundamental	187	38%	Regular
Diferenciación	Fundamental	92	19%	Regular
<b>Diagnóstico</b>				
Estadío del cáncer actual –cTNM y/o pTNM	Fundamental	45	9%	Bueno

Tabla 4

Comentarios sobre la tabla 4:

- Antecedentes familiares oncológicos: en el caso de hepatocarcinoma se ha decidido excluir esta variable por no considerarse factor de riesgo comprobado para el desarrollo de esta enfermedad. No obstante, el Htal. Zenón Santillán no ha reportado este dato en ninguno de sus pacientes con tumores HBP.

- Nivel de Instrucción: se excluyó del análisis al FORA debido a que dicho centro no registra esta variable sino que registra la ocupación de sus pacientes, y el Htal. Universitario Favalaro utiliza una HC electrónica que no incluye a esta variable.

- Fecha de primera consulta: en caso de no contar con "Fecha de primera consulta oncológica", se toma la "Fecha de primera consulta al centro" en cuestión.

- Morfología: abarca los casos con diagnóstico histológico (citología/biopsia/pieza quirúrgica). Morfología desconocida: pacientes sin obtención de histología (mal estado general del paciente, decisión médica o rechazo del paciente a maniobras invasivas).

Por otro lado, hay que aclarar que hoy en día existen criterios de diagnóstico no invasivo de hepatocarcinoma, por lo que no es mandatorio el diagnóstico histológico para decidir tratamiento. Están basados en la detección de un patrón vascular característico por TAC y/o RMN, definido por un realce homogéneo de contraste en fase arterial, superior a la del parénquima hepático adyacente, referido como "wash-in", seguido de lavado de contraste en fase venosa portal o retardada, que se traduce por una menor densidad o intensidad de señal con respecto al hígado de vecindad, referido como "wash-out" [4].

-Diferenciación: se decidió incluir como desconocido solo a pacientes con obtención de histología pero sin grado de diferenciación. Es un dato que debería considerarse siempre, a menos que haya muy poco volumen de material para evaluar, independiente del método de obtención. Se debe tener en cuenta

que hay tumores que por definición no se gradúan, por ejemplo el carcinoma de células en anillo de sello, el adenocarcinoma mucinoso, el carcinoma medular, etc.

## DISCUSIÓN

Los registros de cáncer son parte esencial de cualquier programa racional de control de cáncer, más aún en estas enfermedades huérfanas con gran variabilidad regional.

El número de defunciones por cáncer ha aumentado aproximadamente un 9% en la última década, lo cual podría deberse al aumento poblacional y de la expectativa de vida observado en la estructura de la población de todas las jurisdicciones del país. Según estimaciones publicadas por el Centro Latinoamericano y Caribeño de Demografía de la Comisión Económica para América Latina, en Argentina para el año 2050 el porcentaje de población de mayor e igual a 60 años habrá ascendido al 25%, sin embargo, el comportamiento de la mortalidad fue exactamente inverso para todos los tumores en general, pero los Tumores hepato-bilio-pancreáticos no han variado mucho a lo largo de estos años. Evidentemente, esta observación no podría surgir si no existiesen los registros de cáncer.

En este proyecto, el registro institucional del Htal. Udaondo pudo lograr el mayor porcentaje (60%) de los pacientes registrados probablemente por ser un centro de referencia y el único del país de tipo monovalente en el tema gastrointestinal. Cuenta con 2 comités de tumores- Comité Biliopancreático y Comité de Hígado, y la colaboración de los actores que integran los diversos servicios relacionados. Cabe resaltar que la buena relación entre los miembros de la institución con el servicio de oncología y la becaria, ha fomentado la cooperación y el asesoramiento para la obtención de los datos. En el seguimiento de los casos perdidos registrados en este centro, se cuenta también con la ayuda de dos bases de datos activas del Servicio de Cuidados Paliativos que son actualizadas periódicamente. Mientras que para el Htal. San Juan Bautista de la provincia de Catamarca, el Dr. Cáceres refiere que allí "es muy complejo el seguimiento, las decisiones, el tratamiento, y mucho más fácil en el sanatorio."

Por otro lado, con el advenimiento de los avances tecnológicos en todos los campos y la necesidad del manejo de la información, han llevado al desarrollo de la Historia Clínica Electrónica como un método de seguimiento clínico y administrativo. Entre los centros integrantes hay quienes cuentan con ella, por ejemplo: Htal. Universitario Fundación Favaloro.

Si bien esta herramienta permite el acceso más rápido y sencillo a la información clínica relevante de los pacientes, es sensible a las caídas del sistema, y por sobretodo, el grado de completitud de los datos recae en cada médico que evoluciona la historia clínica [5].

Sabemos que la adopción de una nueva conducta presenta su curva de aprendizaje, y se necesita tiempo para superar las resistencias al cambio y ponerla a punto. Hemos comprobado que la calidad de los registros es directamente proporcional a la eficiencia de trabajo, la cantidad de recursos humanos avocados, la capacidad técnica y el apoyo institucional para lograr una cobertura sistemática y exhaustiva. Reconocemos que el seguimiento activo de un registro es un método muy costoso, por ende, no se ha podido implementar en todos los centros.

Tras el segundo año del registro de pacientes con tumores HBP mediante el RITA, seguimos reportando algunas dificultades persistentes en la plataforma y seguimos haciendo sugerencias para su mejora. Se detallan a continuación las principales observaciones realizadas al RITA:

- A) Cuando se exporta el registro en Excel, por cada tratamiento ingresado, el sistema genera automáticamente un registro nuevo con repetición de datos sociodemográfico, por lo que imposibilita el uso de filtros para el análisis estadístico.
- B) En "Comorbilidades" hay opciones muy necesarias de agregar. Se ha propuesto agregar las opciones "ninguna" y "otras". En la opción "otras" puede diseñarse la aparición de un cuadro descriptivo si el paciente no presenta ninguna de las comorbilidades mencionadas en la lista pero posee factor de riesgo importante a consignar para la patología en cuestión. La opción "ninguna" permitiría aclarar que el paciente ha sido realmente interrogado pero no presentaba ninguna de las comorbilidades enlistadas.



- C) En la variable TUMOR de la Estadificación TNM de la plataforma RITA, hay faltantes a partir del T2. Los subgrupos dentro de un mismo estadio no pueden ser clasificados, por ejemplo: dentro del T2 no figura subdivisiones T2A, T2B.

## CONCLUSIÓN

Como conclusión, la implementación del RITA permitió conocer el estado de situación en HBP y detectar las dificultades intra e interinstitucionales existentes, además de realizar sugerencias relacionadas para perfeccionar la plataforma virtual RITA diseñada por el INC.

Al ser el RITA un sistema centralizado, en el que se incluyen instituciones de referencia en servicios a pacientes oncológicos públicas o privadas de todas las jurisdicciones, estos datos aportan a la visión macro de la atención en todo el país, lo cual permitirá planificar políticas de salud en oncología y tomar decisiones basadas en las realidades regionales.

La creación de una Red Nacional de Registros Monográficos Hospitalarios de cáncer HBP en la Argentina a través de la implementación del RITA en todas las jurisdicciones del país, permitirá organizar la atención oncológica teniendo en cuenta la accesibilidad geográfica, el grado de complejidad de su patología, y los resultados institucionales.

Se espera que el establecimiento consensuado de los estándares mínimos y las acciones necesarias permita disminuir las desigualdades existentes, para el acceso a los servicios preventivos y clínicos.

Mediante el uso de la información epidemiológica los gobiernos podrán formular políticas y programas, y medir los avances, el impacto y la eficacia de los esfuerzos en el funcionamiento del sistema de salud. Para ello, es de fundamental importancia considerar a los registradores como parte del equipo de los servicios de oncología.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boletín de vigilancia epidemiológica del INC. Año 1. N° 1. Octubre 2013
2. SIVER/INC en base a datos de la DEIS. Argentina, 2013.
3. Manual de procedimientos RITA. p. 30.
4. Guía de la Sociedad de Oncología Europea. Hepatocellular carcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. ESMO Guidelines Working Group. Ann Oncol. 2012 Oct;23 Suppl 7:vii41-8.
5. Curso de Introducción a la Informática Biomédica del Campus Virtual del Hospital Italiano de Buenos Aires.

# PARÁMETROS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS Y LACTOQUÍMICOS DE MADRES QUE AMAMANTAN DE CÓRDOBA, ARGENTINA: IMPLICANCIAS ONCOLÓGICAS.

**Mariela Valentina Cortez**

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)

**Director:** Elio Andrés Soria

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue establecer diferentes parámetros que se asociaran a riesgo oncológico. Así, se evaluó el antecedente familiar de cáncer (AFC) como determinante de cambios lactoquímicos, en función de aspectos socio-sanitarios, alimentario-nutricionales y antropométricos, en madres lactantes de Córdoba (Argentina), dentro de los primeros seis meses posparto. Se halló que las participantes con el AFC (en parientes de primer y segundo grado) presentaban menores niveles de triglicéridos y mayores de anión superóxido en la leche materna. Además, se encontró que estos marcadores estaban asociados al estado de salud materno y eran susceptibles de modificarse por la dieta, lo que permitiría elaborar recomendaciones sanitarias pertinentes.

## ABSTRACT

The objective of this work was to establish different parameters associated with cancer risk. Thus, family history of cancer (FHC) was assessed as a determinant of lactochemical changes depending on socio-sanitary, nutritional and anthropometric aspects in nursing mothers of Cordoba (Argentina) within the first six months postpartum. It was found that participants with FHC (in first and second degree relatives) had lower triglyceride levels and higher superoxide ones in human milk. In addition, these markers were associated with maternal health status and were likely to be modified by diet, which would allow relevant sanitary recommendations.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en Argentina, Cuba y Uruguay durante la última década [1], entre sus principales condicionantes, se considera a la dieta como factor de riesgo y modulador de los aspectos genéticos y metabólicos implicados en la enfermedad [2]. Con respecto al estado nutricional, la obesidad parece ser un factor de riesgo crítico, predisponiendo al desarrollo prematuro de tumores mamarios [3]. Por su parte, la herencia y factores relacionados con la vida reproductiva de la mujer figuran entre los principales determinantes de diferentes tipos neoplásicos [4, 5]

Por otro lado, diversas publicaciones sustentan que los periodos prolongados de amamantamiento así como el tiempo acumulado disminuyen el riesgo de padecerlo, tanto en mujeres pre como posmenopáusicas. Esto estaría asociado con menor riesgo debido a que los procesos biológicos y bioquímicos implicados en la lactancia tendrían un rol protector sobre el parénquima mamario [6]. En consecuencia, la identificación de parámetros en la leche humana podría ser de gran utilidad al usarlos como marcadores de integridad tisular y de riesgo tumoral, incluyendo contenido de nutrientes, fitoquímicos dietarios, enzimas antioxidantes y radicales libres, dada la participación del estrés oxidativo en la etiopatogenia de la enfermedad [7]. Por lo tanto, la identificación de diferentes parámetros socio-sanitarios, alimentario-nutricionales, antropométricos y lactoquímicos, así como sus asociaciones, permitiría el diagnóstico temprano de riesgo de mujeres candidatas para futuros seguimientos, siendo el periodo de lactancia una oportunidad ideal para controlar a las mamás que se acercan regularmente a los centros de salud por cuestiones propias o relacionadas al infante.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Muestra: se consideró población accesible a las madres captadas en diferentes centros de atención primaria de salud y a través de una convocatoria en línea, vía red social (<https://www.facebook.com/pages/Apoyemos-juntos-la-lactancia-materna/568376593183782>) quienes fueron visitadas en sus domicilios [8]. Como criterios de inclusión de cada unidad de análisis se consideraron los siguientes: voluntarias sanas, mayores de edad, con antecedentes de serología negativa para enfermedades transmisibles y de controles obstétricos normales. Por otro lado, como criterios de exclusión estuvieron: tratamiento farmacológico y/o nutracéutico prolongado, consumo de drogas ilícitas y embarazo en curso. Todo fue realizado con la autorización del Comité de Ética correspondiente (Universidad Nacional de Córdoba), contando con el consentimiento informado de las participantes.

Diseño metodológico: De cada mujer participante se obtuvo una muestra de su leche extraída por ella misma de forma manual o con sacaleche tras asepsia cutánea, siendo receptados 10 mL en frasco estéril de plástico, registrándose el horario de extracción, dicha muestra fue transportada conservando la cadena de frío (4°C). En el mismo encuentro con la participante se realizó una encuesta estructurada y se le realizó las mediciones correspondientes, siendo así un estudio observacional y transversal. Todo el material recabado fue trasladado al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), sito en Ciudad Universitaria (Córdoba, Argentina), para su procesamiento y análisis.

En la mencionada encuesta se registraron variables biosociosanitarias: edad de las voluntarias (años), lugar de residencia (consignando ciudad y barrio), nivel de estudio alcanzado (primario completo/incompleto, secundario completo/incompleto, superior completo/incompleto), estado civil (soltera, casada, viuda, divorciada, concubina), nacionalidad, nivel de ingresos mensuales en pesos del grupo familiar (en pesos per cápita), antecedentes ginecoobstétricos como el tiempo transcurrido desde el parto (calostro <4 días-, leche en transición -5-15 días- y leche madura ->15 días-) y el tipo de éste (cesárea o parto natural), el volumen autopercibido de leche (poca, suficiente, abundante) lactancia materna exclusiva (sí/no, ¿qué otro alimento le ofrece al bebé?), frecuencia de amamantado (horas), lactancia previa (sí/no, tiempo acumulado en meses). N° de embarazos a término, n° de embarazos interrumpidos, n° de hijos, edad como primípara (años), edad de la menarca (años). También se registró la actividad física actual y anterior al embarazo (leve, moderada, intensa, consignando frecuencia semanal, tiempo total por semana, tipo de actividad -aeróbica, no aeróbica o mixta-), especificando caminatas y tiempo sentada lactancia. Para la antropometría, se utilizó el índice de masa corporal (IMC), calculado como el cociente del peso por el cuadrado de la altura (categorías: <18,5, 18,5-24,9, 25-30, 31-40 y >40) y el porcentaje de grasa corporal (nivel saludable <30%), mediante bioimpedancia. Además, se registró el peso actual, el peso pregestacional y la ganancia de peso durante la gestación referidos por la participante. Se consignó si la participante poseía familiares de primer y segundo grado con enfermedades crónicas destacando entre ellas la presencia de cáncer.

Además, se construyeron estratos sociales según la situación ocupacional y educacional quedando definidos como: alto, medio-alto, medio, bajo y carenciado.[9]

En cuanto a las variables alimentario-nutricionales, se realizó la frecuencia de consumo habitual utilizando el material provisto por el programa informático especializado Interfood v.1.3 [10], posteriormente, la información fue procesada utilizando dicho programa pudiendo estimar el consumo diario de nutrientes en función de la frecuencia de consumo en un tiempo dado por el tamaño de la porción en gramos, a partir del contenido químico de cada alimento, multiplicado por la cantidad de alimento consumido y dividido entre el tamaño de la porción y la frecuencia de consumo de ese alimento), se calculó la cantidad de proteínas, lípidos, hidratos de carbono (g/día), fitoquímicos, vitaminas y otros micronutrientes (mg/día o UI/día, según el caso) consumidos por la entrevistada.

Además, se registró si la madre seguía una alimentación especial por razones de salud, religiosas u otro motivo, si realizó cambios alimentarios asociados al embarazo y/o lactancia y el número de comidas diarias (desayuno, media mañana, almuerzo, merienda, colaciones, cena, otras).

Las muestras de leche fueron analizadas por espectrofotometría en un equipo GloMax Multi Detection System (Promega)

- Macronutrientes orgánicos: Dada la importancia biológica de los mismos, se ensayaron proteínas totales (g/L), glucosa (g/L) y triglicéridos (mg/L) con kits de GT Lab.

- Polifenoles totales ( $\mu\text{g/L}$ ): Dados el efecto antioxidante y quimiopreventivo de estos fitonutrientes, su estudio tiene gran valor en oncología. Se midieron utilizando una adaptación de la técnica de Folin para muestras animales [11].
- Marcador enzimático: Se midió la actividad específica de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (UI/mg), esta enzima tiene gran valor como marcador, ya que indica integridad funcional proteica, respuesta antioxidante frente a estrés oxidativo tisular (recuperando glutatión intracelular) y metabolismo de xenobióticos, estando asociada a cambios fenotípicos de naturaleza tumoral [12].
- Estrés oxidativo: Se cuantificó la densidad óptica por litro (DO/L) de los siguientes parámetros de acuerdo a lo ya ensayado [13]: anión superóxido (por reacción con NBT), nitritos (por reacción de Griess), hidroperóxidos y lipoperóxidos (por reacción XO). El valor de estas determinaciones radica en la participación central que tiene la constante formación de radicales libres en el desarrollo de neoplasias en diferentes sitios del organismo[14].

Se midió la concentración de ácidos grasos mediante cromatografía de gases[15].

Análisis estadístico: Los valores se mostraron con medidas de resumen de posición y dispersión según la presencia o ausencia de antecedentes familiares de cáncer (AFC), comparando medias por el test paramétrico de Student. Se usaron modelos multivariados con el programa estadístico Infostat v.2012, para evaluar los cambios en la composición de la leche en función de AFC. Así, la regresión por mínimos cuadrados parciales, técnica que generaliza y combina el análisis de componentes principales y el análisis de regresión lineal, se usó para predecir el conjunto de variables dependientes (marcadores lácteos) desde un conjunto relativamente grande de variables predictoras posiblemente correlacionadas, particularmente cuando el número de observaciones es pequeño en relación al número de regresoras (ingesta). Los resultados del mismo se presentaron a través de un tri-plot (gráfico con covariables para explicar la asociación entre los "punto del espacio fila" y los "puntos del espacio columna" de un biplot).

## RESULTADOS PRELIMINARES

Características biosociosanitarias:

- Edad: La edad promedio de las participantes fue  $28,08 \pm 5,94$  años, con edad de menarca  $12,78 \pm 0,15$  años.
- Nacionalidad: Se incluyó un 95,60% de argentinas, 01,23% de bolivianas y 03,70% de peruanas, siendo sus padres de las mismas nacionalidades. Se identificó el acervo étnico registrando la nacionalidad de los abuelos, hallándose que el 73,75% era de origen argentino, seguido por 13,75% europeos (España, Italia y Yugoslavia), 06,25% asiáticos (Siria y Armenia) y 06,25% latinoamericanos no argentinos (Perú, Bolivia, Paraguay y Chile). En este sentido, las características fenotípicas fueron: piel trigueña-pelo oscuro-ojos oscuros (48,75%), piel blanca-pelo oscuro-ojos oscuros/claros (48,75%) y piel blanca-pelo claro-ojos claros (02,50%).
- Estado civil: Se expresó en porcentajes siendo los mismos: 15% de solteras, el 28% correspondió a las casadas, el 56% a las concubinas y el 1% restante representó a las divorciadas.
- Práctica de la lactancia: Precedida por una gestación de  $38,31 \pm 0,19$  semanas (57% por parto natural), el 70% de las encuestadas manifestó realizar lactancia materna exclusiva mientras que el 30% complementó la lactancia con otro alimento, encontrándose una ligera asociación entre lactancia exclusiva y haber tenido un parto natural ( $p=0,09$ ). Se encontró que la producción láctea autopercebida era 43% suficiente, 33% abundante y 24% poca, lo que estuvo en función del volumen eyectado durante el muestreo ( $p<0,05$ ):  $08,82 \pm 01,38$ ,  $12,43 \pm 01,61$  y  $05,86 \pm 02,27$  mL, respectivamente. Además, se estableció que el tiempo total de amamantamiento (incluidos hijos previos) fue  $9,06 \pm 1,6$  meses.
- Antropometría: Las participantes refirieron un consumo de agua de bebida de  $1,93 \pm 0,10$  L/día (IC95:1,72-2,14) y en su mayoría presentaban un IMC normal (Tabla 1). Realizaban 4-5 comidas diarias.

Media $\pm$ EE	VARIABLES
$24,14 \pm 00,45$	IMC actual ( $\text{Kg/m}^2$ )
$01,62 \pm 00,73$	Talla actual (m)
$62,97 \pm 01,23$	Peso actual (Kg)

27,29 ± 00,65	Grasa corporal actual (%)
60,24 ± 01,14	Peso pregestacional
13,61 ± 00,75	Ganancia gravídica de peso (Kg)

- Estrato social: La mayor parte de las participantes eran amas de casa (57%), seguidas por las profesionales de la salud (13%), administrativas (11%), docentes (8%), profesionales (5%) estudiantes (4%) y otras (2%). Como dato adicional, el 58.75% contaba con acceso tecnológico hogareño. Respecto a dicho estrato, las participantes se agruparon de la siguiente manera: 28% alto, 9% medio-alto, 17% medio, 44% bajo y 3% carenciado.

Perfil químico-nutricional lácteo:

-Composición: En la Tabla 2 se muestran los resultados analíticos obtenidos.

-Correlaciones químicas: Por efecto directo, el nivel de lipoperóxidos mostró los siguientes coeficientes de correlación: -0,34 con el nivel de compuestos fenólicos y 0,36 con el de glucosa ( $p < 0,002$ ). Para los hidroperóxidos, dicho coeficiente fue de -0,29 en correlación con contenido fenólico ( $p < 0,01$ ) y 0,43 con el de glucosa láctea ( $p = 0,0001$ ). Se ajustó por edad dado su correlación de 0,29 con estos marcadores ( $p < 0,01$ ). No se encontraron otras interacciones significativas entre los constituyentes medidos en la leche, incluyendo el anión superóxido.

-Correlaciones sanitarias: Se observó una tendencia a la reducción del contenido proteico a medida que pasaba el tiempo desde el parto ( $p < 0,08$ ). La única variable química afectada significativamente por un antecedente reproductivo fue el contenido fenólico, el cual presentó una asociación positiva por vía directa con el tiempo acumulado de amamantamiento ( $p < 0,0001$ ). Por su parte, los triglicéridos se correlacionaron negativamente con el peso pregestacional (-0,31;  $p < 0,05$ ) y con el IMC (-0,23;  $p < 0,08$ ). El nivel de glucosa fue estable. El principal determinante fue el porcentaje de grasa corporal para la hidroperoxidación (0,27;  $p < 0,05$ ) y el nivel de anión superóxido (-0,22;  $p < 0,07$ ). Las diferencias halladas entre las asociaciones de la grasa corporal con otras variables y las existentes para el IMC dependerían a éste incluía además masa magra y agua. Esto se apoyó en el aumento de nitritos en leche respecto al IMC. No se encontraron otras asociaciones significativas en función de las variables biosociosanitarias estudiadas.

Tabla 2. Lactoquímica	
Media ± EE	Variables
1,38 ± 0,31	Proteínas (g/L)
16,67 ± 0,76	Triglicéridos (g/L)
4,51 ± 0,26	Glucosa (g/L)
57,02 ± 9,26	Compuestos fenólicos (mg/L)
3651,58 ± 204,57	Anión superóxido (DO/L)
61,81 ± 19,28	Nitritos (mg/L)
7428,77 ± 309,50	Hidroperóxidos (DO/L)
7672,57 ± 397,12	Lipoperóxidos (DO/L)
4,63 ± 0,56	$\gamma$ -glutamiltanspeptidasa (UI/L)

El antecedente familiar de distintos tipos de cáncer (AFC) alcanzó el 12,75%, por lo que fueron unificados en una categoría única para los análisis. Se tomaron como criterios de unificación:

- La muestra era homogénea étnicamente (raza caucásica con ascendientes principalmente europeos) y geográficamente (ubicación centrada en el Gran Córdoba). En consecuencia, se atenuó la variabilidad dependiente del acervo genético y la agregación espacial de datos, origen de riesgos diferenciales.
- La muestra presentó las siguientes características comunes: mujeres abstemias, no fumadoras, sin otro hábito tóxico ni antecedente específico de exposición ambiental a contaminantes, conocidos factores de riesgo neoplásico.
- Las variables bioquímicas de la leche que se analizaron eran indicadores de estrés oxidativo y metabólico, procesos implicados ubicuamente en la carcinogénesis independientemente del tipo tumoral.

- Se descartó sesgo de selección debido al canal de muestreo (en línea), confirmando la independencia entre los indicadores de acceso tecnológico y el resto de las variables.

Se encontró que los siguientes analitos lácteos no se asociaron con el AFC ni fueron covariables de ajuste: el perfil porcentual de ácidos grasos, la actividad de gama-glutamiltanspeptidasa y el contenido de nitritos. Por otro lado, se halló que las participantes con AFC (dentro de parentescos de primer y segundo grado) presentaban menores niveles de triglicéridos y mayores del anión superóxido en la leche materna (Tabla 3). Tomando estos dos marcadores, se analizó por regresión de mínimos cuadrados parciales el efecto de la ingesta nutricional, ajustando por la presencia/ausencia de AFC (Figura 1). Así, se encontró que el consumo energético y de macronutrientes se asociaba positivamente al nivel lácteo de superóxido, mientras que el de flavonas lo hacía negativamente de manera marcada. Esto se confirmó por regresión logística multivariada (por grupo de nutrientes), considerando como éxito a valores de superóxido superiores a la media (OR<1, p<0,05). Opuestamente, mostró mayor riesgo de incremento de superóxido con el consumo de flavanoles y flavanonas (OR>1, p<0,05). Por su parte, el consumo de agua (OR>1, p<0,05) y el de ácidos grasos poliinsaturados (OR<1, p<0,05), principalmente de la familia  $\omega$ 6, fueron los que se asociaron con mayor fuerza con cambios en el nivel lácteo de triglicéridos (Figura 1). Otro hallazgo fue que estos lípidos aumentaban en las madres que realizaban lactancia exclusiva (OR>1, p<0,05).

		Media	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Diferencia (p<0,05)
ANTECEDENTE AUSENTE	PROTEINAS (g/L)	1,46	0,34	0,78	2,14	
	TRIGLICERIDOS (g/L)	14,44	0,63	13,18	15,7	
	GLUCOSA (g/L)	4,36	0,25	3,86	4,87	
	FENOLICOS (mg/L)	52,31	9,19	34,04	70,57	
	SUPEROXIDO (DO/L)	3540,9	214,05	3115,52	3966,28	
	HIDROPEROXIDOS (DO/L)	7260,09	308,5	6647,01	7873,17	
	LIPOPEROXIDOS (DO/L)	7614,04	425,4	6768,65	8459,44	
ANTECEDENTE PRESENTE	PROTEINAS (g/L)	1,52	0,82	-0,29	3,34	
	TRIGLICERIDOS (g/L)	10,68	1,29	7,82	13,55	*
	GLUCOSA (g/L)	5,25	1,06	2,93	7,56	
	FENOLICOS (mg/L)	83,83	33,87	10,04	157,62	
	SUPEROXIDO (DO/L)	4682,69	628,08	3314,23	6051,15	*
	HIDROPEROXIDOS (DO/L)	8183,69	1238,22	5485,84	10881,54	
	LIPOPEROXIDOS (DO/L)	7630	1155,8	5111,73	10148,27	

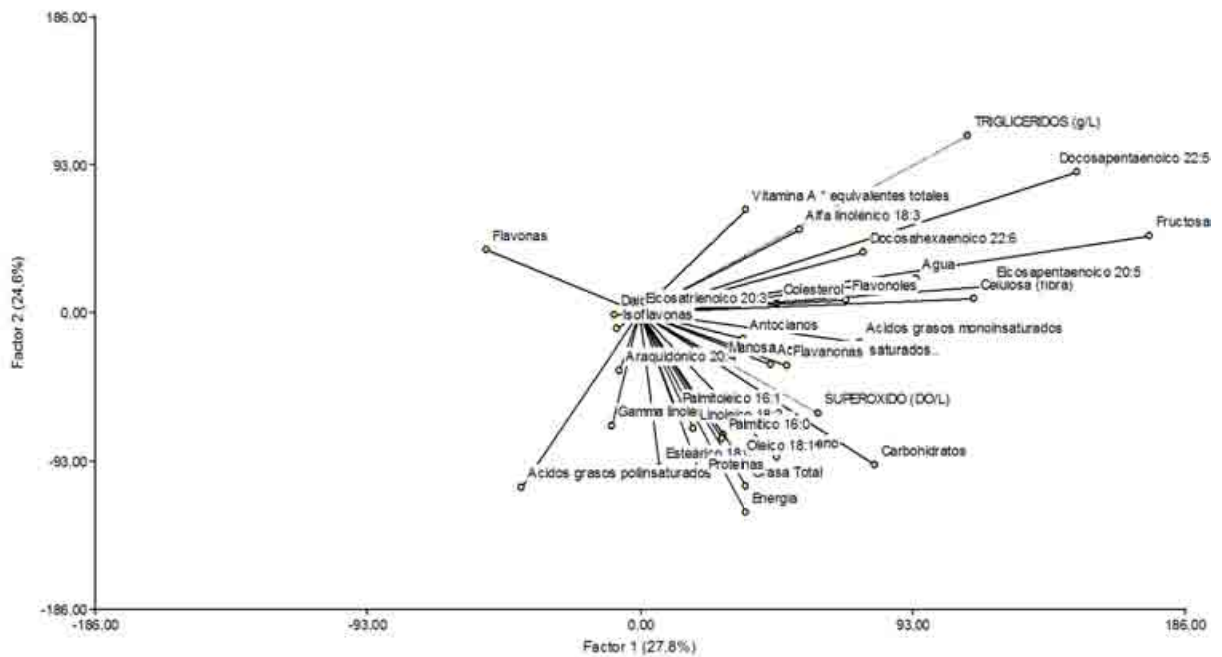


Figura 1. Gráfico triplot donde se presentan las variables dependientes TRIGLICERIDOS y SUPEROXIDO medidas en la leche materna, usando como regresoras los nutrientes ingeridos por madres lactantes del Gran Córdoba (Argentina) y como variable categórica de ajuste al antecedente familiar de cáncer en parientes de primer a segundo grado.

El menor tiempo de gestación, pretérmino, se asoció levemente con mayores riesgos crudos de mayores niveles de superóxido ( $OR < 1$ ,  $p < 0,1$ ) y menores de triglicéridos ( $OR > 1$ ,  $p < 0,1$ ). No tuvieron efecto ( $OR \approx 1$ ,  $p > 0,1$ ): actividad física actual y previa, suplementación multivitamínica, edad materna, otros antecedentes obstétricos e índice socioeconómico.

Por último, resultados preliminares indicaron que el uso de sucralosa incrementaba el contenido de superóxido, mientras que el de aspartamo lo reducía y la combinación de sacarina con ciclamato resultaba similar a lo observado con azúcar común. Esto no se relacionó con diferencias en el consumo energético y de carbohidratos de las madres. Ninguno afectó los triglicéridos. Es necesario incrementar el número de participantes para confirmar estos hallazgos.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este estudio permitió conocer la asociación entre los antecedentes familiares de cáncer (AFC), el consumo dietario y la presencia de marcadores lácteos en mujeres lactantes sanas, que cumplían los criterios de inclusión. Se destacó la predominancia de lactancia exclusiva favorecida por el antecedente de parto natural [16].

La composición demográfica de la muestra fue representativa de las características de la población de origen de acuerdo a cifras nacionales, mientras que la antropometría desde la etapa pregestacional hasta el momento postnatal de estudio respondía a lo esperado para el grupo de estudio [17, 18].

La muestra resultó homogénea con respecto a la práctica de hábitos tóxicos ya que se informó que las mujeres participantes eran abstemias en contraposición a estudios que informaron que el 43% de mujeres lactantes australianas consumían alguna bebida alcohólica durante este periodo [19], no fumadoras ya que el consumo de tabaco se considera un condicionante negativo de la práctica de lactancia [20], sin otro hábito tóxico ni antecedente específico de exposición ambiental a contaminantes, conocidos factores de riesgo neoplásico.

La situación educacional y ocupacional permitió construir las categorías de estrato social del estudio utilizando los criterios instrumentales vigentes.[21]



En cuanto a los biomarcadores lácteos analizados, la reducción proteica en función del tiempo transcurrido desde el parto respondió a los cambios graduales propios de la maduración de leche a partir del calostro inicial con mayor contenido de proteínas.[22]

El aumento del contenido fenólico asociado al tiempo acumulado de amamantamiento resulta difícil de explicar mecanísticamente por la escasez de estudios al respecto. No obstante, puede decirse que esto sería uno de los factores protectores implicados en la prevención de patologías graves, como el cáncer, en mujeres con antecedente de lactancia por períodos de tiempo superiores a seis meses.[23]

La ingesta enriquecida en compuestos fenólicos favorece su biodisponibilidad, transportándose unidos a albúmina.[24] Luego, alcanzan el parénquima mamario que los capta, donde cumplen con sus funciones quimiopreventivas. El estudio de estos fitonutrientes en la leche humana es escaso y en general provienen de otros grupos étnicos. De hecho, en este estudio se hallaron niveles diez veces superiores a los de la población estadounidense, lo que obliga a promover las investigaciones regionales.[25] Al respecto, existe evidencia de que dichas funciones dependen de la capacidad antioxidante de los mismos por su afinidad con componentes lácteos,[26] tal como se confirmó en este trabajo a través de la correlación de negativa entre éstos y los niveles de lipoperóxidos e hidroperóxidos en la leche. Por otro lado, la glucosa se comportó como factor prooxidante. Esto puede explicarse por el fenómeno de sinergia o acoplamiento metabólico entre el catabolismo de la glucosa y la inducción de estrés oxidativo en las células, evento multietapa que involucra una disfunción mitocondrial con generación de radicales libre y transformación neoplásica.[27] De hecho, el estrés metabólico descrito se asocia con el índice de masa corporal y el envejecimiento.[28] explicando así el aumento de la hidroperoxidación láctea asociado a la edad y al porcentaje de grasa corporal encontrando en este trabajo.

El contenido lipídico lácteo fue menor al reportado por la literatura científica, mientras que los otros macronutrientes no mostraron dichas discrepancias.[29]

Las muestras de leche materna que provenían de madres con AFC presentaron menores niveles de triglicéridos (TG) y mayores de anión superóxido (SO), dicho compuesto es una especie reactiva de oxígeno que se encuentra dentro de la clase más importante de los radicales libres generados en el organismo,[30] cuando el aumento en su producción sobrepasa las defensas antioxidantes, se ocasiona un desbalance llamado estrés oxidativo, que provoca daños en los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Esto puede desencadenar diferentes enfermedades crónicas entre ellas el cáncer [31], razón por la cual se consideró al nivel del anión SO como marcador del estado oxidativo de la leche materna. Existen diversos métodos para valorar el estrés oxidativo en sistemas biológicos[32]. Diversos autores han evaluado previamente la capacidad antioxidante o el estado oxidativo de la leche humana, sin embargo sus resultados no son concluyentes, por considerar diversas condiciones de almacenamiento o evaluar parámetros diferentes.[33, 34]. Con respecto al consumo dietario, los flavonoides totales mostraron tener efecto en la concentración de anión SO en la leche materna, al ajustar por dichas variables y estudiar cada clase individualmente. Así, se identificaron efectos antagónicos entre algunas familias. En este estudio, se demostró asociación positiva entre dicho marcador oxidativo y la ingesta de flavanoles y flavanonas. En oposición, se demostró que el consumo materno de flavonas provocaba una marcada tendencia reductora del SO en su leche. Las diferencias halladas en cuanto al efecto de la ingesta de flavanoles y flavanonas respecto al de flavonas estarían dadas porque esta última familia fitoquímica conserva el doble enlace en posición 2-3 del anillo B en su estructura, lo cual es un determinante crítico para la capacidad antioxidante de estas moléculas.[35]

Se destaca que aspectos asociables a estrés metabólico, tales como mayor ingesta calórica y mayor grasa corporal, se asociaron a menor nivel de triglicéridos en la leche, ya que el sobrepeso interfiere con la lipogénesis láctea reduciendo el tráfico de lípidos dietarios y sintetizados de *novo* hacia las células epiteliales mamarias, lo que lleva a su depósito en el estroma [36], y mayor nivel del anión superóxido.

En este sentido, la transcriptómica ha permitido establecer que el ambiente y las intervenciones dietarias regulan la actividad génica, aspecto heredable, modificando vías moleculares implicadas tanto en el metabolismo lipídico y como en la respuesta antioxidante asociables a oncogénesis. Así, la herencia diferencial del grupo con AFC sería pasible de ser modulada [37]. Más aún, el perfil de las células tumorales incluye desregulación metabólica acoplada a desbalance del estado oxidativo, todo lo cual está en concordancia con lo hallado en el presente estudio.[38]

En conclusión, las recomendaciones dietéticas, así como apoyar la práctica de la lactancia materna exclusiva, estarán destinadas a modificar favorablemente los marcadores lácteos asociados al antecedente familiar de cáncer. En este sentido, sería apropiado promover una adecuada hidratación y la inclusión de alimentos ricos en flavonas, ácidos grasos  $\omega_3$  y fructosa, con menor proporción de otros ácidos grasos saturados y carbohidratos, reducción calórica y de ciertos flavonoides (flavanonas y flavanoles).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Loria D, Lence Anta J, Guerra J, Yí ME, Galán Álvarez Y, Barrios Herrera E, et al. Tendencia de la mortalidad por cáncer en Argentina, Cuba y Uruguay en un período de 15 años. *Rev Cubana Salud Pública* 2010;36(2): 115-125.
2. Pou SA, Niclis C, Aballay LR, Tumas N, Román MD, Muñoz SE, et al. Cancer and its association with dietary patterns in Córdoba (Argentina). *Nutr Hosp*. 2014;29(3):618-28.
3. Aguilar Cordero J, González Jiménez E, García López A, Álvarez Ferré J, Padilla López C, Guisado Barrilao R, et al. Obesidad y su implicación en el cáncer de mama. *Nutr Hosp*. 2011;26:899-903.
4. Momekova D, Momekov G, Pencheva I, Konstantinov S. Antineoplastic activity of a methanolic extract from *Kigelia pinnata* DC stem bark. *J Cancer Res Ther*. 2012;3:110-113
5. Falkenberry SS, Legare RD. Risk factors for breast cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002;29:159-72.
6. Do Carmo França-Botelho A, Ferreira MC, França JL, França EL, Honório-França AC. Breastfeeding and its relationship with reduction of breast cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(11):5327-32.
7. Kanaya N, Adams L, Takasaki A, Chen S. Whole blueberry powder inhibits metastasis of triple negative breast cancer in a xenograft mouse model through modulation of inflammatory cytokines. *Nutr Cancer*. 2014;66(2):242-8.
8. Cortez MV, Soria EA. Análisis y conservación de nutrientes funcionales presentes en la leche de madres cordobesas (Argentina, 2013-2014). *Gaceta Sanitaria*. Enviado.
9. Mora y Araujo M. La estructura social de la Argentina: Evidencias y conjeturas acerca de la estratificación actual. Santiago, Chile: División de Desarrollo Social, CEPAL, ONU. 2002.
10. Defagó MD, Perovic NR, Aguinaldo CA, Actis AB. Desarrollo de un programa informático para estudios nutricionales. *Rev Panam Salud Publica*. 2009;25(4):362-6.
11. Cittadini MC, Canalis AM, Albrecht C, Soria EA. Effects of oral phytoextract intake on phenolic concentration and redox homeostasis in murine encephalic regions. *Nutritional Neuroscience* , 140925080725000.
12. Quiroga A, Quiroga PL, Martínez E, Soria EA, Valentich MA. Anti-breast cancer activity of curcumin on the human oxidation-resistant cells ZR-75-1 with gamma-glutamyltranspeptidase inhibition. *J Exp Ther Oncol*. 2010;8(3):261-6.
13. Soria EA, Eynard AR, Bongiovanni GA. Modulation of early stress-related biomarkers in cytoplasm by the antioxidants silymarin and quercetin using a cellular model of acute arsenic poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;107(6):982-7.
14. Defagó MD, Soria EA. Onconutrition: Redox chemoprevention by functional biomolecules and biomarker assessment. En: Rahman A, Zaman K (Eds.). *Topics in Anti-Cancer Research* (vol. 2). Sharjah, Emiratos Árabes Unidos: Bentham Science Publishers, 2013, pp. 522-552.
15. Gaete GM, Atalah SE, Araya AJ. Efecto de la suplementación de la dieta de la madre durante la lactancia con ácidos grasos omega 3 en la composición de los lípidos de la leche. *Rev. chil. pediatr.* 2002;73(3): 239-247.
16. Pino V José Luis, López E Miguel Ángel, Medel I Andrea Pilar, Ortega S Alejandra. Factores que inciden en la duración de la lactancia materna exclusiva en una comunidad rural de Chile. *Rev. chil. nutr.* 2013;40(1): 48-54.
17. Estadísticas nacionales disponibles en <http://www.indec.mecon.ar>.
18. Slager E, Fauser B, Van Geijn H, Brolmann H, Vervest H. *Gynaecology, Obstetrics, and Reproductive Medicine in Daily Practice*. Rotterdam, Países Bajos: Elsevier. 2005.
19. Maloney E, Hutchinson D, Burns L, Mattick R, Black E. Prevalence and predictors of alcohol use in pregnancy and breastfeeding among Australian women. *Birth: Issues in Perinatal Care*. 2011; 38(1):3-9.
20. Cuadrón A, Samper Villagrasa MP, Álvarez Sauras ML, Lasarte Velillas JJ, Rodríguez Martínez G. Prevalencia de la lactancia materna durante el primer año de vida en Aragón. *Estudio CALINA. Anal Pedia* 2013;79(5):312-318.
21. Índice del nivel socioeconómico 2002. Asociación Argentina de Marketing – Cámara de Control y Medición de Audiencias. 2003. Argentina.
22. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin N Am* 60 (2013) 49-74.
23. Aguilar Cordero MJ, González Jiménez E, Álvarez Ferre J, Padilla López CA, Mur Villar N, García López PA, Valenza Peña MC. Lactancia materna: un método eficaz en la prevención del cáncer de mama. *Nutr Hosp*. 2010;25:954-958.
24. Codoñer-Franch P, Hernández-Aguilar MT, Navarro-Ruiz A, López-Jaén AB, Borja-Herrero C, Valls-Bellés V. Diet supplementation during early lactation with non-alcoholic beer increases the antioxidant properties of breastmilk and decreases the oxidative damage in breastfeeding mothers. *Breastfeed Med*. 2013;8:164-9
25. Song BJ, Jouni ZE, Ferruzzi MG. Assessment of phytochemical content in human milk during different stages of lactation. *Nutrition*. 2013 Jan;29(1):195-202.
26. Haratifar S, Meckling KA, Corredig M. Bioefficacy of tea catechins encapsulated in casein micelles tested on a normal mouse cell line (4D/WT) and its cancerous counterpart (D/V-src) before and after in vitro digestion. *Food Funct*. 2014 5(6):1160-6

27. Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol.* 2014;41(2):195-216.
28. Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Osonoi S, Kamata K, Tsuboi K, et al. Age-associated changes of islet endocrine cells and the effects of body mass index in Japanese. *J Diabetes Investig.* 2014 Feb 12;5(1):38-47.
29. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin N Am* 60 (2013) 49-74.
30. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990;8:95-108.
31. Rojano Benjamín A, Zapata Acosta K, Cortes Correa FB. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). *Rev Cubana Plant Med* 2012 ; 17(4): 408-419.
32. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006;36(4):327-358.
33. Miranda M, Gormaz M, Romero FJ, Silvestre D. Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal. *Nutr Hosp.* 2011;26(4):722-8
34. Shoji H, Shinohara K, Oguchi S, Shiga S, Yamashiro Y. Suppressing effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2004;89:136-8.
35. Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;17(6):271-8.
36. Saben JL, Bales ES, Jackman MR, Orlicky E, MacLean PS, McManaman JL. Maternal Obesity Reduces Milk Lipid Production in Lactating Mice by Inhibiting Acetyl-CoA Carboxylase and Impairing Fatty Acid Synthesis. *Plos one* 2014;9(5):
37. Van Breda SG, Wilms LC, Gaj S, Jennen DG, Briedé JJ, Kleinjans JC, et al. The exposome concept in a human nutrigenomics study: evaluating the impact of exposure to a complex mixture of phytochemicals using transcriptomics signatures. *Mutagenesis.* 2015
38. Tang X, Lin CC, Spasojevic I, Iversen ES, Chi JT, Marks JR. A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer [Breast Cancer Res.](#) 2014;16(4):415.

# CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDES: AUTOINMUNIDAD Y FACTORES DE RIESGO EN PACIENTES Y FAMILIARES

**Valeria Soledad García Roel**

Hospital General de Agudos JM Ramos Mejía

**Directora:** Alicia Teresa Gauna

## RESUMEN

El 10% de los adultos tienen nódulos tiroideos palpables, del 5-10 % podrían ser malignos. La incidencia del cáncer de tiroides aumentó a expensas del carcinoma papilar (CPT). El objetivo fue estudiar en nuestra población de pacientes quirúrgicos por patología nodular y familiares de pacientes con carcinoma diferenciado (CDT), parámetros humorales en relación al riesgo de presentar esta patología maligna. El valor de TSH fue significativamente mayor en CDT, al igual que el porcentaje de anticuerpos antitiroglobulina positivos. Se estudiaron tiroiditis asociada e infiltración linfocitaria en anatomía patológica de los pacientes con CDT, sin resultados significativos. Sí se encontró una prevalencia elevada de mutación del BRAF en pacientes operados por CPT.

No se concluyó respecto a familiares por la escasa población estudiada.

Por otro lado, cobró relevancia el tratamiento y seguimiento "individualizado". Es sumamente importante la estadificación inicial, no sólo por TNM sino también por riesgo de recurrencia de la enfermedad para definir conducta. Cabe destacar que este riesgo predeciría la probabilidad de remisión o persistencia estructural, y es dinámico. Evaluamos respuesta al tratamiento inicial y estado final de enfermedad. Los pacientes con riesgo alto de recurrencia en la estadificación inicial presentaron persistencia estructural en mayor proporción. El mayor tamaño tumoral y las adenopatías al diagnóstico también se asociaron con persistencia.

## ABSTRACT:

Ten percent of adults have palpable thyroid nodules, between 5 and 10% could be malignant. The incidence of thyroid cancer has increased in relation to the raise of papillary thyroid carcinoma (PTC). The objective was to study, among the population of surgical patients for nodular disease and patients' relatives with differentiated thyroid carcinoma (DTC), humoral parameters in relation to malignancy risk. The TSH level and the percentage of positive thyroglobulin antibody were significantly higher in patients with DTC than in those with benign thyroid nodules. We studied Thyroiditis and lymphocytic infiltration in histopathology of patients with DTC and no significant results were found.

A high prevalence of BRAF mutation in patients operated by CPT was verified. It was impossible to conclude about relatives due to the small population studied.

On the other hand, "individualized" treatment and follow-up became relevant. It is important the initial stratification, not only by TNM but also by risk of disease recurrence to define behavior. It is important to remark that this stratification could predict remission or persistent disease, and the risk is dynamic.

We evaluated response to initial therapy and disease state at the end of follow-up. Patients with high risk of recurrence in initial stratification were more likely to have persistent structural disease. Large tumor size and presence of cervical lymph nodes at diagnosis were also associated with persistent structural disease.

## INTRODUCCIÓN:

Se estima que alrededor del 10% de los adultos tienen nódulos tiroideos palpables. El principal objetivo en la evaluación de un nódulo es la exclusión de malignidad, que oscila entre un 5 y un 10%. [39]

La incidencia del cáncer de tiroides ha aumentado durante los últimos 30 años a expensas del incremento del carcinoma papilar de tiroides (CPT). Este aumento puede atribuirse, por lo menos en parte, a la mayor precisión diagnóstica debida a la utilización de la punción aspiración con aguja fina

guiada por ecografía. La radioactividad es un factor comprobado de riesgo para el desarrollo de CPT. Otros marcadores de riesgo en el momento actual son muy controvertidos. **Valores de TSH más elevados y presencia de anticuerpos Antitiroglobulina (TgAb) fueron referidos en pacientes con CDT en relación a pacientes con enfermedad nodular benigna.**[40] Más incierto es el valor de los anticuerpos antiperoxidasa (TPOAb) en este sentido. **No hay estudios respecto a valores de TSH y presencia de TgAb en familiares de pacientes con CPT esporádico, como así tampoco la prevalencia de CPT en sus familiares.**

De los carcinomas diferenciados de tiroides (CDT), el carcinoma papilar comprende más del 85%; el 10% tienen histología folicular y el 3% están constituidos por células de Hürthle.[41] El CPT es esporádico en el 85% de los casos, siendo la prevalencia estimada del Carcinoma Papilar Familiar, definido como más de dos miembros con CPT, del 5%.[42]

En general, el pronóstico del CPT y el carcinoma folicular de tiroides (CFT) es bueno. Aunque es de destacar, que el 10% de los pacientes con CDT mueren a causa del mismo y una proporción aún mayor sufren comorbilidades debido a la recurrencia. [43,44]

Numerosos estudios se focalizaron en variables como ser el tamaño tumoral, la extensión de la enfermedad, el tipo histológico, la edad del paciente al diagnóstico y el sexo, para encuadrar a los pacientes en grupos de riesgo y estadios de enfermedad. Pero estos parámetros, si bien permiten establecer grupos de riesgo, no concuerdan en el 100% con la evolución a posteriori de los pacientes.

**Otros factores, no considerados en el TNM, también guardan relación con el pronóstico de los pacientes, entre ellos la autoinmunidad tiroidea y la mutación del oncogen BRAF.**

**Respecto a la autoinmunidad tiroidea,** la mayoría de los trabajos sobre anticuerpos son retrospectivos y se enfocan en los TgAb, que pueden indicar persistencia o recurrencia tumoral en los pacientes que ya fueron tiroidectomizados y ablacionados.[45] Existen unos pocos reportes sobre la influencia de los TPOAb sobre la evolución del CDT.

También es ampliamente referida la relación entre tiroiditis linfocitaria crónica y CPT.[46,47,48] El infiltrado linfocitario es un frecuente hallazgo en pacientes con CPT. Si bien este infiltrado puede ser indicativo de tiroiditis autoinmune y considerarse como un factor predisponente para CPT, el mismo puede ser una respuesta secundaria al CDT.[49] Este año, Laura Ward y colaboradores,[50] refirieron que las células inmunes infiltran los tejidos malignos con mayor frecuencia que a lesiones benignas. Estos autores postulan que el microambiente tumoral o peritumoral puede modificar la respuesta inmune, estimular la infiltración de células linfocitarias y por consiguiente, la presencia concomitante de tiroiditis linfocitaria ayuda a caracterizar un mejor pronóstico de los CDT.

Existen pocos estudios que relacionen la presencia de anticuerpos, su correlación en anatomía patológica con infiltrado linfocitario o tiroiditis crónica y pronóstico.

En las últimas décadas ha habido un gran avance en los conocimientos de las **bases genéticas y moleculares involucradas en el desarrollo de los cánceres de tiroides.** La mutación BRAF V600E es la alteración genética más común en el CPT, y ha sido reportada en un 29 a un 83% de estos tumores.[51,52] La alta frecuencia y especificidad de la mutación BRAF sugiere que jugaría un rol fundamental en la iniciación de la tumorigénesis del CPT.

En los últimos años se presentaron nuevos desafíos en relación al manejo de pacientes con CDT, lo que llevó a pensar en un **tratamiento y seguimiento individualizado,** en vez de un tratamiento estándar[53] como se realizaba en otros tiempos. Estos cambios son promovidos a través de distintas guías internacionales y nacionales.[54,55,56] En el año 2014 se publicó el consenso intersocietario argentino sobre el tratamiento y seguimiento de pacientes con CDT.[57] Un punto muy importante a resaltar es la necesidad de estadificar al paciente según **TNM y riesgo de recurrencia** de la enfermedad para definir seguimiento y tratamiento inicial; y reestadificarlo en base a su **respuesta a este tratamiento inicial,** ya que el riesgo de recurrencia de enfermedad es dinámico y determina la conducta a seguir.

**En esta beca, se planteó analizar factores de riesgo humorales para CDT en pacientes quirúrgicos por patología nodular. Evaluar en pacientes con CDT: riesgo de recurrencia, respuesta al tratamiento inicial y su evolución en el tiempo. Este análisis lleva a un mejor conocimiento de la patología que permitirá optimizar el tratamiento. Asimismo planteamos estudiar la prevalencia de CDT en familiares de primer grado.**[58]

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

### **Población:**

Se reclutaron **209** pacientes, que fueron todos los sometidos a tiroidectomía total entre enero del año 2008 y mayo del 2015 en el Hospital JM Ramos Mejía, ya sea por patología benigna o maligna. El grupo estaba conformado por 189 mujeres (90,4%) y 20 hombres (9,6%). La media para la edad fue  $46,7 \pm 13,7$  años y la mediana 49 (rango: 18-80).

### **Familiares de primer grado de pacientes con CDT:**

Se tomaron en cuenta a los familiares de pacientes con diagnóstico de CDT operados en el Hospital JM Ramos Mejía entre enero 2008 y mayo 2015. Se invitó sistemáticamente a participar del estudio a los familiares de los pacientes operados durante el año de la beca. Se conectó telefónicamente a los familiares de los pacientes operados el año anterior. A los familiares de los pacientes operados previamente, se los fue invitando a través del caso índice a medida que acudían a control por seguimiento de su enfermedad.

- ♦ Se pudieron estudiar 3 familias de las contactadas durante la internación este último año. El resto de los familiares no acudieron a la cita.
- ♦ Se pudo establecer contacto telefónico con 9 familias de los pacientes operados el año anterior, y se pudieron estudiar 4 de ellas.

Las familias que no pudieron ser estudiadas fue debido a:

- ♦ Datos de contacto no coincidentes.
- ♦ No aceptación para participar en el estudio.
- ♦ Domicilio muy distante o vivir en otro país.
- ♦ Poseer obra social o prepago y no querer estudiarse en el Hospital.
- ♦ No haber podido ser contactadas al momento del informe.

### **Métodos:**

Se evaluaron:

- ♦ En suero:
  - TSH (Quimioluminiscencia, Rango Normal: 0,4 - 4 uUI/ml).
  - TgAb (Quimioluminiscencia < 40 UI/ml)
  - TPOAb (Quimioluminiscencia < 35 UI/ml)
  - Tg (Quimioluminiscencia < 0,9 ng/ml)
- ♦ En pieza quirúrgica:
  - Evaluación anátomo-patológica, Infiltración linfocitaria/Tiroiditis Crónica. También se revisaron retrospectivamente los tacos de los pacientes operados con diagnóstico de CDT. Se realizó inmunomarcación de linfocitos por técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales para CD 20 línea B y CD3 línea T en 5 pacientes de los que presentaron infiltración linfocitaria.
  - BRAF: En el Servicio se investigó en 13 de estos pacientes la prevalencia de la mutación del oncogen BRAF. A partir de la pieza quirúrgica, se obtuvo un colgajo fresco de tejido tumoral que se colocó en un tubo con solución fisiológica. Se procedió de la misma manera con una muestra de tejido circundante sano. Los tubos se mantuvieron en freezer a -20°C hasta el procesamiento. Se procedió a la extracción de ADN y amplificación según técnica de ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation System- Polymerase Chain Reaction). El producto

amplificado se corrió en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio para analizar el patrón de bandas y se fotografió posteriormente. Al momento de realizar los estudios genéticos el operador desconocía el diagnóstico anatomopatológico de las muestras.

#### **Diseño del estudio:**

Fue un estudio prospectivo desde el inicio de la beca y retrospectivo aleatorizado hasta el año 2008, con seguimiento longitudinal. No experimental.

Se confeccionó una ficha de seguimiento para los pacientes que se iban a someter a cirugía de cuello por patología tiroidea benigna o maligna entre junio 2014 y mayo 2015, con especial interés en antecedentes personales y familiares de enfermedades autoinmunes, de cáncer de tiroides, en el registro de signo/sintomatología de disfunción tiroidea, y en el examen físico pertinente. Se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel donde constaron los siguientes datos: número de historia clínica, DNI, nombre y apellido, género, edad, motivo de cirugía, fecha quirúrgica, datos de laboratorio pre-quirúrgico como TSH, T<sub>4</sub>, TPOAb, Tg, y TgAb, ecografía tiroidea, parte quirúrgica, anatomía patológica. Se analizaron en segunda instancia datos en relación al tratamiento y evolución de la enfermedad en el caso de CDT, tales como necesidad de dosis ablativa, rastreo corporal total, estudios de evaluación temprana: Tg, TgAb, Ecografía, estudios de evaluación tardía.

Se estadificó a todos los pacientes con diagnóstico de CDT según TNM. (Figura 1 y 2) Dentro del N se consideró CNo cuando no presentaban adenopatías por palpación, por ecografía ni por visualización quirúrgica.

Se evaluó riesgo de recurrencia de enfermedad según el consenso argentino.

Se evaluó la respuesta al tratamiento inicial a los dos años de seguimiento. Y se consideró:

- respuesta excelente (RE): paciente sin evidencia clínica de enfermedad, ecografía de partes blandas de cuello (luego de 6 meses del tratamiento inicial) sin evidencia estructural de enfermedad, Tg indetectable (<1ng/ml) bajo terapia hormonal y luego del estímulo (suspensión o rhTSH) en ausencia de TgAb medidos por métodos ultrasensibles (la estimulación no aplica a pacientes que no fueron ablacionados).
- persistencia bioquímica (PBQ): niveles de TG >1ng/ml bajo terapia hormonal o luego de la estimulación con ausencia de correlación estructural.
- persistencia estructural (PE): enfermedad persistente demostrable clínicamente, o por estudios por imágenes, en general asociadas a niveles estimulados o bajo terapia de Tg >1 ng/ml con TgAb negativos.
- aceptable: se consideró a la persistencia de TgAb positivos, a la Tg bajo inhibición <1 pero bajo estímulo entre 1 y 10, y a la ecografía sin cambios específicos o adenopatías subcentimétricas estables.

En la evaluación del estado final de la enfermedad se consideró:

- libre de enfermedad (LE): paciente sin evidencia clínica de enfermedad, ecografía de partes blandas de cuello sin evidencia estructural de enfermedad, Tg indetectable (<1ng/ml) bajo terapia hormonal y luego del estímulo (suspensión o rhTSH) en ausencia de TgAb medidos por métodos ultrasensibles.
- persistencia bioquímica, persistencia estructural y aceptable: iguales consideraciones que en respuesta al tratamiento inicial.
- recidiva: positividad de Tg cuando era negativa previamente o aparición de imágenes sugestivas de patología luego de un período libre de enfermedad.

#### ♦ Estadística:

- Se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics 21. Se empleó Test T de Student para variables cuantitativas y Chi cuadrado o Fisher según n para variables cualitativas. Se consideró significativa una p<0,05.

#### **RESULTADOS PRELIMINARES:**

Se operaron 84 pacientes que presentaron patología maligna en la anatomía patológica. (Tabla 1) De estos 84 pacientes, 57 tenían diagnóstico compatible con carcinoma por PAAF prequirúrgica. De los restantes, 17 tuvieron indicación quirúrgica por resultado de PAAF: Bethesda V (13), Bethesda IV (3), Bethesda III (1), 4 por tamaño nodular, 3 por bocio endotorácico, 1 por bocio tóxico y 2 por Hiperparatiroidismo primario.



Se excluyeron 6 pacientes por presentar carcinomas de tiroides no diferenciados: 3 carcinomas medulares de tiroides, 1 carcinoma escamoso de tiroides, 1 carcinoma anaplásico y 1 pobremente diferenciado.

El "n" de la población en estudio fue de **78** pacientes, 71 de género femenino (91%) y 7 masculino (9%). Presentaron una edad media de  $42,9 \pm 12,2$  años, mediana de 45 (rango: 19-63).

El 93,6% (73 pacientes) tuvieron diagnóstico de CPT, el 5,1% (4 pacientes) de CFT, y el 1,3% (1 paciente) de carcinoma de células de Hürtle. De los CPT, 40 fueron variante usual, 8 variante folicular, 1 esclerosante difusa, 1 cribiforme y en 23 no figura la variante.

Con resultados de anatomía patológica benignos se reclutaron 125 pacientes (Tabla 1): 114 mujeres (91,2%), 11 hombres (8,8%). Presentaron una edad media de  $49,3 \pm 13,8$  años, mediana de 51 (rango: 18-80).

Se revisaron 38 tacos de pacientes operados por CDT y se halló **infiltración linfocitaria** en 30/38 (78,9%). La infiltración fue leve en 21 pacientes y moderada en 9. La distribución fue generalizada en 9, peri e intratumoral en 12 y sólo peritumoral en 7 de los pacientes estudiados.

En 5 tacos se realizó inmunomarcación de linfocitos y todos fueron CD20 + (línea B).

Se reevaluó la presencia de **Tiroiditis de Hashimoto (TH)** en los tacos de 14 pacientes con patología benigna y de 46 pacientes con cáncer. Se halló TH en 10/14 benignos y en 29/46 cánceres. Esta diferencia no fue significativa.

De los 29 pacientes que tuvieron TH y cáncer, 21 tuvieron al menos un anticuerpo positivo (10 ambos positivos, 5 TPOAb positivos, 6 TgAb positivos). De los 8 restantes, en 5 ambos anticuerpos fueron negativos, y 3 no fueron considerados por tener sólo uno o ningún anticuerpo dosado.

La mutación del oncogén **BRAF** estuvo presente en el 77% de los CPT, sin ningún resultado falso positivo.

## MARCADORES DE RIESGO DE CDT EN NODULO TIROIDEO

a) La edad fue significativamente menor en malignos (M) que en benignos (B) ( $p < 0,001$ ). Gráfico 1.

b) El valor de TSH fue significativamente mayor en M vs B ( $p < 0,001$ ). Para este estudio se excluyeron 45 pacientes (16 del grupo M y 29 del B) por presentar enfermedad de Graves, Bocio tóxico, hipotiroidismo confirmado con  $TSH \geq 8$  o por estar bajo tratamiento con levotiroxina o metimazol.

El valor de TSH persistió siendo significativamente mayor en patología maligna aún excluyendo los pacientes con TPOAb positivos ( $p < 0,000$ ). Cabe remarcar que los valores de T<sub>4</sub> no difirieron entre los grupos. Gráfico 2.

c) El porcentaje de TgAb positivos fue significativamente mayor en M vs B ( $p < 0,04$ ). Gráfico 3.

d) El porcentaje de TPOAb positivos también fue mayor en M vs B, pero esta diferencia no fue significativa ( $p > 0,6$ ). Gráfico 3.

## FACTORES PRONÓSTICO Y EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES CON CDT

### a) Respuesta al tratamiento inicial según estadio por TNM:

Se confeccionó una tabla en la cual se dividió a los pacientes con diagnóstico de CDT por estadio de enfermedad según el TNM. Recordemos que esta clasificación refleja el riesgo de mortalidad a 10 años que tiene un paciente a causa de la enfermedad, siendo del 1,7% para el estadio I, del 15,8% para el II, del 30% para el III, y del 60,9% para el IV. Luego se hizo referencia a qué respuesta al tratamiento inicial, considerado a 2 años de la cirugía, tuvo cada paciente. (Tabla 2)

Cabe señalar que cuando se hace referencia a persistencia estructural, esto implicó también una persistencia bioquímica.

Los 6 pacientes con estadio I por TNM que tuvieron respuesta aceptable fue por presentar TgAb positivos.

Los pacientes con estadio III y IVa que presentaron respuesta aceptable fue por imagen dudosa en ecografía o Tg bajo estímulo entre 1 y 10.

En 19 pacientes no se pudo determinar la respuesta por no cumplirse los dos años desde la cirugía, por abandono de seguimiento o falta de datos.

#### **b) Factores de riesgo en relación a la respuesta al tratamiento inicial:**

Se evaluaron distintos posibles factores de riesgo en cáncer como la edad media, el valor de TSH, la presencia de TPOAb o TgAB positivos, la presencia de BRAF positivo, la TH asociada, la infiltración linfocitaria, el tamaño tumoral, la presencia de adenopatías al diagnóstico y el riesgo de recurrencia de enfermedad. Se los relacionó con la respuesta al tratamiento inicial. (Tabla 3)

Se encontró que los pacientes que tuvieron respuesta excelente a los 2 años de la cirugía presentaban al diagnóstico un tamaño tumoral significativamente menor que los que presentaron persistencia estructural. Por otro lado, el 83,8% de los pacientes con RE no presentaron adenopatías clínicas al diagnóstico.

Más del 50% de los pacientes con respuesta excelente pertenecieron a los grupos de muy bajo y bajo riesgo. Por el contrario, el 66,6 % de los pacientes con persistencia estructural pertenecían a riesgo intermedio y alto.

#### **c) CDT: relación de TH con respuesta al tratamiento inicial.**

Se evaluó en pacientes con CDT y TH qué respuesta al tratamiento inicial tuvieron. Lo mismo se evaluó en pacientes sin TH. (Tabla 4)

#### **d) Estado final de enfermedad según estadio por TNM.**

La media del tiempo de seguimiento de enfermedad fue 36,48 meses  $\pm$  15,9. Se evaluó el estado final de enfermedad de los pacientes con más de dos años de seguimiento al finalizar el año de beca.

Se confeccionó una tabla de estado final de enfermedad y estadio según TNM. (Tabla 5)

Los 4 pacientes del estadio I de la enfermedad que se consideraron con respuesta aceptable fue por presentar TgAb positivos.

### **ESTUDIO EN FAMILIARES:**

-¿Cuál es prevalencia de CPT familiar en esta población?; ¿Difieren los valores de TSH, TgAb, TPOAb en familiares no CDT? Hay más patología tiroidea en familiares de CDT?

Se estudiaron al momento del informe 7 familias de pacientes con CDT: se reclutaron 18 personas. 11 fueron de género femenino y 7 de género masculino. La media de edad fue 33,28  $\pm$  12,54.

Para el análisis de TSH y anticuerpos se excluyeron 3 pacientes por estar en tratamiento con levotiroxina.

La media de TSH fue 2,49  $\pm$  1,63.

Tanto TgAb como TPOAb fueron negativos en todos los pacientes.

Se realizó ecografía de tiroides en 10 pacientes. 4/10 presentaron nódulos. De estos 4 pacientes 3 tenían perfil tiroideo normal y uno presentaba hipotiroidismo autoinmune (excluido para el análisis de TSH y Anticuerpos). Un paciente tuvo indicación de PAAF. Resultado: Bethesda II.

### **DISCUSIÓN/CONCLUSIONES/RECOMENDACIONES:**

- ♦ La población en estudio fue predominantemente del género femenino.
- ♦ Dentro de la patología maligna el CPT representó el 93,6%.
- ♦ No se puede concluir con respecto a familiares de pacientes con CDT debido a la escasa población estudiada a la fecha de este informe. Sin embargo, podemos mencionar que la media de TSH fue mayor que en pacientes con patología benigna y aún mayor que en cáncer. La prevalencia de bocio nodular fue mayor que en la población general.
- ♦ **Respecto a factores de riesgo de CDT** en un paciente con nódulo tiroideo: la **edad** fue significativamente menor y los valores de **TSH** fueron significativamente más altos en pacientes

con CDT con respecto a pacientes con patología nodular benigna. El porcentaje de pacientes con anticuerpos positivos fue significativamente mayor en aquéllos con CDT, con significancia estadística sólo para **TgAb**. Esto es acorde con algunos recientes estudios.[2]

♦ **Con respecto a factores pronóstico de evolución del CDT:**

- La **respuesta al tratamiento inicial** fue excelente en el 39,8%, persistencia estructural en el 11,5%, persistencia bioquímica en el 3,9% y aceptable en el 12,8%. No se pudo determinar en un 32% por no llegar a los 2 años de seguimiento en la mayoría de ellos. Vale mencionar que muchos pacientes no negativizan rápido TgAb, por lo cual algunos pacientes con respuesta aceptable por persistencia de anticuerpos podrían ser libres de enfermedad al evaluar el estado final de la enfermedad. El porcentaje de persistencia bioquímica fue más bajo que el referido en la literatura que oscila entre un 11 y un 22%.[17, 22]

- Al evaluar el **estado final de la enfermedad** el 29,5% de los pacientes estaban libres de enfermedad, el 9% presentaba persistencia estructural, el 3,9% persistencia bioquímica (que no se modificó) y el 7,7% aceptable. Un paciente con persistencia estructural pasó a persistencia bioquímica y uno sólo tenía 2 años de seguimiento, por lo cual no se pudo evaluar. En el 50% no se pudo determinar por faltar datos o no tener el tiempo adecuado de seguimiento. No hubieron casos de recidiva.

-Dentro de los factores de riesgo estudiados en relación a la respuesta al tratamiento inicial, la edad tendió a ser menor en aquellos con persistencia estructural en relación a los que tuvieron respuesta excelente. El **tamaño tumoral** fue significativamente mayor en pacientes con persistencia estructural. La gran mayoría de los pacientes con respuesta excelente no tuvieron adenopatías clínicas al diagnóstico. Quienes tenían **adenopatías** al diagnóstico tendieron a presentar una peor respuesta al tratamiento.[59] Cabe señalar que pacientes con riesgo alto de recurrencia de la enfermedad en la estadificación inicial presentaron estrecha relación con la persistencia estructural, tal como se refiere en la literatura.[60]

Los valores de TSH, y la presencia o no de TgAb y TPOAb no fueron significativos en cuanto a la respuesta al tratamiento inicial.

- Se encontró una prevalencia elevada de mutación del **BRAF** en esta población de pacientes operados por CPT. La mutación estuvo ausente en todas las muestras de tejido adyacente no tumoral.

-La presencia de **tiroiditis asociada** en la anatomía patológica se dio en el 63% de los pacientes, y la presencia de **infiltración linfocitaria** en el 78,9% de los estudiados. Estos factores no dieron resultados significativos en cuanto a la evolución de los pacientes.

El 72,4% de pacientes con TH por anatomía patológica también tuvieron al menos un anticuerpo positivo en sangre.

Llama la atención que en los 5 casos en que se inmunomarcó linfocitos fueron CD20+ (línea B), ya que los trabajos referidos inmunomarcan para línea T.

Dado que la muestra de pacientes en quienes se pudo estudiar estos aspectos fue pequeña, es necesario ampliar el análisis para obtener resultados más certeros.

Consideramos que estos resultados avalan el rol de TSH y TgAb como marcadores de riesgo poblacionales de carcinoma en la patología nodular.

Finalmente, los resultados en cuanto a riesgo de recurrencia de enfermedad y respuesta al tratamiento inicial avalan la importancia de la estadificación de riesgo, y de realizar un tratamiento y seguimiento individualizado de cada paciente, ya que el riesgo de recurrencia tuvo estrecha relación con la respuesta excelente o persistencia de la enfermedad. No debemos olvidar la reestadificación, ya que este riesgo es dinámico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harach HR, et al. Thyroid cancer, thyroiditis and dietary iodine: a review based on the Salta, Argentina model. *Endocr Pathol* 2008; 19:209-20.
2. Fiore E, Vitti P. *J Clin Endocrinol Metab*, April 2012; 97(4):1134-1145.
3. Hundahl, et al. A National Cancer Data Base report on 53, 856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. 1998. *Cancer*; 83: 2638-48.
4. Nose V. Familial follicular cell tumors: classification and morphological characteristics. *Endocr Pathol* 2010; 21:219-226.
5. Eustatia-Rutten CF, Corssmit EP, Biermasz NR, Pereira AM, Romijn JA, Smit JW, Survival and death causes in differentiated thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2006; 91 (1), 313-319.
6. Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2001; 86 (4), 1447-1463.
7. Hjiyiannakis P, Mundy J, Harmer C. Thyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1999; 11:240-244.
8. Tamimi D. The association between chronic lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* 2002; 10:141-146.
9. Kebebew E, Treseler PA, Ituarte PH, Clark OH. Coexisting chronic lymphocytic thyroiditis and papillary thyroid cancer revisited. *World J Surg* 2001; 25:632-637.
10. Okayasu I. The relationship of lymphocytic thyroiditis to the development of thyroid carcinoma. *Endocr Pathol Autumn* 1997; 8:225-230.
11. Sachmechi I, Bitton R. Role of thyroid-stimulating immunoglobulin in aggressiveness of well-differentiated thyroid cancer. *Endocr Pract* 2000; 6:139-142.
12. Cunha LL, et al. *Clinical Endocrinology* 2012; 77, 918-925.
13. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:245-262, 2005.
14. Kim KH, Kang DW, Kim SH, et al. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J.* 2004; 45: 818-821.
15. Pitoia F, Cavallo A. Thyroid Cancer. In search of individualized treatment. *Medicina (B Aires)* 2012; 72 (6): 503-513.
16. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid Cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1167-214.
17. Pitoia F, Ward L, Wohllk N, et al. Recommendations of the Latin American Thyroid Society on diagnosis and management of differentiated thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009; 53: 884-7.
18. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, et al. European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 787-803.
19. Pitoia F, Califano I, Vazquez A, et al. Consenso intersocietario sobre tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo.* Vol 51. N 2. 2014.
20. D. Handkiewicz-Junak et al. / *Molecular and Cellular Endocrinology* 322 (2010) 8-28.
21. Pitoia F, Bueno F, Urciuoli C, et al. Outcome of patients with differentiated thyroid cáncer .Risk Stratified according to the American Thyroid Association and Latin-American Thyroid Society. Risk of recurrence classification systems. 2013; 00: 1-7.
22. Tuttle RM, Tala H, ShahJ, et al. Estimating risk of recurrence in differentiated thyroid cancer after total thyroidectomy and radioactive iodine remnant ablation: using response to therapy variables to modify the initial risk estimated predicted by the new American thyroid association staging system. *Thyroid* 2010; 20:1341-1349.

# INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLOGICA CLÍNICA Y MOLECULAR DE INDIVIDUOS CON CÁNCER COLORRECTAL Y SOSPECHA DE SÍNDROME DE LYNCH.

## PRIMERA EXPERIENCIA EN EL PAÍS EN UNA INSTITUCIÓN PÚBLICA

**Mariano Golubicki**

Servicio de Laboratorio, Sección Biología Molecular; Servicio de Patología; Servicio de Oncología del Hospital de Gastroenterología "Dr. Carlos B. Udaondo"

**Directora:** Marina Antelo

### RESUMEN

Las mutaciones germinales en los genes MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 son frecuentemente implicadas en el Síndrome de Lynch (SL). La inmunohistoquímica (IHQ) y la inestabilidad microsatelital (IMS) son formas simples de selección para llegar a los test genéticos de alto costo. Se analizó la correlación entre ambas técnicas en 72 muestras de tumor parafinado de cáncer de colon que cumplían criterios clínicos. Las técnicas tuvieron una fabulosa correlación del 95.8%. Además, se ha podido detectar a tres familiares de primer grado de 3 familias distintas portadores de una mutación patogénica con esta metodología desarrollada en el laboratorio. Se ha demostrado que es posible montar un Laboratorio de Biología Molecular en el ámbito de un Hospital público llevando adelante complejas técnicas de diagnóstico y de manera gratuita para pacientes sin cobertura y que hasta entonces sólo eran factibles en laboratorios privados y de un costoso acceso. Después de esta satisfactoria experiencia es necesario continuar desarrollando estas técnicas para que todos los pacientes puedan tener acceso a las mismas.

### ABSTRACT:

Mutation of the mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 account for the majority of the genetic abnormalities in Lynch syndrome. The immunohistochemistry and microsatellite instability are simple pathways to select the right cases. The correlations between de IHQ and MSI were analyzed in 72 FFPE colorectal tumor samples. There was an amazing correlation of 95.8%. In addition, three asymptomatic first degree familial, of three different family, who were carriers of a pathogenic inactivating mutation in the MMR genes, were successfully detected. It was demonstrated that it is possible to set up a Molecular Biology Lab in the Public Hospital, carrying out complex diagnoses techniques without any cost to patients without coverage. After this successful experience is necessary to continue the development of these techniques in the public hospital.

### INTRODUCCIÓN:

El cáncer colorrectal es la tercera causa de muerte por cáncer en occidente[1]. De acuerdo a los datos del Globocan, en Argentina se diagnostican 10.300 casos nuevos por año y se producen 5700 muertes. Entre el 3% y el 8% se presentan en sus formas hereditarias, siendo el síndrome de Lynch la más frecuente de ellas. Las principales características de esta entidad son su presentación a edades tempranas (promedio de 45 años); la alta incidencia de tumores colorrectales sincrónicos (10%) y metacrónicos (30 a 50%) y la asociación con tumores extracolónicos (especialmente de adenocarcinomas de endometrio, el intestino delgado, ovario, estómago y vías urinarias) [2]. El diagnóstico clínico se sospecha por los antecedentes familiares y se confirma a través de la identificación de mutaciones germinales en los genes reparadores de errores del ADN (específicamente MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2). La mutación germinal en alguno de estos genes reparadores supone una predisposición, y se conoce como el primer golpe en el desarrollo de carcinogénesis del cáncer colorrectal. Para que se desarrolle la carcinogénesis debe ocurrir una segunda inactivación de la otra

copia del gen, en el otro alelo, lo que se conoce como el segundo golpe. Así estos genes supresores de tumores tienen su inactivación y se producen consecuencias cuantificables cuando ambas copias se inactivan. Estos eventos se pueden llamar mutaciones bialélicas o dobles heterocigotas ya que hay una mutación en ambas copias del gen en distintos sitios o no [3]. La consecuencia a este evento es la pérdida del sistema que agrega fidelidad al proceso de replicación del ADN, si antes la ADN polimerasa, enzima encargada de replicar el ADN en cada división celular, se equivocaba en 1 base por cada 100000 que polimerizaba, ahora entonces se va a equivocar en 1 base cada 1000 bases que polimeriza[4,5,6]. Esto trae enormes consecuencias. Debido a los altos costos que conlleva secuenciar los cuatro genes, se han implementado técnicas de cribado molecular. Estas técnicas confirman la sospecha clínica, ya que con esta sospecha no alcanza para saber si realmente hay un síndrome hereditario subyacente. Hay una característica molecular somática exclusiva de los tumores generados por el síndrome de Lynch, la inestabilidad microsatelital (IMS) [7]. La ADN polimerasa tiene mayor propensión a equivocarse cuando la secuencia que está generando tiene bases repetitivas y esta es la característica de un microsatélite, secuencias cortas repetitivas. Entonces si nosotros queremos saber cómo están funcionando las proteínas que reparan el ADN debemos ir a mirar en donde más se equivoca la ADN polimerasa. Esto se denomina diagnóstico indirecto. Esta característica somática también se puede ver por la expresión de las proteínas reparadoras mediante una técnica llamada inmunohistoquímica (IHQ). La IMS y la IHQ se complementan, ya que la IHQ nos da información sobre si las proteínas se están expresando pero no si están realizando la tarea de reparar las equivocaciones de la ADN polimerasa, esta información que no nos da la IHQ, pero sí nos la da la IMS. Por otro lado, la IHQ nos dice cuál es la proteína de las 4 posibles que está en déficit por lo que dirige el test genético sobre que gen hay que secuenciar, de manera contraria a la IMS que no puede informar. Una de las ventajas que tiene la IHQ sobre la IMS es su bajo costo, lo que lo hace la técnica de elección para este cribado molecular.

La importancia de llegar al diagnóstico de estos pacientes, más allá de las implicancias que tienen en el pronóstico, sobrevida y respuesta al tratamiento, se basa en que hay una destacada trascendencia en detectar a los familiares de pacientes índices que portan la mutación pero que aún no han desarrollado cáncer colorrectal. Esto implica que un familiar asintomático que porta la mutación predisponente, en alguno de los genes reparadores, cumplirá con pautas de vigilancia endoscópicas, realizándose una video colonoscopia cada 2 años antes de cumplir 30 años de edad y una cada año después de cumplir los 30 años. Este familiar asintomático no desarrollará cáncer colorrectal avanzado sino que en estadios tempranos aumentando considerablemente sus chances de curación.

El objetivo de este trabajo es caracterizar clínica y molecularmente a este grupo de pacientes y poder correlacionar la concordancia entre el resultado de ambas técnicas IHQ y IMS.

#### **MATERIALES Y MÉTODOS:**

Se analizaron 72 piezas de pacientes atendidos en el consultorio de la clínica de alto riesgo del Hospital de Gastroenterología "Dr. Carlos B. Udaondo". Los criterios de inclusión fueron; cumplir criterio de Amsterdam; cumplir criterio de Bethesda; ser menor de 70 años. Se excluyeron pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerosa y enfermedad de Chron). Para la técnica de inestabilidad microsatelital, la extracción y purificación del ADN se efectuó con el Kit QIAmp DNA Mini Kit QIAgen. Luego se comprobó la calidad y concentración de las extracciones mediante PCR en tiempo del gen RNAsaP. A las muestras que superaron los controles de calidad se les realizó una PCR multiplex con primers marcados con un fluoróforo para luego ser detectados en un secuenciador de Sanger. Se usó el kit de la empresa Promega IMS System V2.0 y se siguieron las indicaciones del mismo. La PCR tuvo lugar en un termociclador 2700 de AppliedBiosystem y luego se comprobó la presencia de una banda amplificada en un gel de agarosa 2%. Por último, el producto de PCR se corrió en un secuenciador ABI 3500 y se evaluó la longitud de los 5 microsatélites en comparación con el ADN extraído de la mucosa normal, o cuando ésta no estuvo disponible, se usó ADN de células sanguíneas mononucleadas. El programa utilizado para evaluar el estado de los microsatélites fue el GeneMarker. Se clasificó en inestable (MSI) cuando de los 5 marcadores evaluados 2 o más tenían una longitud menor al microsatélite evaluado en la mucosa normal, y como estable (MSS) cuando 1 o ninguno de los marcadores mostró acortamiento en relación al tejido normal.

Por el lado de las IHQ, se utilizaron cortes histológicos individuales de 5 um montados en portaobjetos adherentes con carga positiva. Se utilizaron anticuerpos monoclonales CellMarque™

dirigidos contra las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 y se determinó si tenían la expresión conservada o deficitaria en relación a improntas normales.

Además, se analizaron 15 muestras de 3 familias distintas. En la familia 1, con la mutación c.1700del5 en el exón 11 del gen MSH2, se estudiaron 7 individuos. En la familia 2, con la mutación c.1840G>T en el exón 12 del gen MSH2, se estudiaron 5, y en la familia 3, con la mutación c.861del4 en el exón 8 del gen PMS2, se han estudiado 3 individuos.

Se realizó la extracción de ADN con el Kit ZymoResearch™ Quick gDNA. Para el diseño de primers se utilizaron los informes de los casos índices (realizados en Myriad y en el Hospital Clínic) y la base de datos del grupo InSight. Se realizaron PCR convencional para el exón afectado en un Termociclador AppliedBiosystem 2700 y se comprobó la aparición de una banda característica en un gel de agarosa al 2%. El producto de la amplificación se secuenció en un ABI 3500® GeneticAnalyzer. Luego, se comparó la secuencia obtenida con las secuencias de referencia con los programas Chromas y Bioedit.

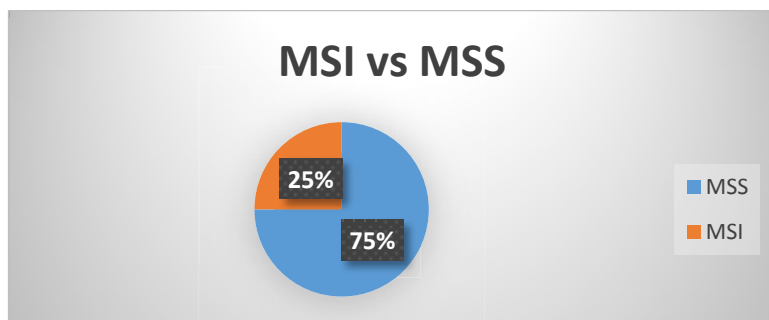
El estudio se realizó de acuerdo al Consentimiento informado aprobado oportunamente por el Comité de Ética en investigación del Hospital de Gastroenterología "Dr. Carlos B. Udaondo".

## RESULTADOS PRELIMINARES:

### Inmunohistoquímica e Inestabilidad Microsatelital:

Hemos evaluado en 72 pacientes, que cumplen con los criterios de inclusión, la IMS y la IHQ. En la IHQ, 17 (23.6%) tuvieron déficit de expresión de MMR (dMMR) y 55 (76.4%) expresión conservada (ecMMR). En el caso de la IMS, 18 (25%) fueron inestables (MSI) y 54 (75%) estables (MSS). De los 18 casos MSI, 16 (88.9%) también fueron dMMR y dos (11.1%) tuvieron ecMMR. De los 54 MSS, 53 (98.1%) tuvieron ecMMR y uno dMMR (Tabla 1). La concordancia total entre ambas técnicas fue del 95.8%. De los 17 casos con dMMR por IHQ, 11 tuvieron déficit específicamente en MLH1 11/17 64.7%, de los cuales a 8 se les realizó BRAF V600E y resultaron 4 mutados y 4 wild type. Finalmente, 13/72 (18%) pacientes fueron candidatos al estudio genético para arribar a al diagnóstico del SL.

*Figura 1:*



Porcentaje de tumores MSI vs porcentaje de tumores MSS en pacientes con sospecha clínica de Síndrome hereditario de base.

*Tabla 1*

	MSI	MSS	Total
dMMR	16	1	17
ecMMR	2	53	55
Total	18	54	72

Correlación entre las técnicas de cribado molecular ensayadas en pacientes con sospecha clínica de un síndrome hereditario de base. La correlación fue de 95.8% de 72 casos hubo coincidencia en 69.

### Estadios tumorales e IMS:

Al relacionar las variables MSI o MSS con los estadios tumorales encontramos que los tumores MSS se distribuyen de la siguiente manera: estadio I 5/54 (9.3%), IIA 18/54 (33.3%), IIB 4/54 (7.4%), IIIA 11/54 (20.4%), IIIB 4/54 (7.4%), IIIC 7/54 (12.9%) y IV 5/54 (9.3%). Por el lado de los tumores MSI encontramos: estadio I 3/18 (16.7%), IIA 8/18 (44.4%), IIB 4/18 (22.2%), IIIA 0/18 (0%), IIIB 1/18 (5.6%), IIIC 2/18 (11.1%) y IV 0/18 (0%).

Ahora bien, al separar entre estadios tempranos I – II y estadios avanzados III – IV se puede observar lo siguiente; en los tumores MSS: estadios I-II 27/54 (50%) y III-IV también 27/54 (50%), en los MSI: estadios I-II 15/18 (83.3%) y III-IV 3/18 (16.7%). (Tabla 2).

*Tabla 2*

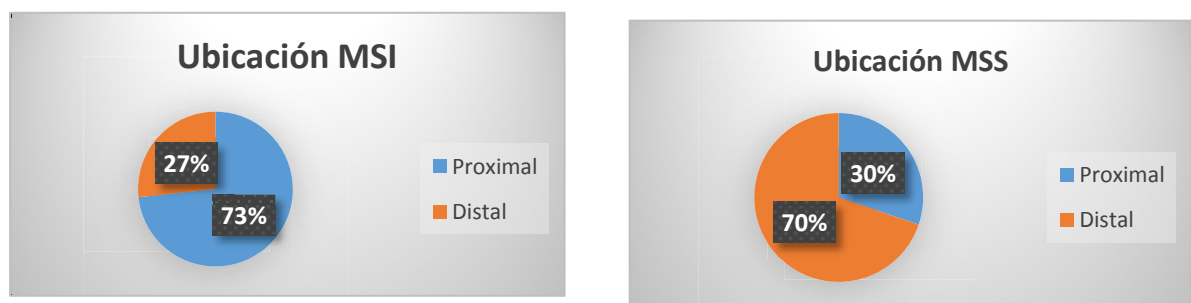
Estadios	MSS				MSI			
	n	%	n	%	n	%	n	%
I	5	9,3	27	50	3	16,7	15	83,3
IIA	18	33,3			8	44,4		
IIB	4	7,4			4	22,2		
IIIA	11	20,4	27	50	0	0	3	16,7
IIIB	4	7,4			1	5,6		
IIIC	7	12,9			2	11,1		
IV	5	9,3			0	0		
Total	54	100	54	100	18	100	18	100

Tabla de distribución de estadios tumorales según sistema reparador del ADN intacto MSS o según sistema reparador del ADN deficitario MSI.

### Localización colónica tumoral según IMS:

Según la localización del tumor en el colon lo hemos clasificado en proximal y distal y al relacionarlo con la inestabilidad microsateletal, cabe destacar que removimos de esta evaluación a 4 tumores que se encontraron en ambas ubicaciones por lo que el total de tumores evaluados en este caso fue de 68, 53 MSS y 15 MSI, en vez de 72. Aquí entonces, encontramos que: de los 53 pacientes con MSS 16/53 (30.2%) se ubicaron en el colon proximal y 37/53 (69.8%) en el colondistal; en cambio en los tumores MSI la relación se invierte 11/15 (73.3%) se ubicaron de manera proximal y 4/15 (26.7%) en el colon distal. (Figura 2)

*Figura 2*

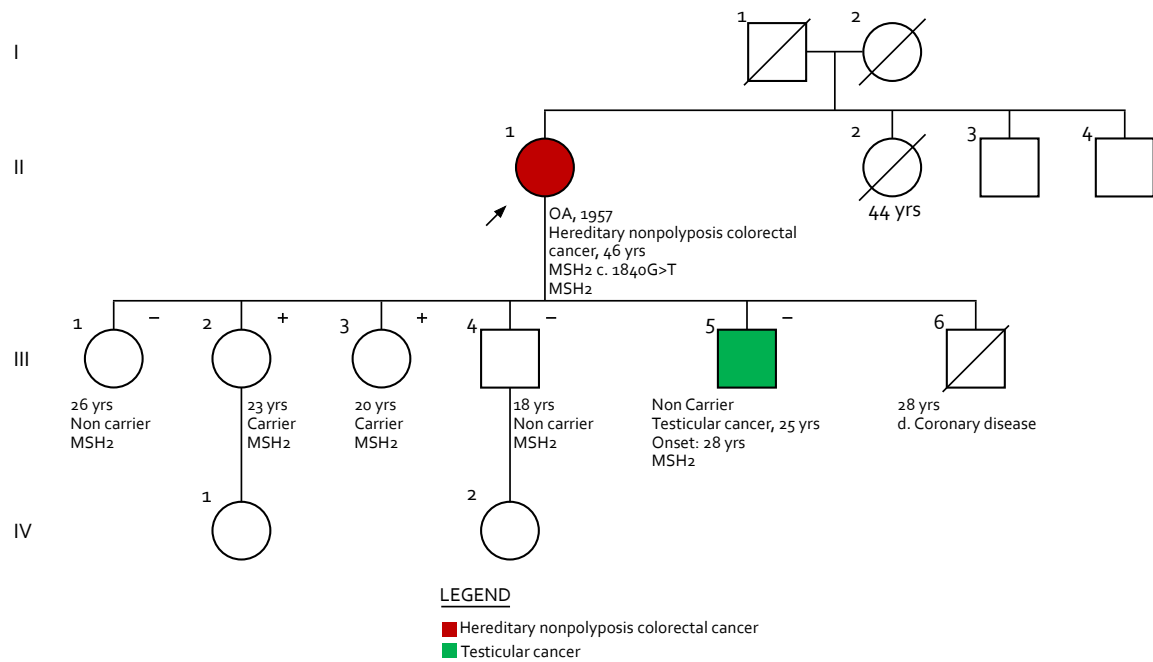


### Mutaciones germinales en familiares sanos:

En la familia 1 resultaron portadores de la mutación 2/5 individuos. En la familia 2 resultó 1/7 portador y en la familia 3 no se encontró la mutación en ningún familiar estudiado. Los portadores de la familia 1 eran menores de 30 años al momento del estudio y el portador de la familia 2 menor de 50 años. Se detallan en las siguientes figuras los familigramas, los electroferogramas de las mutaciones halladas y un breve resumen en forma de tabla sobre los familiares estudiados y sus hallazgos.



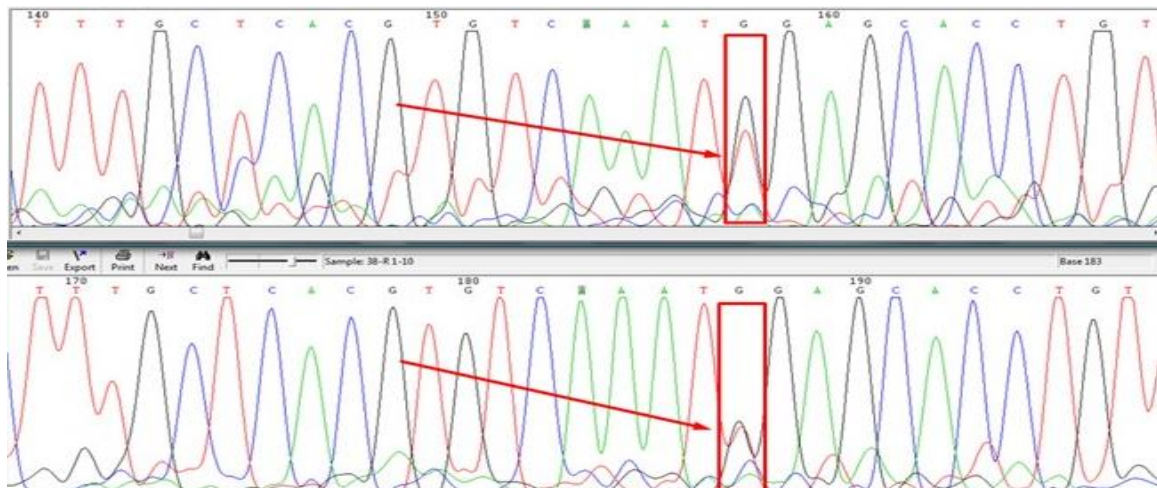
**Figura 3 Familia 1 (Familigrama)**



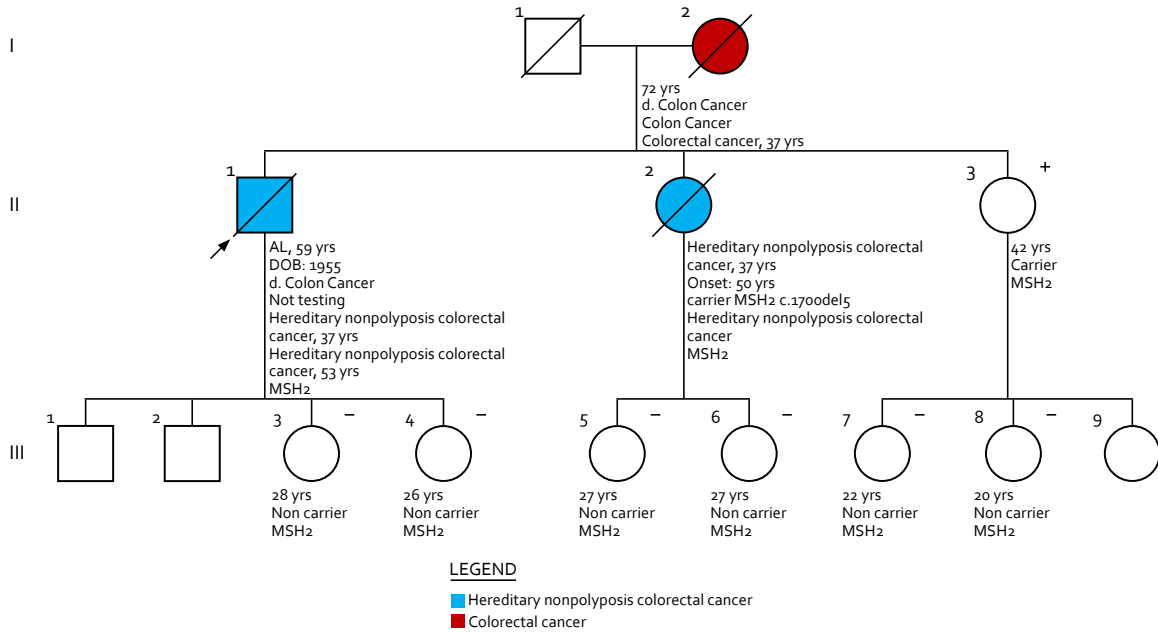
**Familigrama familia 1:** En rojo se indica el caso índice y con un signo más (+) si se encontró la mutación y con un signo (-) sino se encontró la mutación. Los familiares que poseen algún signo (+) o (-) son los que concurren a realizarse el test genético.

**Figura 4**

**Electroferograma:** Mutación germinal hallada en uno de los familiares de primer grado asintomáticos de la familia 1. La nomenclatura de la mutación de MSH2 exón 12 c.1840G>T. Se evidencia la mezcla de bases en la posición 1840 al ser la señal compartida por dos bases distintas, una proviene de la línea materna, y otra de la línea paterna.

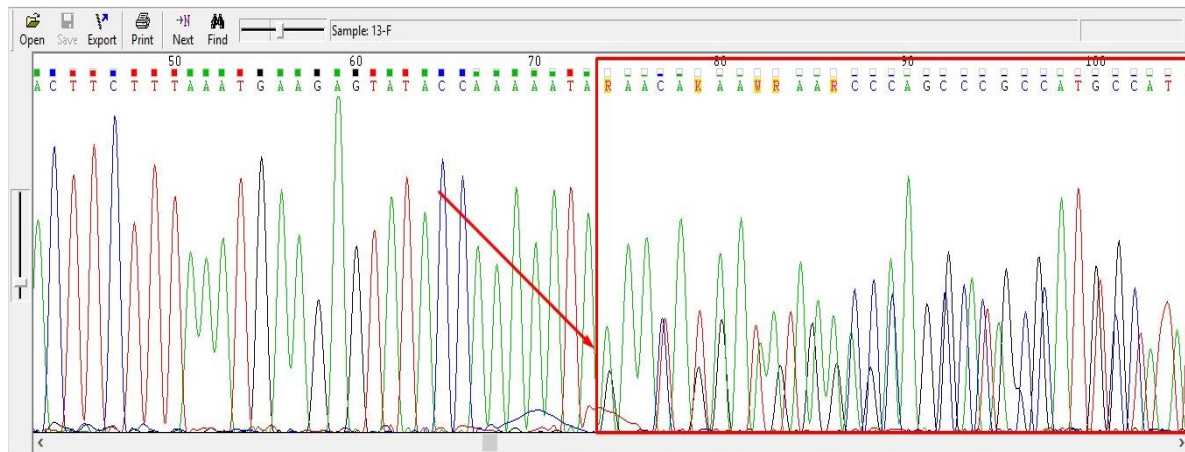


**Figura 5: Familia 2 (Familigrama)**



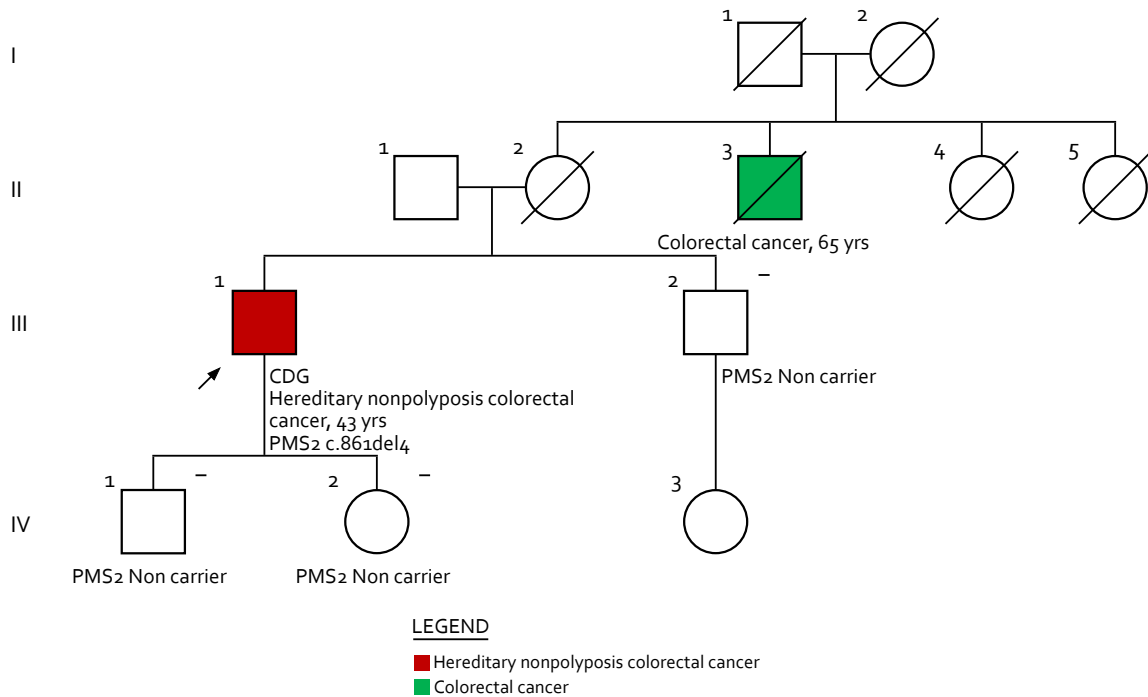
**Familigrama familia 2:** En celeste con una flecha negra se indica el caso índice y con un signo más (+) si se encontró la mutación y con un signo (-) sino se encontró la mutación. Los familiares que poseen algún signo (+) o (-) son los que concurrieron a realizarse el test genético.

**Figura 6:**



**Electroferograma:** En este gráfico encontramos que a partir de la deleción c.1700del5 en el exón 11 del gen MSH2, hay un corrimiento del marco de lectura en el alelo mutado por lo que si la deleción no es múltiplo de 3 bases, aparecerá un codón de stop temprano lo que derivará en una proteína truncada que será rápidamente degradada.

Figura 7: Familigrama Familia 3.



Familigrama familia 3: En esta familia no se halló ningún portador, todos los familiares fueron *wild type* para la mutación c.861del4 en el exón 8 del gen **PMS2**. Los familiares que poseen algún signo (+) o (-) son los que concurrieron a realizarse el test genético. El caso índice se indica con una flecha negra.

Tabla 3:

Familiar	Familia	Gen	Exón	Mutación	Resultado
II - 3	2	MSH2	11	c.1700del5 p.569X	Mutado
III - 3	2	MSH2	11	c.1700del5 p.569X	Wild type
III - 4	2	MSH2	11	c.1700del5 p.569X	Wild type
III - 5	2	MSH2	11	c.1700del5 p.569X	Wild type
III - 6	2	MSH2	11	c.1700del5 p.569X	Wild type
III - 7	2	MSH2	11	c.1700del5 p.569X	Wild type
III - 8	2	MSH2	11	c.1700del5 p.569X	Wild type
III -1	1	MSH2	12	c.1840G>T p.Gly614X	Wild type
III - 2	1	MSH2	12	c.1840G>T p.Gly614X	Mutado
III - 3	1	MSH2	12	c.1840G>T p.Gly614X	Mutado
III - 4	1	MSH2	12	c.1840G>T p.Gly614X	Wild type
III - 5	1	MSH2	12	c.1840G>T p.Gly614X	Wild type
III - 2	3	PMS2	8	c.861del4 p.305X	Wild type
IV - 1	3	PMS2	8	c.861del4 p.305X	Wild type
IV - 2	3	PMS2	8	c.861del4 p.305X	Wild type

Resumen de mutaciones encontradas en las familias analizadas

## DISCUSIÓN:

La utilidad de la detección inmunohistoquímica del déficit de la expresión de las proteínas reparadoras del ADN en el screening del cáncer colorectal ha sido el foco de muchas intensivas investigaciones en los últimos 10 años, debido al potencial que tiene detectar este tipo de síndromes hereditarios. Particular atención ha tenido también la comparación entre la IHQ y la inestabilidad microsatelital, debido a que ambas técnicas informan lo mismo pero de distinta manera. En este estudio hemos observado que ambas técnicas poseen un valor predictivo equivalente para detectar a los verdaderos pacientes con Síndrome de Lynch con mutaciones germinales en los genes MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. La correlación obtenida entre ambas técnicas fue del 95.8%. Esto sugiere que, debido a las ventajas en relación al costo de cada determinación y a la mayor facilidad técnica, debe utilizarse la IHQ como primera herramienta de cribado molecular, resguardando así la IMS para los casos con sospecha clínica de Síndrome de Lynch y con la expresión conservada de la expresión de las proteínas reparadoras. Además, aquí también hemos encontrado que podría agregar valor predictivo la ubicación del tumor siendo más sospechosos de un Síndrome de Lynch los tumores ubicados en el colon proximal, y en estadios tempranos, y no siendo sospechosos los tumores de ubicación colónica distal y en estadios avanzados.

Al observar con mayor detenimiento nuestros resultados nos posamos sobre las discordancias y vemos que hay dos casos con MSI y la expresión conservada, este hallazgo se lo podemos atribuir a que no todas las mutaciones patogénicas resultan en un déficit de la expresión de las proteínas reparadoras. Esto se explica sobre la base de que pueden existir mutaciones que afecten el sitio activo de la proteína reparadora, en este caso estamos particularmente hablando de proteínas que arreglan el ADN y para poder arreglarlo deben unirse al mismo, y para unirse deben poseer en su sitio activo aminoácidos con carga positiva ya que el ADN por sus grupos fosfatos posee carga negativa. Entonces si existe una mutación puntual, que por el código genético, cambie una base y esa base transforme un codón que debería significar un aminoácido positivo en un aminoácido negativo, esa proteína no va a funcionar no va a arreglar el ADN y vamos a obtener un resultado de inestabilidad microsatelital MSI, pero la proteína va estar expresada por ende vamos a tener una expresión conservada por IHQ. Este podría ser el caso de las dos discordancias halladas en nuestros datos. El caso que resultó con estabilidad microsatelital MSS y déficit en la expresión por IHQ podría deberse a un error en la técnica de IHQ ya que es menos sensible que la IMS.

También es importante marcar que debido a los altos costos aún enfrentamos para abordar la secuenciación de los genes en la línea germinal para arribar al diagnóstico del Síndrome de Lynch, es de mayor utilidad la IHQ ya que está dirigiendo el test genético para saber qué gen es el indicado para secuenciar, la IMS no brinda esa información por lo que de no poseer la IHQ se deberían secuenciar los 4 genes incrementando los costos del diagnóstico. Más aún, hay un grupo que posee un déficit del sistema reparador del ADN pero no se debe a una mutación en la línea germinal predisponente como es el caso del Síndrome de Lynch, sino que la inactivación es epigenética somática resultando la metilación del promotor del gen MLH1 y la forma de obtener información sobre a qué grupo pertenece este caso, sólo podemos saberlo haciendo estudios de metilación, que no son muy accesibles, o buscando la mutación V600E del gen BRAF. Si los pacientes con déficit en la expresión de MLH1 poseen el BRAF mutado no serán seguidos como pacientes con SL sino que serán casos esporádicos de cáncer colorectal. En cambio, pacientes con déficit en MLH1 pero con resultado de tipo silvestre (*wild type*) en el gen BRAF serán seguidos para llegar al diagnóstico del SL.

En relación al hallazgo, en familiares de 1er grado asintomáticos, de las mutaciones predisponentes que poseen los casos índices, podemos decir que poder contar con esta herramienta en el ámbito de un Hospital público es muy importante ya que es de muy bajo costo y sus resultados son muy beneficiosos para la salud pública. En primer lugar podemos decir que los familiares portadores de la mutación predisponente no desarrollarán cáncer avanzado si siguen las pautas de vigilancia endoscópica, esto trae grandes beneficios ya está demostrado que los pacientes en estadios tempranos de cáncer de colon tienen altas chances de curación, sin incurrir en tratamientos costosos para las líneas avanzadas y aún más disminuir las internaciones por eventos adversos relacionados a la quimioterapia agresiva. Por otro lado, cabe mencionar que en una familia con un caso índice confirmado de SL todos los familiares de primer grado deben tomar medidas de vigilancia endoscópica, debido al riesgo elevado por no saber si portan la mutación o no. Ahora bien, implementando esta técnica, se puede

decir a los familiares estudiados que no portan la mutación y que dejen la vigilancia endoscópica ya que poseen el mismo riesgo que la población a desarrollar cáncer colorrectal.

**CONCLUSIONES:**

La técnica de cribado molecular para detectar pacientes con SL de primera línea es la IHQ. La IMS puede ser reservada para casos en donde el resultado de la IHQ sea dudoso en relación a la sospecha clínica (criterios de amsterdam/bethesda, colon proximal y estadio temprano). Adicionalmente detectar familiares asintomáticos portadores de mutaciones germinales predisponentes, en el marco de una clínica de alto riesgo de cáncer, tiene implicancias en el seguimiento de grandes familias ya que disminuye el número de involucrados en el mismo.

Así también remarcar que hemos demostrado que se pueden implementar las más complejas técnicas de cribado molecular en el ámbito de un Hospital Público, que hasta el momento sólo eran de alcance privado, y de manera más que satisfactoria obteniendo parámetros de calidad comparables con cualquier institución del mundo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30.
2. Umar A, Boland C, Terdiman J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 261-8.
3. Knudson AG, Two genetic hits (more or less) to cancer, *Nat Rev Cancer*, Vol 1, Nov 2001
4. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL (2006) DNA mismatch repair: functions, mechanisms. *Chem Rev* 106(2):302–323.
5. Jascur T, Boland CR (2006) Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer* 119(9):2030–2035.
6. Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *NatRevMol Cell Biol* 7(5):335–346
7. *Cancer Research* 58. 5248-5257, November 15. 1998

# PROGRAMA NECPAL: IDENTIFICACIÓN PRECOZ, ATENCIÓN CONTINUA E INTEGRAL DE PACIENTES CON ENFERMEDAD ONCOLÓGICA AVANZADA Y NECESIDADES DE ATENCIÓN PALIATIVA

Victoria Llanos

Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", Instituto Pallium Lationamérica.

**Directora:** Vilma A. Tripodoro

## RESUMEN

**Introducción:** el 75% de la población morirá de una enfermedad crónica y 1/3 será por cáncer. El objetivo del estudio es explorar la población oncológica asistida en el IDIM, la proporción de pacientes con enfermedad avanzada y necesidades de asistencia paliativa (AP) precoz, integral y continua.

**Material y métodos:** Estudio transversal prospectivo multicéntrico de identificación con el Instrumento NECPAL-CCOMS-ICO© en pacientes oncológicos con necesidades de AP. Consiste en evaluación cuali-cuantitativa, multifactorial indicativa y no dicotómica que completa el médico tratante. El estudio consta de 4 etapas no consecutivas: 1) Identificación y establecimiento de indicadores de AP de calidad; 2) Descripción de la situación basal, 3) Implementación del Programa; 4) Evaluación de estructura, proceso y resultado.

**Resultados: Etapa 1:** 4 grupos focales para definir indicadores: situación basal N173; 67,1% mujeres (mediana 75 a); cáncer de mama (40,5%); digestivos 18,5% y de pulmón 11,6%. EL 28,3% derivados a CP.

**Etapa 3:** N 291, 66% mujeres, mediana 77 años. Cáncer de mama 35.7%, digestivos 18.3 % pulmonar 10%. 70% cáncer avanzado y un 52% con necesidades de AP (NECPAL+). Seguimiento por CP del total 47% y de NECPAL+ 90.2%. Media de seguimiento 8 meses. Fallecidos 84 (54.9 % de NECPAL+).

**Discusión:** En Argentina si bien existen programas de cronicidad no existe aún ninguno que pueda identificar necesidades de AP. El estudio aún se encuentra en curso.

## ABSTRACT

**Introduction:** 75% of the population will die of a chronic disease and cancer will be 1/3. The aim of the study is to explore the assisted cancer population in the IDIM, the proportion of patients with advanced disease, and needs, early, comprehensive and continuous palliative approach (PA). **Methods:** Multicenter prospective cross-sectional study for identification of cancer patients with PA with the NECPAL- WHOCC-ICO © tool. It is a quantitative evaluation, indicative and non-dichotomous multifactorial supplementing the oncologic therapy. The study consists of four non-consecutive steps: 1) Identifying and establishing quality indicators AP; 2) Description of the baseline, 3) Implementation of the program; 4) Evaluation of structure, process and outcome. **Results:** Step 1: 4 focus groups to define indicators: baseline N173; 67.1% women (median 75); breast cancer (40.5%); gastrointestinal tumors 18.5% and 11.6% of lung cancer. 28.3% palliative care referrals. Step 3: n 291, 66% female, median 77 years. Breast cancer 35.7%, 18.3% GI, lung 10%. Advanced cancer 70% and 52% in PA needs (NECPAL +). Total PA following 47% and 90.2% NECPAL+ following; media 8 months. Death 84 (54.9% of NECPAL +). **Discussion:** In Argentina although there are chronicity programs there is still no one which can identify PA needs. The study is still in progress.

## INTRODUCCIÓN

El aumento de la esperanza de vida en las últimas décadas es un fenómeno mundial. La cronicidad es un problema que afecta a la gran mayoría de los países desarrollados.

Su correcta gestión ha adquirido una especial relevancia en los últimos años, instando a la OMS a los sistemas de salud de todo el mundo a diseñar y establecer estrategias adecuadas para hacer frente al desafío, reorientando sus sistemas de atención sanitaria. Se estima que alrededor de 36 millones de personas mueren al año en todo el mundo a causa de una enfermedad crónica; de ellas, más del 70% son mayores de 60 años de edad. [1,2]

En Argentina la situación no es diferente: la esperanza de vida al nacer era para el año 2013 de 72/79 años, hombre/mujer [3,4]. El país se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (aproximadamente 200 casos x 100.000 habitantes), de acuerdo a las estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer para el año 2012. Es decir, más de 100.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, siendo la segunda causa de muerte dentro de las Enfermedades No Transmisibles. En el año 2012, los años de vida potencialmente perdidos debido a enfermedades oncológicas fue de 103 cada 10.000 habitantes. [2,5]

La atención paliativa (AP) (OMS, 2002) es un enfoque que mejora la calidad de vida de pacientes y familiares que se están enfrentando a los problemas asociados a una enfermedad potencialmente mortal, a través de la prevención y el alivio del sufrimiento realizando una identificación temprana, una evaluación adecuada y aplicando tratamientos para el dolor y otros problemas físicos, psicosociales y espirituales.

Varios estudios indican que las personas con enfermedades mortales pueden beneficiarse de los cuidados paliativos (CP) tempranos. [6,7] En 2010 un estudio publicado en The New England Journal of Medicine demuestra que en pacientes con cáncer de pulmón metastásico, quienes accedieron tempranamente a los CP mejoraron significativamente, no solo la calidad de vida y el ánimo, sino que comparados con pacientes que recibieron la atención estándar, tenían cuidados menos agresivos en el final de la vida, e incluso mayor supervivencia.[8] Por otro lado, cuando los pacientes no son identificados a tiempo, las consecuencias pueden incluir inadecuado alivio de síntomas, inesperadas visitas a la guardia y muertes institucionalizadas no planeadas. Pacientes y familiares ven negada su oportunidad de considerar su futuro según la información provista, planear su etapa final y preparar su muerte. [9]

Para la identificación diana se han propuesto diversos instrumentos. Estas iniciativas han demostrado su factibilidad en todos los servicios de salud, su asociación a medidas de mejora de la calidad y sus beneficios en la atención de estos pacientes. [10,11] La comprensión de la necesidad de los CP es esencial en la planificación de los servicios de salud. Los métodos existentes para la estimación de la población diana varían en el enfoque y las fuentes de datos. [12]

En el año 2014 se publicó un estudio poblacional catalán, de prevalencia de pacientes con cronicidad avanzada y necesidades de AP en la totalidad de una población determinada. Se utilizó el Instrumento NECPAL CCOMS-ICO® (NECesidadesPALiativas Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud – Institut Català d' Oncologia) aplicado a los profesionales médicos y enfermeros del sistema socio-sanitario. La medición directa de la prevalencia de personas con necesidad de AP en una región geográfica entera fue 1,5% de la población. Se mostró que alrededor del 75% de las personas morirá a causa de una o varias enfermedades crónicas progresivas, tras un proceso evolutivo con crisis frecuentes, alta necesidad y demanda de atención, frecuentes decisiones de carácter ético - clínico y alta frecuentación de los servicios sanitarios y sociales. Lo más relevante e innovador de este estudio consiste en la aplicación de una metodología prospectiva directa de medición sistemática, en lugar de la estimación de la prevalencia de personas con condiciones crónicas avanzadas con necesidades de AP.[13]

En Argentina si bien existen programas de cronicidad orientados a la prevención primaria, no existe aún ningún programa de cronicidad que pueda identificar necesidades de AP.

Al igual que el proyecto NECPAL CCOMS-ICO® realizado en Cataluña, nuestro estudio tiene como objetivo fundamental diseñar un programa para mejorar la AP de toda la población de pacientes oncológicos asistidos en el Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", mediante la identificación precoz de estos pacientes y su asistencia. Se fundamenta en tres ejes principales: a) la investigación, b) la docencia y c) la propuesta de programa de implementación.



Los Objetivos específicos son brindar AP precoz, integral y continua a los pacientes y familias identificados ya sea en el ámbito hospitalario (IDIM) como en el seguimiento domiciliario (Instituto Pallium) según el Procedimiento Normatizado de Trabajo (PNT); Realizar una mejor evaluación, planificación y provisión de cuidados en relación a las necesidades de AP en el lugar de preferencia del paciente identificado y su familia; Elaborar un mapa de rutas críticas en situación de enfermedad avanzada (SEA) para mejorar la AP en todos los enfermos oncológicos del Instituto Lanari con la redacción de un Documento: "Recomendaciones Básicas para la AP de los Enfermos oncológicos Identificados en SEA". Este estudio se encuentra en curso, financiado por el Instituto Nacional del Cáncer, finalizando en 2016 según cronograma.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Estudio transversal prospectivo multicéntrico para identificar con el Instrumento NECPAL-CCOMS-ICO® y asistir precozmente a personas con enfermedad oncológica avanzada y necesidades de AP. Se incluyeron todos los servicios del IDIM donde se asisten pacientes oncológicos para iniciar un Proceso asistencial Normatizado de Trabajo (PNT) que introduzca una "orientación" paliativa adicional al tratamiento de la enfermedad oncológica.

Los pacientes fueron detectados a partir del sistema informático de turnos del hospital y del registro del comité de tumores. Para describir la situación basal se realizó una recopilación de pacientes oncológicos que se atendieron en el IDIM desde el 01.01.14 al 30.06.14.

La muestra presentada en este informe del estudio en curso está conformada por los pacientes oncológicos asistidos desde el 15.07.2014 al 31.05.2015.

El estudio consta de 4 etapas no consecutivas: 1) Identificación y establecimiento de indicadores, a partir del nuevo marco conceptual de AP en cáncer avanzado propuesto; 2) Descripción, en función de los indicadores establecidos, de la situación basal, 3) Implementación del Programa; 4) Evaluación de estructura, proceso y resultado.

El Instrumento utilizado en las entrevistas para la recogida de datos fue el Instrumento NECPAL CCOMS-ICO®, que consiste en una evaluación cuali-cuantitativa, multifactorial indicativa y no dicotómica que completa el médico tratante. Su finalidad es la de identificar enfermos con necesidades de un cambio de enfoque, incorporando medidas paliativas en su atención. No es un instrumento de carácter pronóstico, ni indica la intervención de equipos específicos, ni limita necesariamente otros tipos de enfoques concomitantes.

El instrumento combina evaluación de percepción del profesional (la pregunta sorpresa: ¿le sorprendería que este paciente se muriera en el próximo año?), con indicadores objetivos de severidad, progresión de la enfermedad, comorbilidad y consumo de servicios.

Permite clasificar a los pacientes en tres niveles e identificar los que presentan necesidades de AP ("NECPAL +") cuyo profesional tratante no se sorprendería si fallece en un lapso de 12 meses y tiene además un criterio positivo de severidad. (Figura 1)

El instrumento NECPAL CCOMS-ICO® considera como indicadores específicos de severidad y progresión para personas con enfermedad oncológica y necesidades de AP los siguientes:

1. Diagnóstico confirmado de cáncer metastásico (estadio IV) y en algunos casos como en las neoplasias de pulmón, páncreas, gástrica y esofágica- también en estadio III, que presenten: escasa respuesta o contraindicación de tratamiento específico, brote evolutivo en transcurso de tratamiento o afectación metastásica de órganos vitales (SNC, hígado, pulmonar masiva, etc.)
2. Deterioro funcional significativo (Palliative Performance Status (PPS) < 50%)
3. Síntomas persistentes mal controlados o refractarios, a pesar de optimizar un tratamiento específico

La evaluación de proceso fue continuada con recopilación de datos a través de los sistemas de información y documentación específica según el Manual para base de datos del NECPAL CCOMS-ICO®. El análisis se realizó con el programa estadístico SPSS versión 20.

## **RESULTADOS**

Se presentan los resultados de acuerdo a las 4 etapas del proyecto, siendo las mismas no consecutivas.

**Etapas 1:** Se realizaron 4 grupos focales con los profesionales de ambas instituciones para la identificación y establecimiento de indicadores de la situación basal, a partir del nuevo marco conceptual de AP en cáncer avanzado propuesto. De ellos se decidió incluir los siguientes: cantidad de pacientes oncológicos, sitio de diagnóstico primario, cantidad de internaciones en el período analizado, uso de recursos (estudios, procedimientos diagnósticos, etc), primera consulta a oncología, seguimiento por equipo CP, fallecimiento.

**Etapas 2: Situación basal**

*Datos demográficos:* Se analizaron un total de 173 pacientes atendidos entre enero y junio inclusive de 2014. De ellos, el 67,1% (n116) fueron mujeres. La mediana de edad fue de 75 años.

*Diagnóstico primario:* Una alta proporción de los pacientes oncológicos analizados en la situación basal presentan cáncer de mama (40,5%). En segundo lugar se pueden observar los tumores digestivos con el 18,5% y el cáncer de pulmón con 11,6%.

*Consultas a Cuidados Paliativos:* El 28,3% de los pacientes oncológicos había realizado alguna consulta al equipo de Cuidados Paliativos del IDIM.

En este período se desconocen los datos del seguimiento y evolución hasta el fallecimiento en un 72% aproximadamente de los pacientes que no han sido derivados al servicio de CP. Esta falta de datos se debe a múltiples razones como por ejemplo: falta de atención integral, falta de registros, falta de adherencias a los seguimientos, discontinuidad de la atención por la progresión de la enfermedad oncológica, derivaciones a otras instituciones, fallecimientos en domicilio sin seguimiento profesional, etc.

**Etapas 3: Resultados preliminares del estudio**

Los resultados son parciales, considerando la muestra obtenida entre el 01.07.2014 y el 31.05.2015 (estudio en curso). Se identificaron 291 pacientes con diagnóstico de enfermedad oncológica. La cantidad de entrevistas realizadas hasta el momento presente informe fue de 50. De los 291 pacientes identificados, 79,7% (n232) se encontraban de manera ambulatoria.

*Datos demográficos:* 66,3% (n193) son mujeres. La mediana de todos los pacientes se encuentra en 77 años (21:99). Los porcentajes de sexo y edad, no se modifican entre pacientes NECPAL + y -.

*Diagnóstico primario:* Al igual que en la situación basal, se detectó un elevado porcentaje de pacientes con cáncer de mama (35,7%; 104 casos). En segundo lugar se encuentran los tumores digestivos con el 18,2%(n53), seguido de los tumores pulmonares con el 10% (n29). Del total de la población oncológica, un 21% (n61) en estadio IV. Por último se resalta la presencia de un 4,5% (n13) de tumores oncohematológicos.

*Pacientes según niveles de Necesidades Paliativas:* (Ver Gráfico 1)

*Criterios de severidad de enfermedad oncológica:* N:153 pacientes NECPAL+ (Ver Tabla 1)

*Indicadores de severidad y fragilidad para pacientes NECPAL +:* (Tabla 2)

*Elección/Demanda de Atención Paliativa:* N:153 pacientes NECPAL +. (Tabla 3)

*Seguimiento por CP:* De los 153 pacientes detectados como NECPAL +, 138 (90,2%) tuvieron seguimiento por el equipo de CP durante este año. Este porcentaje se encuentra en un 47% si tomamos como base a los 291 pacientes oncológicos analizados.

*Tiempo de seguimiento por CP:* de los 138 pacientes conocidos por CP, se observó que un 18,8% (n26) tuvo un seguimiento menor a un mes, un 28,3% (n39) un seguimiento entre 1 y 3 meses, un 31,9% (n44) entre 4 meses y un año y por último se observa un grupo de 21% de los pacientes con un seguimiento mayor a un año. La media de seguimiento se encontró en los 8 meses. Obsérvese que se están incluyendo pacientes que ya estaban en seguimiento por CP desde una fecha previa al estudio.

*Fallecimiento:* Se constató la muerte de 84 pacientes identificados como NECPAL + hasta la fecha 31/05/2015. De ellos, en 50 (59,4%) pacientes se utilizó la secuencia de cuidados de calidad de Últimos días de vida, PAMPA (Programa asistencial multidisciplinario Pallium).

*Seguimiento por equipo de CP Domiciliarios Pallium:* hasta la actualidad ingresaron 21 pacientes (13,8% de los 153 pacientes NECPAL +). De ellos 14 pacientes fallecieron y 7 se encuentran actualmente en seguimiento.

*Probabilidad de supervivencia de los pacientes NECPAL +. Curva de Kaplan-Meier:* desde la fecha de identificación hasta el fallecimiento o 30/05/2015. (Gráfico 2)

Los resultados muestran que, durante el primer mes de seguimiento, la probabilidad de supervivencia se reduce a aproximadamente 70%. Como puede observarse, en este período de tiempo se produce la mayor caída en las probabilidades de supervivencia, mientras que en los meses sucesivos las caídas en las probabilidades de sobrevivir son más graduales. En el mes 4, la probabilidad de supervivencia se reduce al 50%. Esto significa que en ese momento, la mitad de los pacientes fallecieron.

En los meses subsiguientes la posibilidad de sobrevivir sigue disminuyendo progresivamente, hasta llegar al mes 8, en donde la probabilidad cae al 36%, manteniéndose este valor hacia el final del período de seguimiento (mes 12). Desde otro punto de vista, vale decir que al mes 12 el 36% de los pacientes "NECPAL positivos" analizados permanecían vivos.

Para el cierre de este proyecto (2016) se está redactando un documento titulado "Modelo de Atención Paliativa" (MAP). Este documento resume las medidas prácticas para la implementación de un Modelo asistencial integral para pacientes con enfermedades oncológicas avanzadas y necesidades de atención paliativa, aplicable a programas sanitarios. Dicho modelo se encuentra basado en el Modelo de Atención Paliativa del Observatorio Quality, Centro Colaborador de la OMS para Programas Públicos del Instituto Catalá de Oncología.[14] Incorpora misión, visión, valores, objetivos y recomendaciones prácticas para la implementación de calidad del MAP.

#### **Etapas 4: Evaluación de estructura.**

Se tomó para el análisis de los indicadores propuestos de calidad, el panel de indicadores desarrollado por el Instituto Nacional del Cáncer en un estudio multicéntrico (en prensa Beca Carrillo Oñativia 2015).[15] Se cumplió con el 100% de los siguientes indicadores de estructura macro tanto en el equipo Pallium como en el IDIM: uso de guías de atención, historia clínica única e interdisciplinaria, equipo interdisciplinario definido de acuerdo a las normas del Ministerio de Salud de la Nación, servicio de CP integrado al organigrama del hospital, espacio físico propio para el equipo de CP, reuniones periódicas interdisciplinarias, supervisión externa de prevención de burnout, formación continua de todos los miembros del equipo, realización de actividades docentes y de investigación, uso de sistema de referencia y contra referencia.

Cabe recordar que los resultados son parciales, estando aún el estudio en marcha.

#### **DISCUSIÓN**

El IDIM asiste a una población mayoritariamente de más de 65 años, debido a la cobertura de PAMI. De allí las características demográficas de la población estudiada, predominantemente mujeres añosas (mediana 75 años). A su vez conlleva una alta prevalencia de comorbilidades y distintos criterios de fragilidad, con una complejidad mayor en la atención y seguimiento de los pacientes. Se trata de pacientes considerados NECPAL+ con marcado deterioro funcional, nutricional e indicadores de enfermedad oncológica avanzada en un 95,4% (n153). Los beneficios del tratamiento del cáncer son más limitados en individuos ancianos, debido a la reducción de la esperanza de vida y el aumento del riesgo de complicaciones por efectos secundarios. Los CP tempranos son claramente deseables para pacientes con alto riesgo de tener complicaciones por el tratamiento y para quienes la expectativa de vida sin cáncer es tanta o más corta que la expectativa de vida con el cáncer.[16]

Como se puede observar en los resultados, la distribución de sitios de tumor para el diagnóstico primario es similar a las estadísticas publicadas por el Instituto Nacional del Cáncer, MSN: mama, pulmón y colorrectal en orden de prevalencia.[2] Cabe mencionar que la realización de las entrevistas a otras especialidades que asisten estos pacientes además de los oncólogos (urólogos, ginecólogos, hematólogos) fue de accesibilidad variable. Estamos considerando por tanto, no a toda la población oncológica, sino a la que resultó accesible a la investigación.

Se observa una tendencia creciente, entre el porcentaje de seguimiento por el equipo de CP durante la situación basal (28,3%), es decir, previo a la presentación del Programa NECPAL e inicio de las entrevistas (etapa 2), y el seguimiento posterior (47,4% sobre el total de pacientes). En la situación basal se observa un número considerablemente inferior a las estimaciones de necesidades de AP poblacionales realizadas por diversos autores, las que se encuentran entre un 55 % y un 75%, según el estudio considerado. Observando el total de pacientes con enfermedad avanzada y detección de necesidades paliativas por el Instrumento NECPAL, el porcentaje de seguimiento por CP aumenta a

90%, teniendo en cuenta que se trata de pacientes oncológicos avanzados y añosos.[12,17,18] El tiempo de seguimiento por el equipo CP varía, hallándose un 32% de los pacientes con seguimientos de entre 4 y 12 meses. Esto favorece una inserción más oportuna e integral de la AP.

La implementación del programa y la presencia de la investigadora para la identificación de los pacientes NECPAL + podría haber generado un impacto catalizador de concientización sobre el concepto de AP por parte de los profesionales entrevistados. Esto probablemente significó derivaciones más tempranas que las habituales hasta la fecha, consolidando el reconocimiento al equipo de CP y favoreciendo una atención más integral de los pacientes.

Es notable que una proporción de pacientes presentó diagnóstico de enfermedad oncohematológica (4.5%). Se encontró dificultad en valorar a estos pacientes con el instrumento NECPAL CCOMS-ICO©, al igual que la experiencia en Cataluña y coincidiendo con otras herramientas pronósticas, diseñadas principalmente para tumores sólidos.[19]

Otro dato relevante a observar es que del total de pacientes fallecidos, 61% fue cuidado en los últimos días de vida con la secuencia PAMPA. Ésta es una herramienta de calidad que se está implementando en muy pocas instituciones de la Argentina (cuatro). El PAMPA es parte del Modelo de Atención Paliativa propuesto, para una mejora en la calidad de atención.

Luxardo y col expresa que hasta el 90% de personas con enfermedades avanzadas en etapa terminal pasa la mayor parte del tiempo de su último año de vida en sus hogares pero sólo el 10% de la atención de una persona queda en manos del sistema de salud formal del país.[20] En nuestro Proyecto NECPAL el 13,8% de los pacientes NECPAL + pudieron recibir atención en su domicilio durante aproximadamente 2 meses (mediana). Hay que considerar que al momento de este informe hay pacientes que siguen en seguimiento domiciliario (33%). Algunas de las causas relevadas que impidieron la derivación a Pallium para seguimiento en domicilio fueron: la residencia fuera de la Ciudad de Buenos Aires; la imposibilidad de organizar una red de cuidado en domicilio por falta de recursos económicos o humanos, la incorporación de los pacientes en el último mes de vida (18%). A pesar de dichas causas, sería interesante evaluar otras opciones de seguimiento del tipo de internación domiciliaria o ingresos en instituciones geriátricas.

El proyecto se está desarrollando según el cronograma previsto y esperamos poder presentar el MAP y los resultados de prevalencia y análisis estadísticos de supervivencia en 2016.

**ANEXO**

Figura 1: Clasificación de pacientes según niveles de necesidades AP.

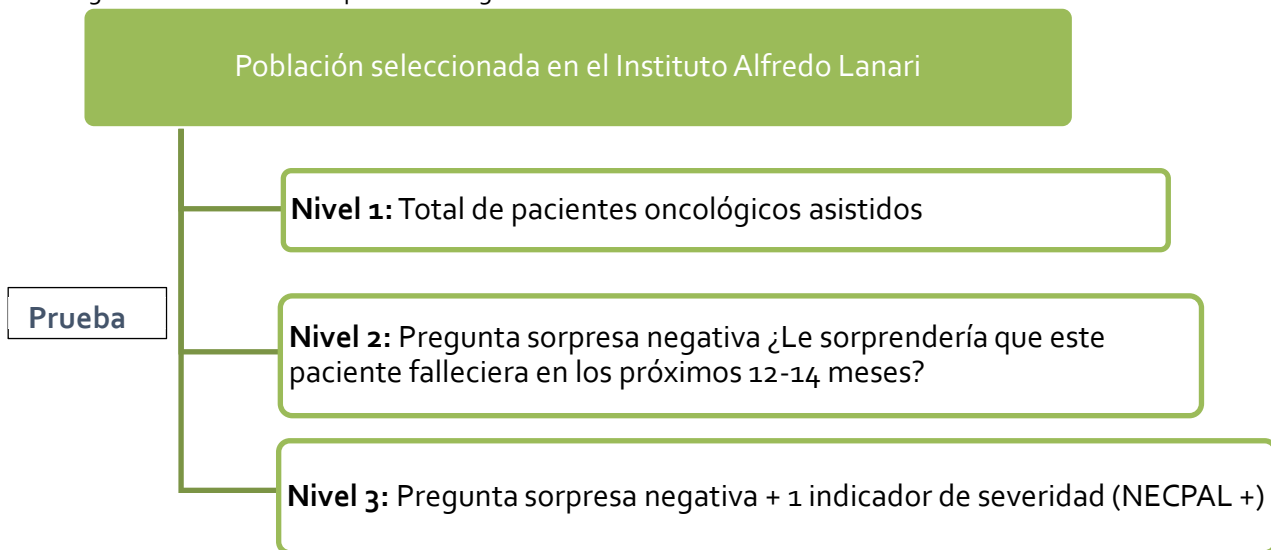


Gráfico 1: Porcentaje de pacientes según niveles de Necesidades Paliativas

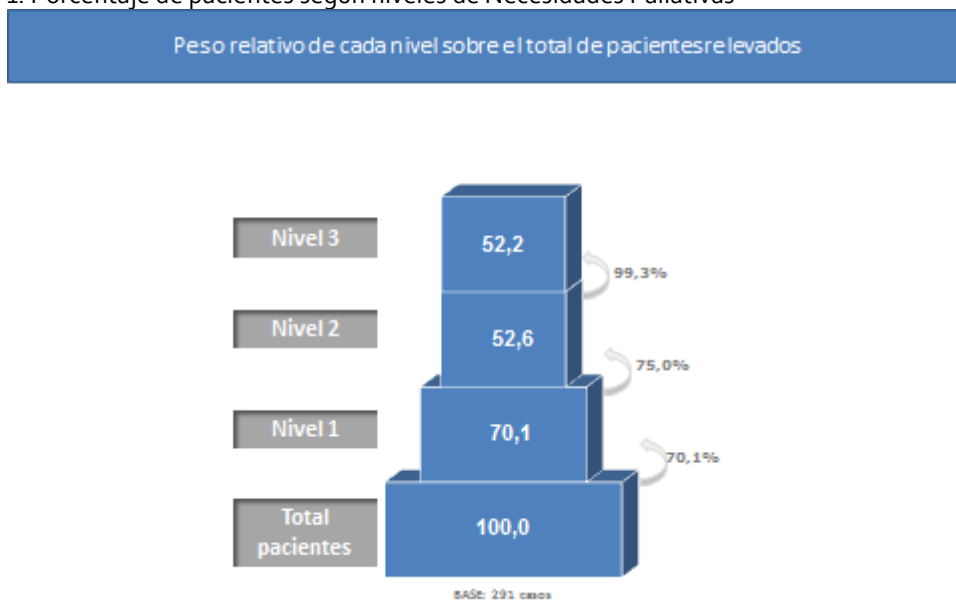


Tabla 1: Identificación de criterios de severidad oncológica

	N 153	%
<b>Diagnóstico confirmado de cáncer metastásico (estadio IV) y, en algunos casos, en estadio III que presenten:</b>	141	92,2%
➤ Escasa respuesta o contraindicación a tratamiento específico	84	54,9%
➤ Brote evolutivo en transcurso de tratamiento	33	21,6%
➤ Afectación metastásica de órganos vitales	50	32,7%
<b>Deterioro funcional significativo (PPS&lt;50%)</b>	71	46,4%
<b>Síntomas persistentes mal controlados o refractarios a pesar de optimizar tratamiento específico</b>	46	30,1%

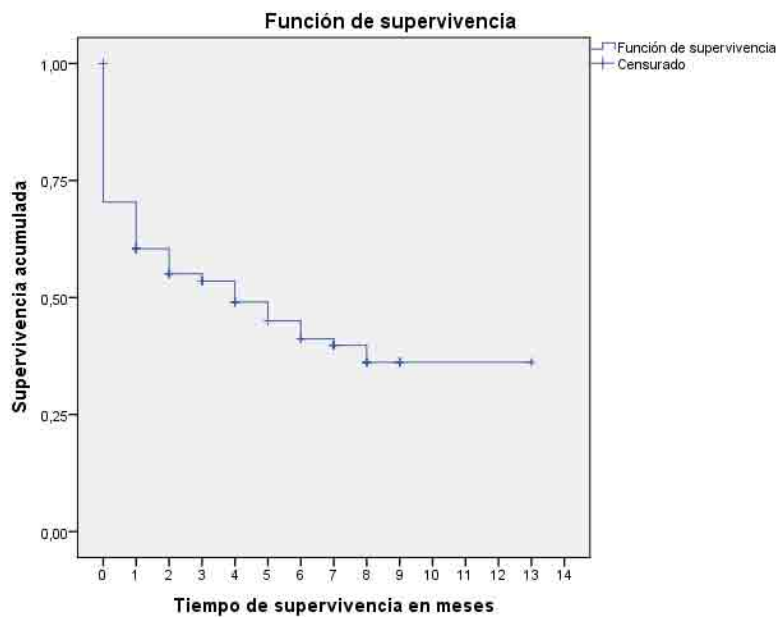
Tabla 2: Indicadores de severidad y fragilidad para pacientes NECPAL+

Indicador NECPAL	Presente	N 153	%
Indicadores nutricionales	Si	82	53,6%
Indicadores funcionales	Si	104	68,0%
Otros Indicadores Clínicos	Si	16	10,5%
Indicador psicológico	Si	92	60,1%
Indicador enfermedad oncológica	Si	146	95,4%

Tabla 3: Elección/Demanda de Atención Paliativa según paciente, familia y profesional.

		n	%
Demanda de atención paliativa por parte del paciente	Explícitamente	39	25,5%
	Implícitamente	21	13,7%
	No	93	60,8%
Demanda de atención paliativa por parte de la familia	Explícitamente	61	39,9%
	Implícitamente	16	10,5%
	No	76	49,7%
Necesidad de atención paliativa según el profesional	Sí	143	93,5%
	No	10	6,5%

Gráfico 2: Probabilidad de Supervivencia de pacientes NECPAL+. Curva de Kaplan-Meier.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The Boston Consulting Group. Informe cronos: hacia el cambio de paradigma en la atención a enfermos crónicos. 2014 Apr.
2. United Nations. World Population Prospects: The 2012 Revision, Highlights and Advance Tables. New York: Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2013.
3. Ministerio de Salud de la Nación. Indicadores básicos. Argentina: Ministerio de Salud 2014. 11
4. Ministerio de Salud de la Nación. Estadísticas Vitales, Información básica Año 2013. Argentina: Ministerio de Salud 2014. 57(5).
5. Instituto Nacional del Cáncer. Estadísticas: Análisis de la situación del cáncer en Argentina. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>.
6. Murray SA, Kendall M, Boyd K. Illness trajectories and palliative care. *BMJ* 2005;330:1007-11.
7. Mazanec P, Daly BJ, Pitorak EF. A new model of palliative care for oncology patients with advanced disease. *Journal of Hospice & Palliative Nursing* 2009; 11:324-31.
8. Temel JS, Greer JA, Muzikansky A, Gallagher ER, Admane S, Jackson VA, et al. Early Palliative Care for Patients with Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:733-42.
9. Dalgaard KM, Bergenholtz H, Nielsen ME, Timm H. Early integration of palliative care in hospitals: A systematic review on methods, barriers, and outcome. *Palliative and Supportive Care* 2014; 12:495-513.
10. O'Callaghan A, Laking G, Frey R, Robinson J, Gott M. Can we predict which hospitalized patients are in their last year of life? A prospective cross-sectional study of the Gold Standards Framework Prognostic Indicator Guidance as a screening tool in the acute hospital setting. *Palliative Medicine* 2014 May; 1-7.
11. Gómez-Batiste X, Martínez-Muñoz M, Blay C, Amblàs J, Vila L, Costa X, et al. Prevalence and characteristics of patients with advanced chronic conditions in need of palliative care in the general population: A cross-sectional study. *Palliat Med* 2014 Apr;28(4):302-11.
12. Murtagh F, Bausewein C, Verne J, Groeneveld EI, Kaloki Y, Higginson IJ. How many people need palliative care? A study developing and comparing methods for population-based estimates. *Palliat Med* 2014 Jan;28(1):49-58.
13. Gómez Batiste X, Martínez Muñoz M, Blay C, Amblàs J, Vila L, Costa X. Proyecto NECPAL CCOMS-ICO®: Identificación y Atención Integral-Integrada de Personas con Enfermedades Crónicas Avanzadas en servicios de salud y sociales. Centro colaborador de la OMS para programas públicos de Cuidados Paliativos. Institut Català d'Oncologia. Disponible en: <http://www.icongologia.net>.
14. Gómez-Batiste X, Espinosa J, Martínez Muñoz M, Puigdollers M, Rohlfes I, Amblas J, et al. Recomendaciones prácticas para la identificación y mejora de la atención a personas con enfermedades crónicas avanzadas y necesidad de atención paliativa en territorios y servicios de salud y social. Centro colaborador de la OMS para programas públicos de Cuidados Paliativos. Institut Català d'Oncologia. Disponible en: <http://ico.gencat.cat>
15. Jacob G, Jury G, Ceschini N, Minatel M, Cardozo E, Berenguer C, et al. Desarrollo de un panel de indicadores de calidad para evaluar los servicios de cuidados paliativos. En prensa 2015.
16. Brighi N, Balducci L, Biasco G. Cancer in the elderly: Is it time for palliative care in geriatric oncology?. *Journal of geriatric oncology* 2014;5:197-203.
17. Gómez-Batiste X, Martínez-Munoz M, Blay C. Identifying needs and improving palliative care of chronically ill patients: a community-oriented, population-based, public-health approach. *Curr Opin Support Palliat Care* 2012; 6(3): 371-378.
18. McNamara B, Rosenwax L, D'Arcy J, Holman. A Method for Defining and Estimating the Palliative Care Population. *J Pain Symptom Management* 2006 Jul;32(1):5-12.
19. Forcano García M, Quilez Salas N, Vial Escolano R, Solsona Fernández S, González García P. Predicción de supervivencia en el paciente con cáncer avanzado. *Med Paliat* 2015;22(3):106-116.
20. Luxardo N. Morir en casa. Buenos Aires: Biblos. 2010.

## ATENCIÓN EN SERVICIOS DE SALUD PÚBLICOS Y PRIVADOS DEL CÁNCER DE MAMA, IMPLICANCIAS SOBRE EL DIAGNÓSTICO PRECOZ

Andrea Palazzo

Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara". Anlis- Malbrán.

Directora: Marta Vacchino

### RESUMEN

**Introducción:** En Argentina el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres y el de mayor incidencia. Se han observado diferencias según acceso a servicios de salud, detección temprana, bajo nivel socioeconómico y educativo.

**Objetivos:** Determinar si existen diferencias clínico-epidemiológicas al momento del diagnóstico en las mujeres con cáncer de mama según subsector de salud, público (SP) y privado (SPRI), en el Partido de General Pueyrredón (PGP), Buenos Aires, año 2013.

**Material y Métodos:** Estudio transversal, correlacional. Población: casos incidentes de cáncer de mama infiltrante, año 2013 (PGP). Variables relevadas: subsector de atención, estadio clínico y edad al diagnóstico según distintas fuentes.

**Resultados:** Se identificaron 413 casos, 11,4% en SP y 88,6% en SPRI. En el SP se observó un riesgo de estadio avanzado al diagnóstico 4,4 veces mayor y un promedio de edad menor que en el SPRI.

**Discusión:** La mayor frecuencia de estadios avanzados en SP y menor media de edad podría estar relacionada con accesibilidad, menor nivel socioeconómica, entre otras.

**Conclusión:** Se plantea la necesidad de continuar con esta línea de investigación para conocer las desigualdades sociales que inciden sobre la atención del cáncer de mama a fin de reducir esta diferencia.

### ABSTRACT

**Introduction:** In Argentina, breast cancer is the first cause of cancer death in women and has the highest incidence. Differences were observed as access to health services, early detection, low socioeconomic and educational level.

**Objectives:** To determine if there are clinical and epidemiological differences at diagnosis in women with breast cancer by health care services sector, public (SP) and private (SPRI), in Partido de General Pueyrredón (PGP), Buenos Aires, 2013.

**Material and methods:** Transversal, correlational study. Population: incident cases of invasive breast cancer, 2013 (PGP). Surveyed variables: health care services sector, clinical stage and age at diagnosis according to different sources.

**Results:** We identified 413 cases, 11.4 % in SP and 88.6 % in SPRI. In the SP a risk of advanced stage at diagnosis was observed 4.4 times greater and a lower average age than in the SPRI.

**Discussion:** The more frequent in advanced stages SP and lower average age could be related to accessibility, lower socioeconomic level, among others.

**Conclusion:** The need arises to continue this line of research to understand the social inequalities that affect the care of breast cancer to reduce this difference

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el cáncer de mayor frecuencia y la principal causa de muerte en mujeres. Además, representa la primera causa de muerte, sobre todas las causas, en el grupo etario entre 15 a 40 años [1]. Más de la mitad de las muertes por este tipo de cáncer ocurren en países de bajos o medianos ingresos, con tasas de mortalidad que varían ampliamente entre las diferentes regiones. En América del Sur la tasa de mortalidad ajustada por edad (TEM) osciló entre un mínimo de 7,24 defunciones cada



100.000 mujeres en Bolivia y un máximo de 22,7 muertes cada 100.000 mujeres en Uruguay. Argentina se ubicó después de Uruguay, con una TEM de 19,9 muertes cada 100.000 mujeres [2].

Analizando la distribución de la tasa de mortalidad por cáncer de mama según diferentes regiones geográficas de Argentina, la ciudad de Buenos Aires (provincia de Buenos Aires) y la Región de Cuyo son las que presentan las mayores tasas con 28 y 24,1 defunciones por cada 100.000 mujeres, respectivamente[3]. Teniendo en cuenta la distribución de esta tasa según grupos de edad, se observa que los valores presentan un marcado aumento a partir de los 40 años. El 52% de las defunciones por cáncer de mama se producen en las mujeres entre 50 y 74 años y los picos máximos se presentan en los 55 y 70 años[7].

El cáncer de mama representa en nuestro país, según estimaciones de la IARC, al cáncer de mayor incidencia en mujeres con una tasa ajustada por edad de 74 casos por cada 100.000 mujeres[1].

En Argentina existe una asociación entre menor nivel socioeconómico (mayores índices de Necesidades Básicas Insatisfechas- NBI) y falta de cobertura privada de la salud debido en gran parte a falta de trabajo estable, que implica carecer de obra social o cobertura de salud por empresas de medicina prepagas). Por este motivo se considera que aquellas mujeres atendidas en hospitales públicos tienen mayores probabilidades de tener menor nivel socioeconómico que aquéllas atendidas en el subsector privado[3].

El mayor riesgo para el desarrollo de cáncer de mama en países pobres y de ingresos medios se relaciona en parte con patrones reproductivos, nutricionales, fecundidad y estilos de vida. Estos factores están enraizados en complejas estructuras socioeconómicas y culturales, por lo que son muy difíciles de modificar y requieren de mucho tiempo para poder transformarlos. Existen otros factores que explican las diferencias observadas en la mortalidad entre distintas regiones, que se relacionan más con la supervivencia de las mujeres con cáncer y son las diferencias en el acceso a los servicios de salud, a la tecnología para la detección temprana y la oferta de servicios de calidad para el tratamiento oportuno y adecuado[4,5,6,7].

La evaluación de la mortalidad por cáncer según nivel socioeconómico permite a los servicios de salud evaluar hipótesis sobre sus determinantes, y mejorar programas e intervenciones. En aquellos estudios realizados sobre diferencias en la supervivencia por cáncer en diferentes grupos socioeconómicos se ha observado un gradiente de clase social en las muertes por cáncer y se ha sugerido como explicación a esto el estadio y el diagnóstico. El bajo nivel socioeconómico y educativo, está asociado con un incremento en la demora para la primera consulta principalmente para los cánceres de mama y colorrectal [5,8]. En los países con menor desarrollo, así como en las regiones con peores indicadores socioeconómicos uno de los factores que más limita las posibilidades de supervivencia de las mujeres con diagnóstico de cáncer de mama es la falta de articulación entre el proceso de detección, el diagnóstico y el circuito terapéutico [4,7,9].

La detección del cáncer de mama en su etapa inicial, por medio de las lesiones no palpables, se va incrementando por el aumento de la capacidad de resolución de los métodos de diagnóstico por imágenes. Estas lesiones se presentan bajo el aspecto de microcalcificaciones o de imágenes sin calcio, como nódulos o densidades asimétricas y se describen según la clasificación de *Breast Imaging Reporting And Data System* (BIRADS). Luego de establecido el diagnóstico presuntivo o definitivo de cáncer se debe definir su estadio. Para este tipo de cáncer se reconocen 5 estadios posibles y subestadios, según sea el tamaño del tumor, estén afectados o no ganglios linfáticos (metastásis en ganglios linfáticos) o el tumor haya invadido otros órganos (metástasis): 0 (*in situ*), I, II (IIA y IIB), III (IIIA, IIIB y IIIC) y IV[10].

Existe una clara relación entre el pronóstico y el volumen del tumor al momento del diagnóstico. Las tasas de curación para los tumores menores de 2 cm superan el 80%. Asimismo, el diagnóstico de tumores más pequeños, permite potencialmente aplicar tratamientos menos agresivos, por lo que se necesitarían menos mastectomías y quimioterapias. Las chances de curación de las mujeres con cáncer de mama en estadios 0 y I superan el 90%, para el estadio II rondan el 75%, mientras que para el estadio III se reducen a un 30%. Las pacientes con tumores metastásicos (estadio IV) tienen una supervivencia mediana de 24 meses con amplias variaciones, según la biología de la enfermedad. Por lo que, la variable "estadio al diagnóstico" es crítica a la hora de establecer un programa que tenga como objetivo reducir la mortalidad por esta enfermedad. Además, otros factores que influyen claramente en el pronóstico tienen que ver con la histología del tumor, perfil inmunohistoquímico y características propias de la paciente[11,12,13].

En Argentina el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, pese a ser una patología detectable precozmente por métodos de screening sencillos y de bajo costo de implementación y cuyo pronóstico principalmente depende del estadio en que se realice dicha detección. Esta patología se relaciona así, con estilos de vida socialmente determinados, con la atención de la salud y las políticas sanitarias que afectan su evolución y sobrevida.

En nuestro país no se encontraron muchos estudios publicados sobre estadio de cáncer de mama al momento del diagnóstico y su relación con variables socioeconómicas. Según Juárez en 2009, para el período 1998-2003 en un estudio realizado en cuatro hospitales públicos de la provincia de Córdoba, observó que la patología mamaria que llega espontáneamente a los hospitales públicos, lo hace generalmente en estadios avanzados. Este mismo autor, encontró que del total de mujeres con cáncer de mama en el grupo etario menor o igual a 45 años el 71% fue diagnosticada tardíamente [14].

El Partido de General Pueyrredón (PGP) se encuentra en la región sudeste de la Provincia de Buenos Aires. Según datos del Censo 2010 cuenta con 618.989 habitantes, 295.294 varones y 323.695 mujeres, con un índice de masculinidad del 91,2%. La ciudad cabecera es Mar del Plata, que concentra el 95,2% de la población. La población del PGP cuenta con un alto porcentaje de población mayor de 65 años, que representa el 14,25% sobre el total. Este porcentaje es mayor que el promedio de la provincia de Buenos Aires (10,7%), siendo uno de los partidos con una estructura poblacional más envejecida. Según datos del Censo 2010 un 4,7% (9.795 hogares) de los hogares presentó al menos un indicador NBI [15]. Se estimó que en el año 2013 que el 76,24% de la población del PGP poseía algún tipo de cobertura privada de salud (obra social, sindical o prepaga). Al discriminar por sexo, el porcentaje de varones sin cobertura privada fue discretamente superior al de las mujeres (26,18% y 22,58% respectivamente)[16]. El Sistema de Salud está integrado por el sector público que absorbe aproximadamente alrededor del 24% de la población y el sector privado integrado por empresas de medicina prepaga y Obras Sociales. En relación a la atención oncológica de adultos en el sector público funciona un hospital general de alta complejidad (Hospital Interzonal General de Agudos "Dr. Oscar Alende" -HIGA-). En el sector privado la atención del cáncer de mama se realiza principalmente en 10 establecimientos privados con internación, 2 centros oncológicos ambulatorios, 2 centros de radioterapia y varios laboratorios de anatomía patológica.

En el Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara" comenzó a funcionar en el año 2013 el Registro de Cáncer de Base Poblacional del PGP (RCBP-PGP) siguiendo las normativas de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC). A partir del desarrollo de este registro comenzaron a estar disponibles datos locales y actualizados sobre incidencia del cáncer de mama. Debido a la gran cantidad de tiempo y trabajo que insumiría revisar todas las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico de cáncer, la IARC sugiere a los RCBP de reciente inicio priorizar la recolección de datos propios del paciente y del tumor (principalmente topografía y morfología) con el propósito de optimizar la exhaustividad y validez de la información [17]. Por este motivo, al igual que la mayoría de los registros de cáncer del país, en el RCBP-PGP no se recolecta de manera rutinaria información sobre el estadio clínico al momento del diagnóstico.

Sin embargo, para la Salud Pública esta información es de gran utilidad, tanto para detectar diferencias respecto a la accesibilidad en la atención médica brindada por los subsectores públicos y privados de salud como para tener un acercamiento a la medición del impacto de las políticas de salud que están siendo implementadas a niveles municipales, provinciales y nacionales. También representa una contribución para una mejor gestión de recursos y definición de prioridades programáticas para el control de cáncer de mama. Así, el objetivo de este trabajo fue: determinar si existen diferencias clínico-epidemiológicas al momento del diagnóstico en las mujeres con cáncer de mama según se atiendan en el subsector público y privado de la salud en el PGP durante el año 2013.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Estudio transversal, correlacional. Se incluyeron todos los casos incidentes de cáncer de mama diagnosticados durante el año 2013 en mujeres residentes en el Partido de General Pueyrredón (PGP). Se excluyeron los carcinomas *in situ*.

A partir de los casos de cáncer de mama identificados por el Registro de Cáncer del PGP se investigaron distintas fuentes (Historias Clínicas, libros de cirugía y entrevistas con oncólogos y

ginecólogos según fuera necesario). Se relevaron las variables estadio clínico al diagnóstico, edad de la paciente (años cumplidos al diagnóstico) y sector de atención.

El estadio al diagnóstico fue definido según normas de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), considerando la extensión del tumor, grado de diseminación a los ganglios linfáticos y presencia de metástasis distantes (TNM). Se agruparon los estadios como: temprano (estadios I y IIA), y avanzado (estadios IIB, III y IV) [10].

Los sectores de atención se agruparon en público y privado. Se consideró que al ser el HIGA el único hospital de adultos de alta complejidad de la región, asiste a casi la totalidad de las mujeres que carecen de cobertura privada de la salud, especialmente en atención de patología oncológica que requiere de estudios y procedimientos de complejidad y se asume que los casos de cáncer de mama registrados en este establecimiento representan adecuadamente la población mayor de 15 años (con esta patología) perteneciente al sector público. El resto de los prestadores se incluyeron en el sector privado.

Se calcularon tasas de incidencia brutas para el PGP, para el sector público y privado correspondientes al período estudiado.

Se realizó estandarización de tasas según el método directo para PGP (utilizando como estándar la población mundial).

Se calculó Razón Estandarizada de Incidencia (REI)[18] para los sectores público y privado, usando método indirecto (aconsejado para pequeñas poblaciones o baja frecuencia de eventos), calculando los casos esperados tomando como referencia la tasa de incidencia estandarizada del Partido de General Pueyrredón correspondiente al año 2013.

La población según edad del sector público y privado se obtuvo de la encuesta permanente de hogares para el año 2012 (promedio de los 4 trimestres anuales)[16]. Se consideró como perteneciente al sector público aquella población sin cobertura privada de salud y como sector privado a la población que posee esta cobertura.

Se ajustó un modelo de regresión logística para analizar la relación entre estadio clínico al diagnóstico y sector de atención, utilizando como variable dependiente el estadio al diagnóstico (avanzado -temprano, categorizados 1 y 0 respectivamente) y sector de atención (público-privado, categorizados como 1 y 0 respectivamente), controlando por la variable edad al diagnóstico de las pacientes.

Para el análisis de los datos se utilizó software libre: EpiInfo2000 y Epidat v3.1

## RESULTADOS

Se identificaron 413 casos de cáncer de mama durante el año 2013 en mujeres residentes en el Partido de General Pueyrredón. El 11,4% pertenecieron al sector público y el 88,6% provinieron del sector privado. En el sector público se tuvo acceso al 93,6% de las historias clínicas (HC) logrando estadificar todas ellas (3 HC no fueron halladas). En el sector privado (366 casos) se tuvo acceso al 65,3% (239/366) de las HC y se estadificó el 90,2% de estas. En el 34,7% (127/366) restante se identificó el establecimiento donde se realizó el diagnóstico pero no se logró acceder a la HC o datos sobre la estadificación y tratamiento de la paciente. En resumen se logró estadificar el 93,6% (44/47) de los casos identificados del sector público y el 58,2% (213/366) de los casos identificados en el sector privado, lo cual representó el 62,2% de todos los casos incidentes en el PGP (Tabla 1).

En el sector privado hubo un subgrupo de pacientes añosas (n=21) en las cuáles el diagnóstico se realizó mediante citología (Punción Aspiración con Aguja Fina de la mama -PAAF-). La media de edad para este grupo fue de 85,8 años (DS 8,1). Debido a la edad avanzada, enfermedades concomitantes, regular estado general, negativa de la paciente o familiares, pocas probabilidades de mejorar su calidad de vida, no se realizaron procedimientos invasivos para una estadificación completa. En este trabajo fueron consignadas como "punción/sin estadificar".

La tasa de incidencia bruta (TIB) de cáncer de mama para el PGP para el año 2013 fue de 125,0 casos cada 100 000 mujeres (IC<sub>95%</sub> 113,4-137,3) y la tasa de incidencia ajustada por edad (TEE) de 83,0 (IC<sub>95%</sub> 74,3-91,7). La TIB para el sector privado (141,7 casos cada 100.000 mujeres, IC<sub>95%</sub> 127,5-156,2) fue mayor que la del sector público (65,2 casos cada 100 000 mujeres IC<sub>95%</sub> 46,3-84,2).

En Tabla 2 se muestran las razones de incidencia estandarizada (RIE) para el sector público y privado, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En la Tabla 3 se observa que del total de casos estadificados (n=257) del PGP, la mayoría (63,0%) fueron estadios tempranos (I y IIA).

Al analizar la distribución de los estadios según sector de atención se observó para el sector público mayor frecuencia para los estadios más avanzados, prácticamente no se observó casos en estadio I. En el sector privado este estadio fue el más frecuentemente encontrado (Tabla 4) (Gráfico 1).

Al agrupar los casos de cáncer de mama en estadios tempranos (I y IIA) y estadios avanzados (IIB, III y IV) y estratificar por sector, se observó que el 65,9% y el 31,0% de las mujeres atendidas en el sector público y privado, respectivamente, presentan estadios avanzados.

Teniendo en cuenta la edad de las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama en el PGP durante el año 2013, la media (en años) para las diagnosticadas en el sector público fue menor que en el sector privado, 55,5 años (ds-13,7 años) y 62,7 años (ds-14,58 años), respectivamente. Encontrándose una diferencia significativa entre ambos sectores ( $p < 0,05$ ).

A partir del modelo de regresión logística, se observó que aquellas mujeres pertenecientes al sector público presentaron 4,4 veces el riesgo de presentar un estadio avanzado al momento del diagnóstico que las mujeres del sector privado, controlando por la edad. La edad no se asoció de manera significativa (Tabla 5).

Cuando se compararon las tasas de Incidencia ajustada por edad (TEE) de cáncer de mama de datos publicados por los diferentes registros de Argentina, se observó que la TEE del PGP para el año 2013 fue algo mayor que la estimada por la IARC de Argentina (año 2008). Además, fue comparable a la de Bahía Blanca y Córdoba, y algo menor que la de La Pampa y Santa Fe (Gráfico 2).

## DISCUSIÓN

Este trabajo representa el primer reporte epidemiológico sobre casos de cáncer de mama diagnosticados en el Partido de General Pueyrredón (PGP) y uno de los primeros trabajos de Argentina que aborda el estudio del cáncer de mama y su estadificación según sector de atención de la salud. Con la realización del mismo se pudo tener acceso a la información sobre edad y los estadios clínicos al momento del diagnóstico. Por otro lado, permitió poner de manifiesto la existencia de diferencias entre los sectores de atención de la salud público y privado.

La TEE de cáncer de mama del PGP fue similar a la calculada por el Registro de Cáncer de Base Poblacional-PGP para el año 2012 [19]. En cuanto a la comparación de TEE con datos de regiones del país que presentan similares características, la tasa del PGP fue comparable con otros registros, aunque debe tenerse en cuenta que los datos presentados corresponden solo al año 2013, mientras que para las demás regiones son datos correspondientes a períodos mínimos de cuatro años.

El porcentaje de mujeres con cáncer de mama atendidas en el sector público (11,6%) fue menor que el que cabría esperar según los datos de la EPH sobre mujeres sin cobertura privada de la salud (22,6%) [16]. Sin embargo, al discriminar este total de mujeres de la encuesta, por grupo etarios, se observa que aquellas mujeres mayores de 70 años son las que poseen mayor cobertura privada de salud, por lo que la diferencia observada podría deberse a que efectivamente las mujeres más grandes se atienden en el sector privado de la salud. Esto es coincidente con la diferencia de edad observada entre las mujeres del sector público y privado, aquellas del hospital público presentaron una menor edad que las del privado.

En cuanto al acceso a las historias clínicas (HC), se realizó la revisión de una gran proporción de los casos. En el sector público, solo quedaron tres HC que no fueron encontradas luego de realizar una búsqueda exhaustiva de las mismas. En el sector privado, se revisó un gran volumen de HC, sin embargo en aproximadamente un tercio de las mismas no se accedió a la revisión. En la mayoría se pudo establecer la procedencia de las pacientes, es decir, en qué institución se realizó el diagnóstico, pero durante la realización de este trabajo, surgió una situación particular en cuanto a dos instituciones privadas, una de ellas fue declarada judicialmente en quiebra, y posteriormente cerró su atención; mientras que la otra, sufrió una situación económica similar, aunque finalmente continuó con la atención. Por este motivo, no se pudo acceder a estas HC, perdiendo todo tipo de seguimiento de estas pacientes, ya que a pesar de conocer fehacientemente los médicos e instituciones tratantes, judicial y administrativamente fue restringido el acceso a todo dato de los pacientes.

Además, en el sector privado, se encontró un grupo de mujeres de edad avanzada consignadas como "punción/sin estadificar" en las que el diagnóstico de cáncer de mama, se les realizó por citología

(PAAF), estudios estadificadores mediante técnicas de diagnóstico por imágenes y por su status hormonal (receptor estrógeno) por inmunohistoquímica. De esta manera los médicos tratantes tomaron decisiones de tratamiento oportuno para cada una de estas mujeres, sin aplicar los técnicas invasivas (tumorectomía, cuadrantectomía, mastectomía con vaciamiento axilar ganglionar). Por otro lado, algunas de estas pacientes o sus familiares se negaron a esas técnicas teniendo en cuenta las pocas probabilidades de mejorar su calidad de vida. Cabe destacar que en la mujer anciana, el cáncer de mama posee características biológicas y clínicas diferentes a las de las mujeres más jóvenes. El curso de la enfermedad suele ser más indolente en las mujeres mayores, con tumores que expresan un perfil mucho más favorable y la observación clínica de estas pacientes indica que en ellas el cáncer evoluciona más lentamente y con menor agresividad desde el punto de vista biológico. Además, se sabe que las mujeres ancianas son menos propensas a morir de su cáncer de mama, sea cual sea su estadio clínico que las mujeres más jóvenes. Estudios previos demuestran que muchos protocolos para el cáncer de mama no son apropiados para aplicar a todas las mujeres de edad avanzada [20,21,22].

En el sector privado se observó también un pequeño número de casos cuya estadificación no pudo completarse debido a la negativa de las pacientes a continuar realizando el diagnóstico adecuado y estudios buscando secundarismos. Muchas de ellas tuvieron miedo o presentaron angustia frente al completo conocimiento de su diagnóstico.

Es difícil comparar la distribución según estadios observada debido a que en nuestro país no hay suficientes datos al respecto. Hace 10 años Hortobagyi y colaboradores sugirieron que en los países más pobres y en aquellos en vías de desarrollo más del 60% de los casos son diagnosticados en estadios avanzados (III y IV) [23]. En el presente trabajo se observó que el 24,9% de las pacientes presentaron el estadio III y IV al momento del diagnóstico, mientras que más del 60% de las mujeres se diagnosticaron tempranamente (estadio I y IIA).

Al estratificar por sector de atención se observó para el sector público algo similar a lo reportado por Juárez en 2009 en donde la patología mamaria que llega a los hospitales públicos, lo hace generalmente en estadios avanzados. Este autor encontró las siguientes frecuencias de estadios al momento del diagnóstico: estadio 0-I 27%, estadio II 32% y estadio III 28%, mientras en el presente trabajo se encontró más del 50% en estadio II (IIA y IIB) y 36,4% para el III. Agrupando por estadio, el avanzado superó el 65%. En relación a la edad de las pacientes, los datos reportados por Juárez, coinciden con lo hallado en este trabajo, las mujeres que se atienden en hospitales públicos son jóvenes [14].

Es importante destacar que las mujeres que se atienden en sector público presentaron mayor riesgo de ser diagnosticadas en estadios avanzados que aquellas que lo hacen en el sector privado, estas diferencias podrían ser explicadas por múltiples causas. Por un lado, este hecho podría deberse a que las mujeres sean provenientes de grupos socioeconómicos menos favorecidos, con menor nivel educativo o a las conductas de autocuidado que poseen. La Encuesta Nacional de Factores de Riesgo para el año 2009 observó una menor prevalencia de mujeres que se realizaron mamografía y *Papanicolaou* (PAP) en aquellas mujeres con peores indicadores socioeconómicos[24]. También existen factores relacionados con los servicios de salud, desde distintas dimensiones, que podrían estar actuando como barreras para la accesibilidad al diagnóstico precoz. Diversos autores han planteado la presencia de obstáculos a la atención de pacientes. Con respecto a esto, un estudio colombiano mostró inequidades en el tratamiento de cáncer de mama de acuerdo con el sistema de salud al cual pertenecían: las mujeres afiliadas al régimen subsidiado y las mujeres no afiliadas tuvieron importantes barreras de acceso por los desplazamientos, trámites administrativos y costos de los tratamientos. Por otro parte, se encuentran razones propias de la mujer que llevan a demorar en la primera consulta, como no consultar por no percibir la necesidad o por pensar que no es importante. También se añaden factores psicológicos y de falta de apoyo social [5, 9, 25, 26].

De acuerdo con los resultados de este trabajo se plantea la necesidad de continuar con esta línea de investigación tendiente a conocer las desigualdades sociales presentes en la atención del cáncer de mama, para identificar con mayor claridad cuáles son las variables que podrían estar explicando estas diferencias observadas como, barreras a la accesibilidad, menor nivel socioeconómico y menor nivel educativo. Como así también, es necesario debido a la importancia de contar con información sobre incidencia, estadio y sobrevida como herramientas para la planificación de políticas de salud pública y evaluación de impacto, orientados a facilitar el acceso equitativo al diagnóstico precoz y tratamiento oportuno.

## **CONCLUSIÓN**

Las Tasas de Incidencia Ajustadas por Edad según Población Mundial (TEE) encontradas en este trabajo fueron comparables a las publicadas por RCBP de provincias de la misma región de reconocida trayectoria.

Se logró conocer las características clínico-epidemiológicas de las mujeres con diagnóstico de cáncer de mama en casi la totalidad de las pacientes atendidas en el sector público y en la mayoría de las mujeres pertenecientes al sector privado. Se observó que el 63% de los cánceres de mama se diagnostican en estadios tempranos. Las pacientes provenientes del sector público fueron más jóvenes que aquéllas del sector privado. Sin embargo, al analizar según sector de atención se observó que, controlando por edad, las mujeres atendidas en el sector público tuvieron un riesgo 4 veces mayor de presentar al momento del diagnóstico un estadio avanzado que aquellas que se atendieron en el sector privado.

Se destaca la importancia de contar con información de base poblacional sobre desigualdades en relación al estadio al momento del diagnóstico del cáncer de mama en nuestro país.

## **RECOMENDACIONES**

Continuar explorando las causas que podrían estar actuando en estas desigualdades encontradas. Explorar las dimensiones de accesibilidad del sistema de salud, especialmente al diagnóstico precoz (disponibilidad de turnos, equipos, horarios, calidad de atención, circuito de referencia y contrarreferencia, demora en entrega de resultados), explorar cualitativamente los motivos por los que las mujeres con cánceres avanzados consultan tardíamente, si existen demoras en el primer nivel de atención para la derivación al especialista.

Seguir realizando estudios de base poblacional y profundizar estudios sobre desigualdades y cáncer.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Agency of Research on Cancer. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponible en: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) y en: <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>. Último ingreso [20/06/2015].
2. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Arrow Diagram. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2013. Disponible en: <http://vizhub.healthdata.org/irank/arrow.php>. último ingreso [22/06/2015].
3. Abriata, M.G. Análisis de Situación de Salud – Asis Cáncer en Argentina. 2011. Boletín de Vigilancia Epidemiológica del Instituto Nacional del Cáncer. Ministerio de Salud de la Nación. 2013; (1): 15-26.
4. Porter P. “Westernizing” women’s risks? Breast cancer in lower-income countries. N Engl J Med. 2008; 358:213-216.
5. Lozano-Ascencio R, Gómez-Dantés H, Lewis S, Torres-Sánchez L, López-Carrillo L. Tendencias del cáncer de mama en América Latina y el Caribe. Salud Pública Méx. 2009; 51(Suppl 2):147-156. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342009000800004&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000800004&lng=es). Ultimo acceso [04/07/2014]
6. Kogevinas M, Porta M. Socioeconomic differences in cancer survival: a review of the evidence. Social Inequalities and Cancer. Editado por Kogevinas N, Pearce N, Susser M, Boffeta P. International Agency for Research on Cancer (IARC) Scientific Publications.1997; (137): 178-182.
7. Lacey J, et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. 2009. BMC Cancer: 9-84.
8. Ramirez A, Westcombe A, Burgess C, Sutton S, et al. Factors predicting delayed presentation of symptomatic breast cancer: a systemic review. The Lancet. 1999; (353): 1127-1131.
9. Yip C, Smith R, Anderson B, et al. Guideline implementation for breast healthcare in low- and middleincome countries: early detection resource allocation. Cancer. 2008;113 (8):2244-2256.
10. Cancer Staging Manual. American Joint Committee on Cancer (AJCC). 6º Edición. 2002; (1):3-7.
11. Arrechea Irigoyen M, Vicente García F, Córdoba Iturriagaitia A, Ibáñez Beroiz B, Santamaría Martínez M, Guillén Grima F. Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. An. Sist. Sanit. Navarr. 2011; 34(2):219; 233.
12. Felipe Imigo G, Edgardo Mansilla S, Ignacio Delama G, Poblete M, Fonfach C. Clasificación molecular del cáncer de mama. Cuad. Cir. 2011; 25: 67-74.
13. Viniegra M, Paolino M, Arrossi S. Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. Informe final julio 2010: diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales. Organización Panamericana de la Salud. Instituto Nacional del Cáncer.
14. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/comunicacion/manuales-guias>. 2010; 15-43.
15. Juárez A. Edad y Estadio de las mujeres con cáncer de mama. Hospitales públicos. Córdoba 1998/2003. Resumen de tesis de la maestría en salud.
16. Revista de Salud Pública. Junio 2009; (XIII) 1: 33-42.
17. Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina.
18. INDEC. Base de datos Redatam. Disponible en: <http://www.indec.mecon.gov.ar/>
19. Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina. [Internet]. INDEC. Encuesta Permanente de Hogares (EPH). [citado 27 de mayo 2015]. Disponible en: [http://www.indec.gov.ar/cgibin/RpWebEngine.exe/PortalAction?&MODE=MAIN&BASE=EPH\\_BASE\\_FIN\\_AL&MAIN=WebServerMain.inl](http://www.indec.gov.ar/cgibin/RpWebEngine.exe/PortalAction?&MODE=MAIN&BASE=EPH_BASE_FIN_AL&MAIN=WebServerMain.inl)
20. Jensen O, Storm H. Purposes and uses of cancer registration. In Cancer Registration: Principles and Methods. Edited by Jensen O, Parkin D, MacLennan R, Muir C, Skeet R. IARC Scientific Publications No 95. 1991, Lyon,France: 7-21.
21. Szklo M, Nieto F. Epidemiología Intermedia: Conceptos y Aplicaciones. Capítulo 7: Estratificación y ajuste: Análisis multivariante en epidemiología. Ediciones Díaz de Santos S.A.Madrid, España. p235-236.
22. 1º Informe del Registro de Cáncer del Partido de General Pueyrredón. Datos presentados en: Jornada de Investigación. Hospital Interzonal General de Agudos “Dr. O. Alende”. Mar del Plata, Buenos Aires. Noviembre 2014.
23. Reed M, Wyld L. The role of surgery in the management of older women with breast cancer. Ejcancer. 2007; 43(15): 2253-2263.
24. Diab S, Elledge R, Clark G. Tumor Characteristics and Clinical Outcome of Elderly Women With Breast Cancer. Inci. 2000; 92(7): 550-556.

25. Balducci L, Extermann M. Management of Cancer in the Older Person:A Practical Approach. *The Oncologist*. 2000;5: 224-237.
26. Hortobagyi G, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis C, et. al. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clinical Breast Cancer*. 2005; 6: 391-401.
27. De Maio F, Linetzky B, Ferrante D. Changes in the social gradients for Pap smears and mammograms in Argentina: Evidence from 2005 and 2009 National Risk Factor Surveys. 2012. *Public Health*. 2012; 126(10):821-6.
28. Woods L, Rachet B, Coleman M. Origins of socio-economic inequalities in cancer survival: a review. *Ann Oncol*. 2006; 17(1): 5-19.
29. Piñeros M, Sánchez R, Perry F, García O, Ocampo R, Cendales R. Demoras en el diagnóstico y tratamiento de mujeres con cáncer de mama en Bogotá, Colombia. 2011. *Salud Pública mex*. 2011; 53 (6):478-485.



## ANEXO

**Tabla 1.** Casos de cáncer de mama estudiados según sector de atención, acceso a Historia Clínica y estadificación.

Casos identificados	SECTOR DE ATENCIÓN DE LA SALUD			
	Público (n=47)		Privado (n=366)	
	n	% sobre sector	n	% sobre sector
HC encontradas	44	93,6	239	65,3
Sin acceso a HC	3	6,4	127	34,7
Estadif. Clínica completa	44	93,6	213	58,2
Estadif. Clínica incompleta	0	0	5	1,4
Punción/sin estadificar	0	0	21	5,7

Referencias: HC: historias clínicas, n: número de casos, %: porcentaje

**Tabla 2.** Razón de Incidencia Estandarizada para sector público y privado para cáncer de mama en mujeres. Partido de General Pueyrredón, año 2013.

Sector de atención	RIE	IC 95%
Público	93,8	(67-120,6)
Privado	100,9	(90,53-111,2)

**Tabla 3.** Distribución de los estadios clínicos de los casos de cáncer de mama en el Partido de General Pueyrredón, año 2013.

Estadio clínico	n	%
I	90	35,0
IIA	72	28,0
IIB	31	12,1
IIIA	28	10,9
IIIB	11	4,3
IIIC	7	2,7
IV	18	7,0
Total	257	100,0

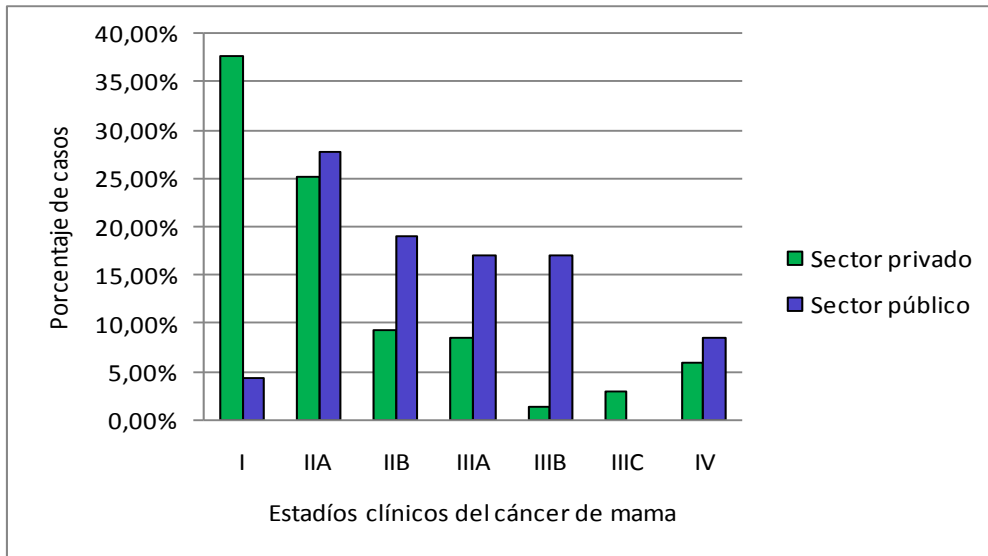
**Tabla 4.** Distribución de los estadios clínicos de los casos de cáncer de mama según sector de atención.

Estadio Clínico	SECTOR DE ATENCIÓN DE LA SALUD			
	Público (n=47)		Privado (n=366)	
	n	%	n	%
I	2	4,55	88	41,31
IIA	13	29,55	59	27,7
IIB	9	20,45	22	10,34
IIIA	8	18,18	20	9,39
IIIB	8	18,18	3	1,41
IIIC	0	0	7	3,27
IV	4	9,09	14	6,58
Total	44	100	213	100

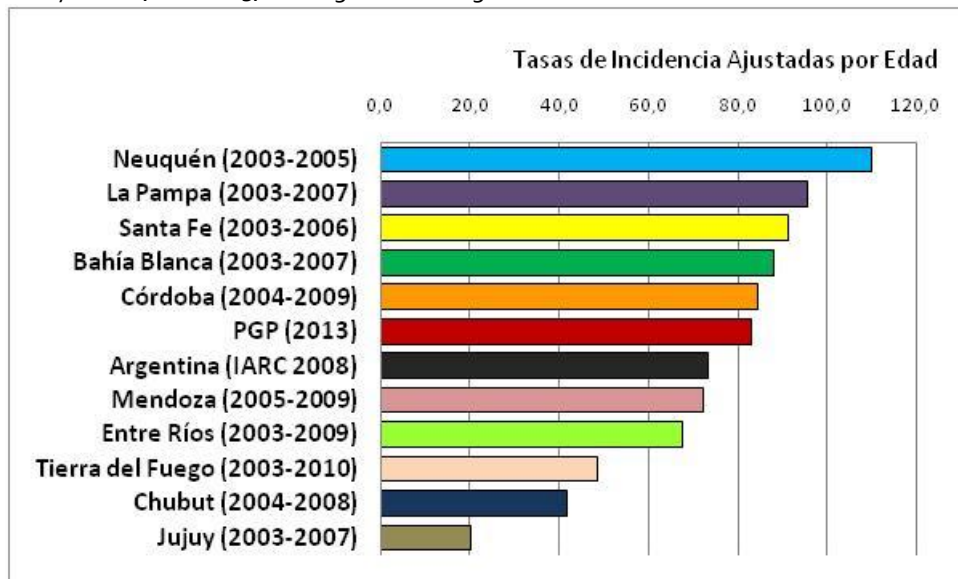
**Tabla 5.** Razones de “odds” estimadas según modelo de regresión logística.

Variable	OR	IC95%	P
Edad (en años)	1,001	(0,98-1,02)	0,84
Sector (Público/Privado)	4,4	(2,16-8,82)	0,001

**Gráfico 1.** Distribución por estadios clínicos de los casos de cáncer de mama según sector de atención de la salud.



**Gráfico 2.** Comparación de la Tasa de Incidencia (TEE) de cáncer de mama en mujeres del Partido de General Pueyrredón, año 2013, con registros de Argentina.



## LA DEPENDENCIA FUNCIONAL EN EL PACIENTE CON ENFERMEDAD ONCOLÓGICA DIGESTIVA Y LA PRESENCIA DE LOS SÍNTOMAS DE ANSIEDAD Y DEPRESIÓN

### ¿LA PÉRDIDA FUNCIONAL DURANTE LA INTERNACIÓN SE RELACIONA CON LA ANSIEDAD Y LA DEPRESIÓN EN PACIENTES CON CÁNCER?

Pilar Muñoz

Hospital de Gastroenterología Dr. Bonorino Udaondo (CABA)

Director: Gustavo de Simone

#### RESUMEN

**Objetivo:** Explorar si pacientes con enfermedad oncológica que deterioran su grado de independencia funcional durante la internación presentan incremento de los síntomas de ansiedad y depresión.

**Materiales y Métodos:** Muestra consecutiva de pacientes con cáncer internados en clínica médica del Hospital Udaondo entre el 01-07-2014 y el 30-04-2015. Se evaluó al ingreso y a los 7 días, estado funcional con el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), síntomas con Edmonton Symptom Assessment System (ESAS), independencia funcional con el Índice de Barthel, ansiedad y depresión con la escala HADS. Se utilizó el test del signo y coeficientes de correlación de Spearman.

**Resultados:** Se evaluaron 35 pacientes; edad mediana= 60 años. Al inicio, las medianas de las escalas fueron 2 para ECOG, 91 para Barthel, 6 para ansiedad (HADS), 5 para depresión (HADS) y 18 pacientes tenían al menos 2 puntos de dolor. La correlación entre Barthel y depresión inicial resultó significativa ( $r=-0,4323$ ;  $p= 0,0095$ ) pero no entre Barthel y ansiedad ( $r=-0,2422$ ;  $p= 0,1609$ ). A los 7 días, los pacientes disminuyeron el Barthel (mediana=-3;  $p=0,0378$ ), la ansiedad (mediana=-1;  $p=0,0494$ ) y el dolor ( $p=0,0262$ ) mejoraron, la depresión no se modificó.

**Conclusión:** Se observó disminución del estado funcional en los pacientes internados pero no se acompañó de aumento en la ansiedad ni la depresión. La ansiedad mejoró al 7º día a pesar del deterioro funcional lo que podría estar relacionado con la mejoría en los síntomas.

#### ABSTRACT

**Objective:** To explore whether patients with an oncologic illness, who became deteriorated in their functional independency condition during hospitalization show an increase of anxiety and depression symptoms.

**Materials and methods:** A consecutive sample of patients with cancer hospitalized in medical clinic at Udaondo Hospital between 01-07-2014 and 30-04-2015. At the moment of admission and at the seventh day of hospitalization the following was assessed: the functional condition with the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), symptoms with Symptom Assessment System (ESAS), functional independency with the Barthel Index, anxiety and depression with the HADS scale. Spearman's sign and correlation coefficient test.

**Results:** 35 patients, mean age 60 years old, were assessed. At the beginning, the scale medians were 2 for ECOG, 91 for Barthel, 6 for anxiety (HADS), 5 for depression (HADS) and 18 patients had at least 2 points of pain. The correlation between Barthel and the initial depression resulted significant ( $r=-0,4323$ ;  $p= 0,0095$ ) but it wasn't like that between Barthel and anxiety ( $r=-0,2422$ ;  $p= 0,1609$ ). At the seventh day, patients decreased Barthel (median=-3;  $p=0,0378$ ), anxiety (median=-1;  $p=0,0494$ ) and pain ( $p=0,0262$ ) improved, depression was not modified.

**Conclusion:** It was observed a decrease of the functional condition in patients hospitalized but this was not accompanied by an increase in anxiety or depression. Anxiety improved at the seventh day despite the functional deterioration, which could be related with an improvement of the symptoms.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud calcula que en 2005 murieron de cáncer 7,6 millones de personas y que en los próximos 10 años morirán 84 millones más si no se emprenden acciones. Más del 70% de todas las muertes por cáncer se produce en países con ingresos económicos bajos y medios, países donde los recursos disponibles para la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer son limitados o inexistentes [40].

En Argentina, en 2012 fallecieron 61.866 personas por cáncer. Los tumores malignos constituyen la principal causa de muerte entre los 40 y los 64 años, la segunda en los grupos de 5 a 39 años y de mayores de 64 años. Sin discriminar por sexos, el más frecuente fue el cáncer de pulmón, seguido por colon y recto; estómago y páncreas se encuentran entre los primeros diez a nivel nacional [19].

En general los pacientes con cáncer experimentan una pérdida de funcionalidad debido a la enfermedad, a las hospitalizaciones y a los tratamientos. Si la pérdida de autonomía se acentúa puede provocar pérdida de interés o placer en la mayoría de las actividades significativas y esto es considerado por varios autores como relevante en el diagnóstico de ansiedad y depresión [9,12,24,29].

Diversas investigaciones han observado una disminución significativa de las actividades de la vida diaria (AVD) durante la hospitalización de los pacientes al comparar con los niveles funcionales previos a la admisión [11,13,17,18,21,31,38,42]. Se encontraron dos estudios que midieron la relación entre discapacidad y depresión pero ninguno en población oncológica [25,43].

El objetivo de esta investigación fue explorar si los pacientes con enfermedad oncológica internados en las salas de clínica médica del Hospital de Gastroenterología Dr. Bonorino Udaondo de la Ciudad de Buenos Aires (Argentina) que deterioran su grado de independencia funcional durante la internación presentan incremento de los síntomas de ansiedad y depresión.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional en el Hospital de Gastroenterología Dr. Bonorino Udaondo, ubicado en el barrio de Parque Patricios, el cual cuenta con tres Servicios de Internación: Clínica Médica, Cirugía y Terapia Intensiva destinados a la asistencia de adultos con patología del aparato digestivo. Se incluyeron en forma consecutiva pacientes de ambos sexos mayores de 18 años con enfermedad oncológica confirmada por histología o con sospecha de la misma por imágenes (ecografía abdominal o TAC), internados no más de 48 horas previas al ingreso al estudio en las salas de clínica médica del nosocomio entre el 01-07-2014 y el 30-04-2015. Se excluyeron pacientes con antecedente de retraso mental según criterios de DSM IV [9], con deterioro cognitivo moderado-severo o con síndrome demencial, pacientes cursando síndrome confusional agudo o ingresados a secuencia de cuidados de fin de vida, PAMPA [35]. Se contó con la autorización del Comité de Ética en Investigación del Hospital y todos los pacientes dieron su consentimiento informado para participar del estudio. Se eliminaron del análisis a pacientes que no completaron 7 días de internación (figura 1).

Cada paciente ingresado al estudio realizó una evaluación inicial entre las 24 y las 48 hs. de la internación en sala y una segunda evaluación a los  $7 \pm 2$  días. Se evaluó el estado funcional general con el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) y la presencia de síntomas con Edmonton Symptom Assessment System (ESAS). Para determinar el grado de independencia funcional se administró el Índice de Barthel [7,14,23,32], y para evaluar síntomas de la esfera ansiosa y depresiva se tomó la escala HADS [3,15,16]. La consistencia interna de los cuestionarios fue muy buena; el alfa de Cronbach fue de 0.9520 para el Barthel, 0.8630 para el HADS de ansiedad y 0.8391 para el HADS de depresión.

Los resultados se presentan como mediana y rango en variables numéricas. Se utilizó el test del signo para comparar los valores iniciales versus la segunda evaluación. Para cuantificar las modificaciones en las escalas de estado funcional, síntomas, independencia funcional, ansiedad y depresión se realizó una resta entre el valor del 7º día menos el valor inicial. Se calcularon coeficientes de correlación no paramétrica de Spearman. En todos los casos se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . El análisis se realizó con el Programa Estadístico STATA/SE 11.0.

## RESULTADOS

Se analizaron los datos de 35 pacientes con enfermedad oncológica que se internaron en el periodo en estudio. La descripción de la muestra se presenta en la tabla 1 y las características clínicas, en la tabla 2.

De los 35 pacientes, 11 habían recibido información diagnóstica y/o pronóstica en los 30 días previos al ingreso al estudio. Si bien 20 pacientes presentaban enfermedad en estado avanzado, sólo 9 estaban en seguimiento por el equipo hospitalario de cuidados paliativos.

En la evaluación inicial, 12 pacientes presentaban ECOG 1, 9 eran ECOG 2, 9 eran ECOG 3 y 4, ECOG 4. De los 35 pacientes, 25 presentaron alguna dificultad para desempeñar sus AVD (Barthel) y 18 presentaban dolor de al menos 2 puntos de intensidad. El estado funcional inicial medido con ECOG se asoció con depresión inicial por HADS ( $r=0,378$ ;  $p=0,0253$ ) pero no se relacionó con ansiedad inicial por HADS ( $r=-0,0019$ ;  $p=0,9914$ ). La relación entre Barthel inicial y depresión por HADS inicial (gráfico 1) resultó estadísticamente significativa ( $r=-0,4323$ ;  $p=0,0095$ ) pero el nivel de independencia inicial medido con Barthel no se asoció con el nivel de ansiedad inicial por HADS (gráfico 2), la correlación fue no significativa ( $r=-0,2422$ ;  $p=0,1609$ ).

En la tabla 3 se presenta la comparación de los valores del estado funcional, síntomas, independencia funcional, ansiedad y depresión en la evaluación inicial y a los 7 días. Se observó menor capacidad física luego de la semana de internación tanto en el desempeño de las AVD (Barthel) como en pérdida funcional registrada a través del ECOG, aunque la diferencia de ECOG no alcanzó significación estadística. El número de pacientes que presentaron algún nivel de dificultad para desempeñar sus AVD ascendió de 25 al ingreso a 29 a la semana. Respecto a los síntomas evaluados por ESAS, las diferencias fueron significativas para el dolor y el malestar. Si analizamos los 25 pacientes que referían algún nivel de cansancio en la primera evaluación (mediana=7; rango=2-10) presentaron una disminución a la semana (mediana=4, rango=0-9) que resultó estadísticamente significativa ( $p=0,0036$ ). Sólo 9 pacientes presentaban náuseas al inicio (mediana=4; rango=1-10) y mejoraron a la semana (mediana=3; rango=0-6), la diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0,0156$ ).

Al analizar valores del 7° día, no se encontró asociación significativa entre el HADS de ansiedad con el desempeño de las AVD medido con Barthel ( $r=-0,3108$ ;  $p=0,0691$ ) ni con el estado funcional medido con ECOG ( $r=0,2723$ ;  $p=0,1136$ ). Por otro lado, el HADS de depresión se relacionó con los valores obtenidos en el Barthel ( $r=-0,6485$ ;  $p<0,0001$ ) y con los del ECOG ( $r=0,6791$ ;  $p<0,0001$ ). Analizando exclusivamente los valores al 7° día, la relación entre Barthel y ansiedad se presenta en el gráfico 3 y la relación entre Barthel y depresión, en el gráfico 4.

Se analizó la relación entre las modificaciones (diferencia entre el valor al 7° día y el inicial) del Barthel con las modificaciones del HADS. Los gráficos 5 y 6 muestran la relación encontrada entre la diferencia Barthel y la diferencia de ansiedad ( $r=-0,3275$ ;  $p=0,0548$ ) y entre la diferencia de Barthel y la diferencia de depresión ( $r=-0,2179$ ;  $p=0,2086$ ).

## DISCUSIÓN

El objetivo de esta investigación era explorar si los pacientes con enfermedad oncológica que deterioran su grado de independencia funcional durante la internación presentan incremento de los síntomas de ansiedad y depresión. En la presente serie, los pacientes disminuyeron sus capacidades físicas luego de una semana de internación a pesar del alivio general de los síntomas. Si bien se esperaba que incrementaran la ansiedad y la depresión con el deterioro físico, esto no sucedió. Por el contrario se observó que la depresión no se modificó y la ansiedad disminuyó.

Tampoco se encontró relación entre la pérdida de función y la ansiedad. Si bien la prevalencia de ansiedad en enfermedades oncológicas varía según el instrumento de evaluación que se utilice y la localización tumoral, diferentes estudios realizados en pacientes con cáncer establecen una frecuencia entre el 25% y el 41% y coinciden que la ansiedad es un estado emocional que cursa con sintomatología física y psíquica y aparece generalmente asociada a importantes manifestaciones somáticas, teniendo efectos perjudiciales sobre el rendimiento tanto físico como intelectual de las personas [1,8,27,33]. Según Bruera, en su estudio con 257 pacientes con cáncer avanzado, el dolor y las náuseas se reportaron entre los cinco síntomas más frecuentes y los pacientes referían un alto grado de estrés por padecerlos[2]. Esto también coincide con el estudio realizado por Kirkova y col. quienes evaluaron 46 síntomas en 181 pacientes oncológicos; el 67% de ellos refirió dolor y el 86% lo identificó como fuente

de angustia, al mismo tiempo, el 28% refirió náuseas y el 72% lo identificó como fuente de angustia [20]. En consistencia con estos estudios, en la presente serie, la disminución de la ansiedad pudo estar relacionada con la disminución de los síntomas. Conjetura difícil de testear con los datos disponibles dado que cada paciente presentaba diferente sintomatología, sin descartar que los cambios en la ansiedad estén relacionados a otros factores.

Por otra parte, la sensación de malestar y de cansancio está más cercana a la percepción de calidad de vida y este aspecto se relaciona también con el alivio sintomático.

Se encontró relación entre el nivel de dificultad para desempeñar AVD y depresión. Esto es coincidente con los dos estudios hallados que miden la relación entre discapacidad y depresión aunque en ninguno se pudo analizar cual precede a la otra. Lynch y col. encontraron que la pérdida funcional es un factor más de estrés en pacientes con esclerosis múltiple y que la depresión es una reacción emocional habitual en el contexto de la enfermedad, concluyeron que existe relación entre ambas variables[25]. Por otro lado, Yanagita y col. estudiaron la relación entre discapacidad y depresión en gerontes que vivían en la comunidad utilizando test de rendimiento físico tanto de miembros superiores (fuerza de puño) como de miembros inferiores (velocidad de marcha); concluyeron que la velocidad de marcha (factor físico) es lo que se relaciona con depresión [43].

Varios autores argumentan por qué la depresión es de tan difícil diagnóstico en la población oncológica y por lo tanto no es tratada adecuadamente por los profesionales de la salud. Creyéndola una reacción normal en el contexto de una enfermedad grave, iniciar un tratamiento antidepressivo podría interferir con el proceso de aceptación y afrontamiento de la muerte. Desde esta perspectiva, se tiende a minimizar la implicancia del concepto de depresión y se corre el riesgo de caer en la generalización de que todos los pacientes cercanos al fin de la vida pueden estar deprimidos. Las consecuencias de fallar en el diagnóstico de este trastorno no sólo impactan en el ánimo sino que también repercute en la internación [5,12,22,24,26,29,30,37,40]. Si bien en el presente estudio, ninguno de los pacientes presentó un puntaje para depresión que indicara la necesidad del abordaje específico, todos refirieron algún grado de malestar según lo recabado en las distintas preguntas del test. La relación entre la pérdida de función y la depresión también fue estudiada por Eva[10] y Chochinov[6], quienes aseguran que la dificultad para el desempeño de AVD, la dependencia del cuidado de otros, la pérdida de autonomía y los sentimientos de inutilidad entre otras cosas son fuentes de angustia para los pacientes con cáncer y pueden llevar a desarrollar trastornos más serios.

En el presente estudio, la disminución del nivel de dificultad para desempeñar AVD medida por Barthel durante la primera semana de internación no se acompañó con aumentos en la ansiedad ni la depresión.

Por último, mucho se conoce ya acerca de los cambios físicos agudos ante la hospitalización de una persona debido a una repentina disminución de la actividad. El reposo prologando en cama, la disminución en los estímulos y la interrupción abrupta en la participación de actividades impactan negativamente en el sistema fisiológico y esto lleva a prolongar las estadías hospitalarias, dificulta el proceso de alta médica y aumenta los costos de internación. En un hospital, el paciente es tratado en un ambiente restrictivo e impersonal que puede ser eficiente para satisfacer sus necesidades médicas, pero que fomenta sentimientos de dependencia. Stucki y col. incorporaron el concepto de rehabilitación temprana con el objetivo de mantener la funcionalidad lo máximo que se pueda, optimizar la recuperación y autonomía, siendo el fin último mejorar la calidad de vida de los pacientes internados. Este nuevo paradigma de rehabilitación temprana se contrapone al anterior que describía la rehabilitación como la tercera fase de la medicina, en la cual este tipo de intervenciones debían esperar a la estabilidad clínica [34,36]. El ámbito donde se desarrolló el presente estudio no cuenta con profesionales que puedan llevar adelante este abordaje temprano en pacientes internados.

La principal limitación de este estudio es que el tamaño de la muestra resultó insuficiente para alcanzar significación estadística en la mayoría de las relaciones exploradas. En parte se debió a que las diferencias resultaron menores a las esperadas; es posible que el corto intervalo de tiempo en el que los pacientes eran evaluados favoreciera una diferencia de poca magnitud entre la primera y la segunda evaluación. Un tamaño de muestra mayor permitiría incluir en el análisis otras variables que pudieran influir en la variación de la funcionalidad, la ansiedad y la depresión.

## **CONCLUSIÓN**

El nivel de depresión se asoció con el estado funcional inicial y no se modificó significativamente al 7º día. La ansiedad mejoró al 7º día a pesar del deterioro funcional lo que podría estar relacionado con la mejoría en los síntomas. Los profesionales de la salud deberán considerar con mayor relevancia los aspectos que hacen a la funcionalidad de los pacientes oncológicos y a los síntomas de la esfera ansiosa y depresiva. Se requiere de futuras investigaciones para evaluar estas relaciones y el posible impacto en la calidad de vida de estos pacientes con un abordaje multidisciplinario oportuno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

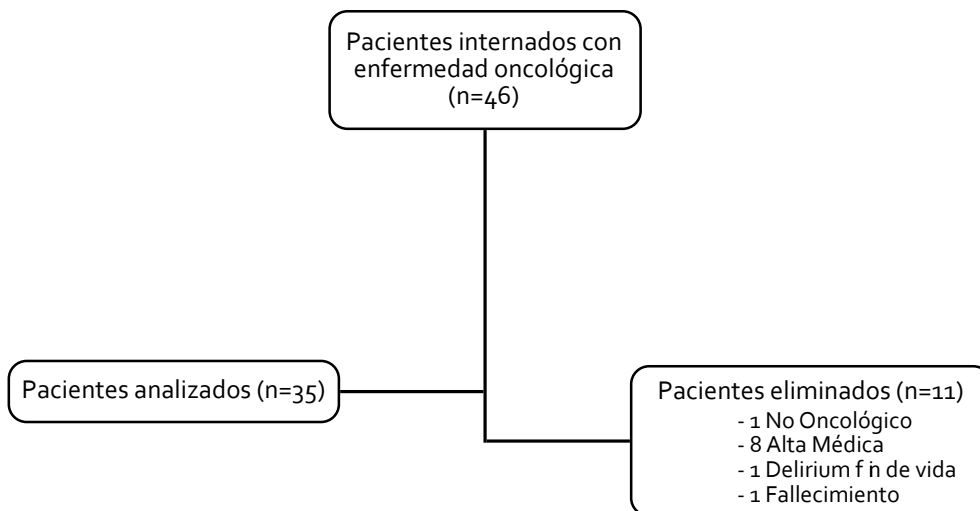
1. Breitbart W. Psycho-oncology: Depression, Anxiety, Delirium. *Seminars in oncology* 1994;21(6):754-769.
2. Bruera E. Research in symptoms other than pain. En: Doyle D, Hanks G, MacDonald N. Eds *Oxford Textbooks of Palliative Medicine*: 1997 p87.
3. Carroll BT, Kathol RG, Noyes R. Screening for depression and anxiety in cancer patients using the Hospital Anxiety and Depression Scale. *Gen Hosp Psychiatry* 1993;15(2):69-74
4. Cheville A. Rehabilitation of patients with advanced cancer. *Cancer supplement August*;2001 92(4).
5. Chochinov HM, Breitbart W. *Handbook of Psychiatry in Palliative Medicine*. Oxford 2009.
6. Chochinov HM. Dying, dignity and new horizons in palliative end of life care. *CA Cancer J Clin* 2006;56:84-103.
7. Collin C, Davis S, Horne V, Wade DT. Reliability of the Barthel ADL Index. *Int J Rehab Res* 1987;10:356-357.
8. De Walden, Galuszko K. Prevalence of psychological morbidity in terminally ill cancer patients. *Psycho-Oncology* 1996;5:45-49.
9. DSM IV. *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales*. Ed APA-Masson: España: 1995.
10. Eva G, Wee B. Rehabilitation in end-of-life management. *Curr Opin Support Palliat Care* 2010 Sep;4(3):158-62.
11. Eyres L, Unsworth C. Occupational therapy in acute hospitals: The effectiveness of a pilot program to maintain occupational performance in older clients. *Australia Occupational Therapy Journal* 2005;52:218-224.
12. Fallowfield L, Ratcliffe D, Jenkins V, Saul J. Psychiatric morbidity and its recognition by doctors in patients with cancer. *Br J Cancer* 2001;84:1011-1015.
13. Gill T, Allore H, Guo Z. The deleterious effects of bed rest among community-living older persons. *Journal of Gerontology* 2004;59A(7):755-761.
14. González M. Discapacidad/dependencia. Unificación de criterios de valoración y clasificación. Ed. Imsero: España: 2004.
15. Hamilton M. Diagnosis and rating of anxiety. In *Studies of Anxiety*, Lander, MH. *Brit J Psychiat Spec Pub* 1969;3:76-79.
16. Hamilton, M. The assessment of anxiety states by rating. *Brit J Med Psychol* 1959;32:50-55.
17. Hendriksen H, Harrison R. Occupational Therapy in accident and emergency departments: a randomized controlled trial. *Journal of Advance Nursing* 2001;36 (6):727-732.
18. Hoogerduijn J, Schuurmans M, Duijnste M, de Rooij S, Grypdonck M. A systematic review of predictors and screening instruments of identify older hospitalized patients at risk for functional decline. *Journal of Clinical Nursing* 2005; 16:46-57.
19. <http://www.msaj.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>
20. Kirkova J, Walsh D, Rybicki L, Davis M, Aktas A, Jin JT et al. Symptom severity and distress in advanced. *Palliat Med* 2010 24: 330.
21. Krasnoff J, Painter. The physiological consequences of bed rest and inactivity. *Advances in renal replacement therapy* 1999; 6:124-132.
22. Lawrie I, Lloyd-Williams M, Taylor F. How do palliative physicians assess and manage depression? *Palliat Med* 2004;18:234-238.
23. Loewen SC, Anderson BA. Reliability of the Modified Motor Assessment scale and the Barthel Index. *Phys Ther* 1988;68:1077-1081.
24. Lynch M E. The assessment and prevalence of affective disorder in advanced cancer. *J Palliat Care* 1995;11:10-18.
25. Lynch S, Kroenche D, Denney D. The relationship between disability and depression in multiple sclerosis: the role of uncertainty, coping, and hope. *Mult Scl* 2001 Dec;7(6):411-6.
26. Massie M. Depression. En: Holland JC, Rowlan JH. ed. *Handbook of psychooncology: Psychological Care of the Patient with Cancer*. New York: 1989 p. 283-290.
27. Maté J, Hollenstein M, Gil F. Insomnio, ansiedad y depresión en el paciente oncológico. *Psicooncología* 2004;1(2-3):211-230.
28. Palma JS, Payne R. Palliative care and rehabilitation. *Cancer supplement August*;2001 92(4).
29. Passik SD, Breitbart W. Depression in patients with pancreatic carcinoma: Diagnostic and treatment issues. *Cancer* 1996;78(suppl 3):615-626.
30. Passik SD, Dugan W, McDonald MV, Rosenfeld B, Theobald DE, Edgerton S. Oncologists recognition of depression in their patients with cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1594-1600.
31. Sandoval L, Varela L. Estudio comparativo de funcionalidad en pacientes mayores ambulatorios y hospitalizados. *Revista Médica Heredia* 1998;9(4):138-142.



32. Shah S, Vanclay F, Cooper B. Improving the sensitivity of the Barthel Index for stroke rehabilitation. *J Clin Epidemiol* 1989;42:703-709.
33. Spitzer RL, Williams JBW, Kroenke K. Utility of a new procedure for diagnosing mental disorders in primary care: The PRIME MD 1000 study. *J Am Med Assoc* 1994;272:1749-1756.
34. Stucki G, Stier-Jamer M, Grill E, Melvin J. Rationale and principles of early rehabilitation care after an acute injury or illness. *Disability and Rehabilitation* 2005; 27(7/8):353-359.
35. Tripodoro VA, et al. Implementación del Liverpool Care Pathway en español en Argentina y en España: exploración de las percepciones de los profesionales ante el final de la vida. *Med Paliat*. 2013.
36. Versluys H. La adaptación psicosocial a la incapacidad física. En Trombly. *TO para Enfermos Incapacitados Físicamente*. Ed. Prensa Médica Mexicana: 1990 p. 14-49.
37. Vidal y Benito, MC. *Psiquiatría y Psicología del Paciente con Cáncer*. Ed Polemos: 2008.
38. Volpato S, Onder G, Cavalieri M, Guerra G, Sioulis F, Maraldi C et al. Italian Group of Pharmacoepidemiology in the Elderly Study (GIFA). Characteristics of nondisabled older patients developing new disability associated with medical illnesses and hospitalization. *JGIM* 2007;22:668-674.
39. Warmenhoven F, Rijswijk E, Engels Y, Kan C, Prins J, Weel C, Vissers K. The Beck Depression Inventory (BDI-II) and a single screening question as screening tools for depressive disorder in dutch advanced cancer patients. *Support Care Cancer* 2012;20:319-324.
40. Watson M, Lucas C, Hoy A, Back I. *Manual de Oxford de Cuidados Paliativos*. Ed Grupo Aula Médica: España: 2008.
41. World Health Organization. *Palliative care: cancer control knowledge into action. Guideline*. Switzerland: OMS; 2007.
42. Wu A, Yasul Y, Alzola C, Galanos A, Tsevat J, Phillips R et al. Predicting functional status outcomes in hospitalized patients aged 80 years and older. *Journal of American Geriatrics Society* 2000;48(5):6-15.
43. Yanagita M, Willcox B, Masaki K, Chen R, Rodriguez B, Ueshima H et al. Disability and depression: investigating a complex relation using physical performance measures. *American Journal of Geriatric Psychiatry* 2006;14:12.

**ANEXO**

**Figura 1: Pacientes Incluidos en el estudio**



**Tabla 1: Descripción de la muestra**

Características	Pacientes con enfermedad oncológica (n= 35)
<b>Edad (en años)</b>	
Mediana (rango)	60 (18 a 79)
<b>Sexo (n)</b>	
Masculino	18
Femenino	17
<b>Educación (n)</b>	
Analfabeto	1
Primaria Incompleta	10
Primaria Completa	10
Secundaria Incompleta	6
Secundaria Completa	7
Universitario Completo	1
<b>Ocupación (n)</b>	
Trabajador en Negro	16
Ama de casa	8
Jubilado	5
En relación de dependencia	3
Desocupado	3
<b>Antecedentes psicológicos/psiquiátricos (n)</b>	
Muerte de familiar	2
Divorcio	2

**Tabla 2: Descripción de las características clínicas de los participantes**

Características	Pacientes con enfermedad oncológica (n=35)
<b>Localización de la enfermedad (n)</b>	
Colon	10
Estómago	6
Esófago	5
Páncreas	4
Recto	2
Hígado	1
Primario en estudio	1
Primario desconocido	1
Otros	5
<b>Estadio (n)</b>	
Enfermedad avanzada metastásica	20
Enfermedad localizada	12
Enfermedad avanzada locoregional	3
<b>Motivo de Internación (n)</b>	
Control sintomático	32
Estudio Diagnóstico	3
<b>Estadía en Guardia (en horas)</b>	
Mediana	24
Rango	0 – 216

**Tabla 3: Evaluaciones al ingreso al estudio y a la semana (n=35)**

Evaluación	Medición inicial (A)	Medición a la semana (B)	Diferencia (B menos A)	Valor de "p"
<b>ECOG</b>				
Mediana (rango)	2 (0 a 4)	2 (1 a 4)	0 (-1 a 2)	0.0717
<b>ESAS Mediana (rango)</b>				
<b>Dolor</b>	<b>2 (0 a 10)</b>	<b>0 (0 a 9)</b>	<b>0 (-10 a 8)</b>	<b>0.0262</b>
Cansancio	5 (0 a 10)	3 (0 a 9)	0 (-10 a 8)	0.0539
Nausea	0 (0 a 10)	0 (0 a 6)	0 (-10 a 3)	0.0625
Somnolencia	0 (0 a 10)	0 (0 a 8)	0 (-10 a 6)	0.3953
Apetito	4 (0 a 10) <b>5 (0 a 9)</b>	3 (0 a 10)	0 (-9 a 5)	0.3145
<b>Malestar</b>	<b>5 (0 a 10)</b>	<b>3 (0 a 9)</b>	<b>0 (-7 a 3)</b>	<b>0.0392</b>
Falta de aire	0 (0 a 10)	0 (0 a 9)	0 (-10 a 5)	0.7734
Dif. para dormir	0 (0 a 10)	2 (0 a 10)	0 (-7 a 9)	0.5881
<b>Índice de Barthel (AVD)</b>				
Mediana (rango)	91 (0-105)	90 (0-105)	-3 (-45 a 44)	<b>0.0378</b>
<b>HADS para Ansiedad</b>				
Mediana	6 (0 a 21)	5 (0 a 21)	-1 (-10 a 5)	<b>0.0494</b>
<b>HADS para Depresión</b>				
Mediana (rango)	5 (0 a 21)	4 (1 a 21)	0 (-8 a 9)	0.5775

Gráfico 1: Relación entre Barthel y depresión por HADS inicial (n=35)

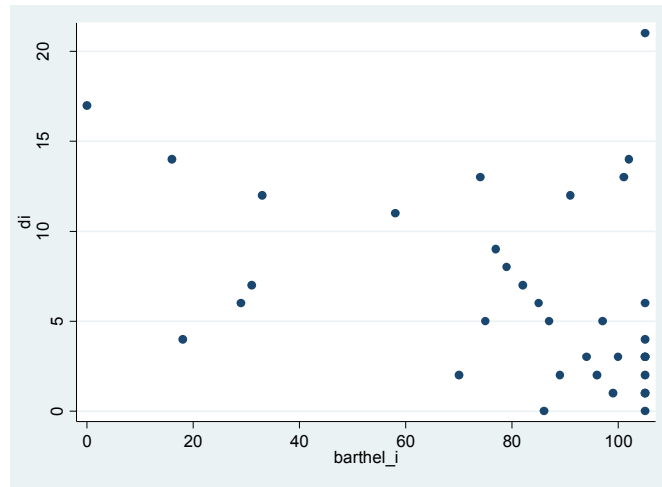


Gráfico 2: Relación entre Barthel y ansiedad por HADS inicial (n=35)

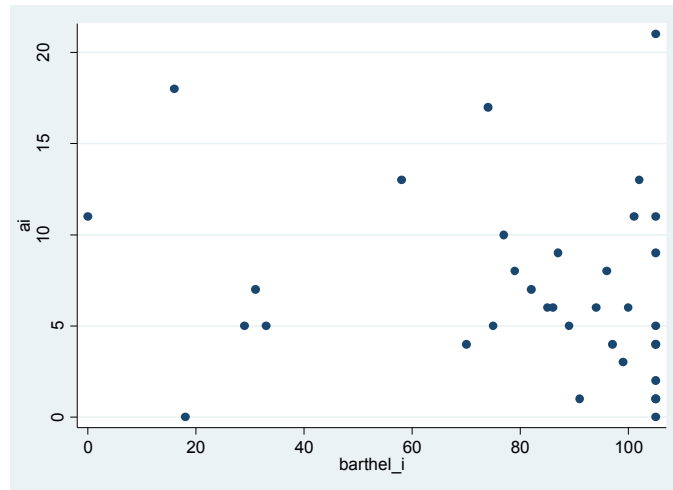


Gráfico 3: Relación entre Barthel y ansiedad por HADS al 7º día (n=35)

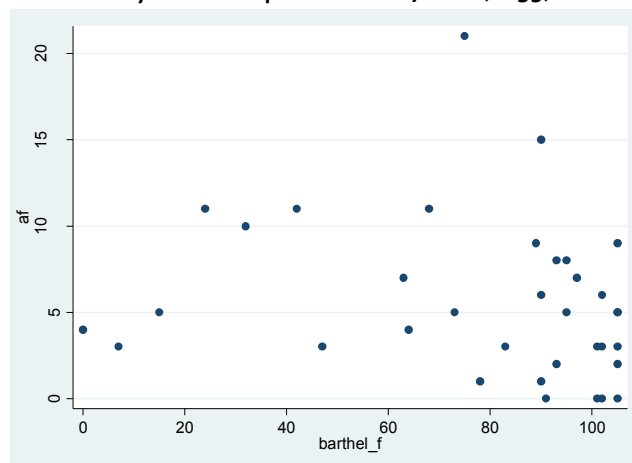


Gráfico 4: Relación entre Barthel y depresión por HADS al 7º día (n=35)

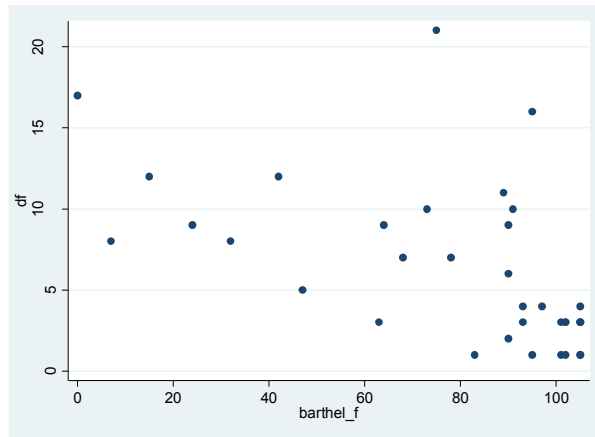


Gráfico 5: Relación entre la diferencia de Barthel y la diferencia de ansiedad (n=35)

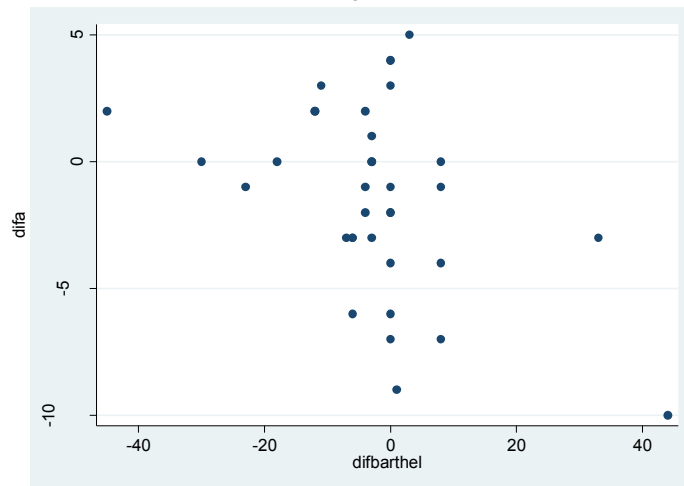
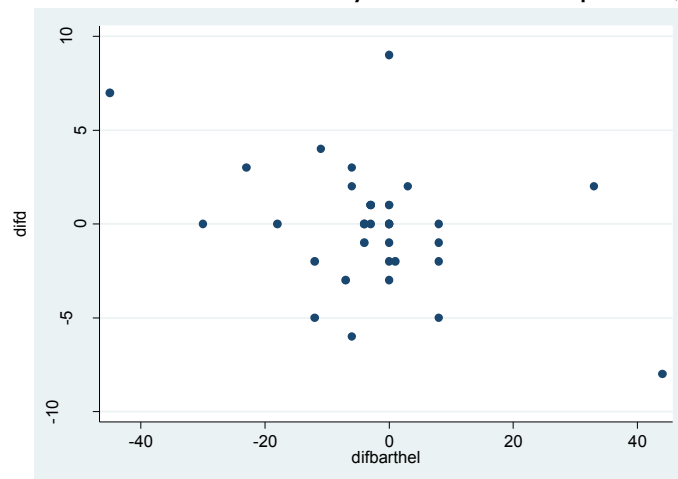


Gráfico 6: Relación entre la diferencia de Barthel y la diferencia de depresión (n=35)



# EL PROCESO DEL MORIR EN LA EDUCACIÓN MÉDICA: PERCEPCIONES DE LOS ESTUDIANTES DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR, BAHÍA BLANCA

**Estefanía Panizoni**

Universidad Nacional del Sur

**Director:** Alejandro Cragno

## RESUMEN

**Introducción:** La muerte y el morir son eventos eminentemente humanos no siempre tenidos en cuenta en los procesos de formación de los profesionales de la salud. **Objetivos:** analizar la percepción sobre la educación que reciben los estudiantes de medicina de la Universidad Nacional del Sur en relación al proceso del morir, la percepción del morir en diferentes etapas de la formación y las herramientas y competencias obtenidas.

**Metodología:** estudio cualitativo, fenomenológico, exploratorio-descriptivo. Se realizaron tres grupos focales con un total de 19 estudiantes de medicina de primero, cuarto y sexto año. Los datos se analizaron manualmente, volcándolos en una matriz de tipo cualitativa. **Resultados:** Los estudiantes valoran la práctica como oportunidad de aprendizaje, las herramientas comunicacionales, los seminarios y los momentos de reflexión. Perciben la muerte y el morir como el resto de la sociedad, con una connotación negativa.

**Conclusiones:** Los estudiantes avanzados logran mayor aceptación del morir en la formación aunque no están del todo preparados para afrontarlo. Se ven motivados para aprender cuando tienen oportunidades adecuadas. Creemos que estos resultados refuerzan la importancia del campo de educación en las humanidades médicas y en cuidados paliativos y servirán para orientar la implementación de espacios formales en los programas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Death and dying are eminently human events which are not always taken into account in the process of training of health professionals.

**Objectives:** to analyze the perception of the education that medical students of the South National University receive in relation to the process of dying, the perception of death in different stages of training and the tools and skills acquired.

**Methodology:** qualitative study, phenomenological, exploratory-descriptive. Three focus groups with a total of 19 medical students from first, fourth and sixth years were made. Data were analyzed manually turning them into an array of qualitative type.

**Results:** Students appreciate the practice as an opportunity of learning, communication tools, seminars and moments of reflection. They perceive death and dying like the rest of the society, with a negative connotation.

**Conclusions:** Advanced students achieve greater acceptance of dying in the training though they are not quite ready to face it. They are motivated to learn when they have adequate opportunities. We believe these results reinforce the importance of the field of education in the Medical Humanities and in Palliative Care and they will serve to guide the implementation of formal spaces in the programs.

## INTRODUCCIÓN

La muerte y el morir son eventos eminentemente humanos, de gran singularidad, que se vuelven trascendentales en la vida de las personas: pacientes, familias y profesionales de la salud se ven involucrados.

La formación en relación a la muerte y el morir debería ser un aspecto central en las carreras de los profesionales de la salud y se ha transformado en un tema en discusión en la agenda de educación

médica a nivel mundial. Motiva su abordaje la necesidad de mejorar su afrontamiento dado el actual aumento de personas con enfermedades crónicas [1] que se encuentran en etapas tardías de la vida junto a la ausencia de espacios educacionales específicos en torno a los mismos.[2]

La sociedad y las instituciones educativas se encuentran atravesadas por un "ideograma" convencional, por un conjunto de gestos corporales, reacciones emocionales y de ciertas pautas o criterios normativos que niegan la muerte como momento y el proceso del morir [3] como esa suma de instantes que nos llevan a la finitud. La muerte y el morir, que eran antes acontecimientos vividos como naturales en el seno de la comunidad, se han privatizado y convertido en un disforme tabú [4,5,6,7]. Se oculta la muerte y todo lo que nos la recuerde, se nos aconseja discreción. Se ha configurado un tático aislamiento de los seniles y moribundos, un enfriamiento paulatino de sus relaciones con las personas que contaban con su afecto, lo que nos marca un punto débil de nuestras sociedades [4].

La educación médica es un proceso de socialización donde no solo es importante la adquisición de conocimientos y destrezas sino también el desarrollo de actitudes y valores [8]. En la actualidad, en términos generales, dista mucho de ser adecuada entre otras cosas debido a errores que afectaron los programas educativos al no incluir, apartar o minusvalorar aspectos esenciales de la medicina relacionados con las ciencias humanas [9].

Desde la conferencia de Ithaca[10] (1951) se comienza a reorientar la educación médica tomando al paciente como persona, en un entorno de cinismo creciente y pérdida de las cualidades de humanismo en la formación de los médicos[11]. En la década del '70 comienzan a plantearse los aspectos conceptuales de la atención centrada en el paciente y la bioética comienza a desarrollarse como una disciplina fundamental en el quehacer de los profesionales de la salud. Hay un fuerte intento de recuperar al ser humano como centro del accionar de los profesionales de la salud y de la formación médica. Entre 1980 y 1990 se revitaliza el concepto de humanismo en medicina proponiendo un médico que respete las opiniones y puntos de vista del paciente como individuo único y atienda su bienestar psicológico en el contexto de su familia, medio social y físico, disponga buena comunicación, generando además confianza y confidencia con calor, compasión y empatía[12]. La asistencia actual de los profesionales de la salud se replantea y transita un especial interés dirigido hacia una medicina compasiva y cuidadora. Nos encontramos frente a pilares contemporáneos fundamentales del humanismo en medicina. Se contempla no solo la calidad de vida relacionada a la salud, sino también la atención segura y de calidad, los derechos y el cuidado del paciente y su familia, con énfasis en las etapas tempranas y tardías de la vida; y es aquí donde estamos situados. Se genera una brecha, un problema, dado que la percepción existente por parte de los estudiantes y médicos jóvenes es que no están preparados para atender a pacientes con la vida amenazada[13,14,15]. Falta adecuada educación en las carreras de grado en relación a la atención de los moribundos, la muerte y el morir[16]. Como si fuera poco, los programas educacionales basados en un modelo biomédico desafían al estudiante a evitar la muerte, con lo cual, ayuda a que sea percibida como un fracaso del que los profesionales no pueden escapar.

La enseñanza del cuidado paliativo y de humanidades médicas en las carreras de medicina es lo que ha permitido a los estudiantes desarrollar un mejor afrontamiento hacia el morir y la muerte[17]. Sin embargo, en Argentina la educación en relación a cuidados paliativos no figura dentro de los contenidos básicos ni los estándares de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria[18](CONEAU), es decir, aún no ha sido incluida en el programa de las carreras de grado para los estudiantes de medicina[19]. Las ciencias humanas aún no ocupan el lugar que debieran en los programas de formación para los médicos. En el Segundo Encuentro Nacional de Humanismo en Medicina[20], la Dra. Elena Cisaruk resaltó en su ponencia datos de interés sobre educación y humanidades médicas: de las 32 Facultades de Medicina que hay en la Argentina, menos de la mitad abordan estos temas, varias tienen muy pocas horas y solamente una de las 32 tiene un ciclo de humanismo a lo largo de todos los años de la carrera, incluyendo el internado rotatorio.

Aun sabiendo la magnitud de lo que ocurre, la percepción de los estudiantes de medicina sobre la muerte y el morir ha sido escasamente explorada en Argentina y a nivel local. El presente estudio se realizó en el ámbito de la Carrera de Medicina del Departamento de Ciencias de la Salud, perteneciente a la Universidad Nacional del Sur, en la ciudad de Bahía Blanca. El modelo pedagógico de educación brindado es centrado en el estudiante, con un aprendizaje basado en problemas y orientado a la comunidad[21]. La carrera tiene un programa integrado, espiralado, orientado al desarrollo de competencias con seis años de duración, dividida en tres ciclos. Los estudiantes son introducidos al

estudio del paciente como un todo, con un enfoque biopsicosocial. Se reconoce al individuo y su familia en un entorno dado y con supuestos labrados desde una perspectiva profesional y humana. Las actividades formales son en distintos escenarios de aprendizaje (hospitales, unidades sanitarias, comunidad) incluyendo, de nuestro interés, un espacio educacional específico de Relación Médico-Paciente en el Ciclo Inicial. En el Ciclo Clínico y la Práctica Final Obligatoria los estudiantes asisten principalmente a servicios especiales en los hospitales y a Unidades Sanitarias. En los cursos de Relación Médico-Paciente se estimula el aprendizaje de conceptos que van más allá de la comunicación incentivando a los estudiantes a desarrollar habilidades y competencias desde la interacción continua con el paciente y su familia. La meta de la carrera es formar un profesional que pueda enfrentar la salud-enfermedad-atención-cuidado en forma eficaz, eficiente, y con sentido humano.

La investigación consistió en analizar en estudiantes de medicina del Departamento de Ciencias de la Salud (DCS) de la Universidad Nacional del Sur (UNS) la educación que reciben en relación al proceso del morir. Asimismo, identificar en los estudiantes avanzados su percepción sobre las herramientas y competencias obtenidas para desempeñarse ante situaciones que involucren el proceso del morir. Se exploraron también, las diferentes percepciones y perspectivas educacionales del proceso del morir en las diferentes etapas de la formación.

Nos propusimos obtener conocimiento de la percepción de la educación de los futuros profesionales de la salud de nuestro ámbito, en relación al proceso del morir para cooperar con un cambio educacional que devuelva una medicina con mayor calidez.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

Se realizó un estudio cualitativo, fenomenológico, con un diseño exploratorio-descriptivo utilizando la técnica de grupos focales.

Es fenomenológico en tanto se persigue describir en profundidad los significados de las experiencias vividas desde la visión de los participantes quienes tienen experiencias en el fenómeno bajo investigación[22], siendo en nuestro caso, la educación médica, la muerte y el morir. Un grupo focal como una reunión con modalidad de entrevista grupal abierta y semiestructurada, en donde un grupo de individuos seleccionados por los investigadores discuten y elaboran, desde la experiencia personal, sobre una temática o hecho social que es objeto de investigación. La riqueza del mismo se basa en la interacción entre participantes como forma de recolección de información[23]. El objetivo de esta técnica es hacer que surjan actitudes, sentimientos, creencias, experiencias y reacciones en los participantes al tiempo que permite obtener distintas miradas y procesos emocionales dentro del contexto del grupo. El número ideal de participantes es 6-10, difiere según diversos autores.

Se realizaron tres grupos focales entre septiembre y abril (2014-2015) con un muestreo intencional de los participantes. Se incluyeron a 19 estudiantes de medicina de la Universidad Nacional del Sur seleccionados según su etapa de formación. Los grupos focales se realizaron con estudiantes de primer año (n=7) en su primer día de clases para analizar sus percepciones, creencias personales, familiares y culturales que forman parte de las expectativas de la carrera que han elegido. En cuarto año (n=6), donde ya han transitado y se han incorporado a realizar prácticas en diferentes escenarios de aprendizaje del Ciclo Clínico y, al final de sexto año (n=6), para captar las herramientas, competencias y expectativas que su formación les ha dejado en relación al proceso del morir.

Se realizaron dos guías para los grupos focales. Una operativa, para estandarizar los pasos desde la convocatoria hasta el análisis de los datos y otra para guiar al moderador en relación a las preguntas/ disparadores a realizar en el encuentro.

Dentro del grupo de investigación se designaron reclutadores que llevaron a cabo la convocatoria de los participantes, moderadores o facilitadores del debate, y observadores que pudieran recabar datos actitudinales de los participantes. Se realizó una prueba piloto del grupo focal con estudiantes avanzados de la carrera de medicina para evaluar la pertinencia de la segunda guía confeccionada y para el entrenamiento de los moderadores y observador/ es. Este encuentro permitió mejorar la logística de la convocatoria de los estudiantes para la realización de los próximos grupos focales y mejorar las preguntas/ disparadores utilizados.

Los reclutadores contactaron a los participantes con invitaciones vía email, redes sociales o por teléfono dada la posibilidad de acceder al Departamento de Ciencias de la Salud y a toda su comunidad



educativa por estar inmersos en la misma. Los encuentros en todos los casos fueron realizados en un lugar neutral, con una duración de 60-80 minutos.

Al inicio del desarrollo de cada grupo focal el moderador explicó a los participantes en qué consistía el estudio, su finalidad, aseguró la confidencialidad de la información relevada y obtuvo el consentimiento informado de los mismos. Todos completaron información de tipo demográfica: edad, género y carrera previa antes del ingreso a medicina para los estudiantes de primer año. Se eligió como disparador, al inicio, el cuadro "The doctor" (1981) de Samuel Luke Fildes, para facilitar el comienzo del debate en torno al tema propuesto (ver figura 1). Los grupos focales permitieron explorar los siguientes tópicos:

I) Percepción sobre la muerte y el proceso del morir, II) El proceso del morir en relación a la práctica clínica III) Percepción sobre las herramientas que reciben y las competencias que han desarrollado en relación al proceso del morir, en cuarto y sexto año; mientras que en primer año este último tópico fue reemplazado por las expectativas educacionales y comprensión del propio aprendizaje en relación al proceso del morir.

Los grupos focales fueron grabados, transcritos manualmente y analizados de manera inductiva y neutral, sin utilizar ningún software, volcando sus resultados a verbatim en una matriz cualitativa del tipo propuesto por Glasser y Strauss[24]. El análisis fue realizado en forma grupal, consensuando entre los miembros los resultados con disenso que fueron identificados.

La presente investigación fue realizada respetando el anonimato, la confidencialidad y dignidad de los participantes. Asimismo fue evaluada y aprobada por el Comité Institucional de Bioética del Hospital Municipal de Agudos "Dr. Leónidas Lucero"[25]. Los nombres incluidos en los verbatim, no son los reales. No se especifica el género de los estudiantes, docentes, participantes y/o profesionales de la salud en el texto para agilizar la lectura; sin una intención discriminatoria.

## RESULTADOS

Las características sociodemográficas de los participantes se pueden visualizar en la tabla 1.

### Estudiantes de sexto año de medicina

#### I) Percepción sobre la muerte y el proceso del morir

Los estudiantes de sexto año asocian el proceso del morir con sufrimiento, padecimiento, con el momento final. Identifican la resignación e impotencia del médico que simboliza frustración. Ante el interrogante de qué les sugiere la muerte como médicos, la asocian con padecimiento, agonía, sufrimiento.

Un paciente moribundo o "terminal", como lo referencian, les sugiere tranquilidad y una muerte más tranquila, más aceptada, más esperada, más trabajada y más fácil de sobrellevar. Las muertes inesperadas a algunos les resultan más traumáticas, más difíciles de tratar para el equipo médico y la familia.

"La muerte en un paciente terminal, es como dijimos, como más aceptado, más fácil de sobrellevar, pero una muerte inesperada en cualquier paciente, es... es....más difícil de manejar. Qué se yo, es como que los tiempos son menos, son más cortos, no sé. Pero, también el entorno, digamos para la familia, para todo aquel que recibe una muerte inesperada, es más difícil para trabajar para el equipo médico, para todo el mundo. Son mayores las presiones, no es lo mismo que una muerte esperada en donde se trata de aliviar el dolor. Y digamos es más aceptado" (Juan)

La edad del paciente fue señalado como un hecho relevante. No todos han visto un niño por morir, pero se suman a participar del debate imaginando como podría ser. La mayoría cree que es más difícil de sobrellevar que la de un adulto. Más aun refieren que la aceptan mejor en el adulto y que no la pueden tolerar en el niño. A su vez, el grupo etario del paciente condiciona la escena, el entorno: perciben que el adulto muere solo, triste, y el niño lo hace acompañado a pesar del gran dolor y sufrimiento de la familia. En otros estudiantes, la muerte no da ventajas emocionales en ningún paciente: "Yo no creo que, bah, en mi forma de pensar, que dependa tanto de la edad. Para mí la muerte es un cuco en todas las edades digamos, ¿No? Está bien que la si se muere un paciente

pediátrico vos decís: "Bueno tenía mucho por vivir... que se yo". Pero para mí significa lo mismo que para un adulto. Digamos, yo lo veo así" (Florencia)

## II) El proceso del morir en relación a la práctica clínica

Perciben la falta de empatía en los médicos tratantes y las dificultades que esto acarrea.

"Para mí el problema es que el médico no se pone en el lugar del paciente." (Leandro)

El "no involucrarse" señalan que está dado en algunas especialidades mientras que en otras el trato es distinto. Algunos identifican que la edad del médico puede influir en esto. También se identifican actitudes desinteresadas y despectivas que interpretan podrían ser un mecanismo de defensa, para no involucrarse.

"Para mí se ve eso... Van con la coraza al trabajo, se la sacan y entran a la casa..." (Camila)

## I) Percepción sobre las herramientas que reciben y las competencias que han desarrollado en relación al proceso del morir

### Oportunidades educativas

#### **a. El contacto con los pacientes**

A lo largo del grupo focal, resaltan la experiencia de la práctica clínica como una herramienta de gran valor brindada por la carrera. La mayoría de los estudiantes describen haber vivido situaciones con pacientes adultos con la vida amenazada, pero identifican un déficit de oportunidad para aprender sobre pacientes pediátricos en esta etapa.

"O sea, es el contacto diario con la persona que se puede llegar a morir. Yo creo que esa es la mayor herramienta que nos dio la carrera en cuanto a lo que es chocarte con la muerte. No sé si tanto, no se teóricamente cuantas herramientas nos dieron. Yo creo que eso." (Florencia)

#### **b. Aspectos comunicacionales en el desarrollo de las competencias**

La mayoría de los estudiantes concuerdan en que las herramientas comunicacionales brindadas por la carrera son muy importantes para la formación de un médico/a. Destacan el entrenamiento en empatía, como realizar una entrevista, en dar malas noticias y otros recursos brindados en espacios educativos formales de la carrera en el Ciclo Inicial. Identifican que obtienen herramientas para comunicarse mejor con pacientes que están atravesando su propio proceso del morir.

"Y también el hecho de que dentro de la materia Relación Médico Paciente se tomen el tiempo de darnos una clase que sea específicamente buscar cuales son las mejores formas de dar las malas noticias. (...) saber que existe una forma en la que el paciente se puede como sentir un poco como más cómodo y un poco menos mal al enterarse de algo que para él puede ser terrible" (Virginia)

#### **c. Momentos de reflexión en la práctica**

Los estudiantes reflexionan sobre la muerte y el morir solos, entre compañeros, con otros profesionales de salud del servicio a donde concurren, muy pocas veces con los docentes y, en general, no lo hacen con las familias ni con los pacientes. Les produce alivio contar con espacios informales individuales y compartidos que los llevan a la reflexión de la práctica diaria, sobre casos que surgen al tener un contacto muy cercano con los pacientes, murientes y no murientes. Parecería ser reparador para los estudiantes encontrar médicos que le imprimen humanismo a la muerte de sus pacientes a lo largo de la vida profesional. Tomar los consejos dados o debatir en esos espacios les permite formar una opinión.

"Estábamos haciendo algo en el Hospital (...) y falleció un nenito de una enterocolitis necrotizante de un día para otro, y el Servicio estaba muy mal, y hablando con uno de los clínicos que ya tiene como 35 años de profesión él nos decía que nunca vas a dejar que la muerte te pase como nada digamos, siempre algo va a producir en vos, y siempre todo paciente va a tener un impacto distinto en vos... a lo largo del tiempo no vas a perder eso, nunca logras acostumbrarte a la muerte..." (Virginia)

#### **d. Otras oportunidades educativas**

Están de acuerdo de lo positivo que les resultó ver películas y realizar debates en el ciclo inicial: "es una herramienta fantástica", "lleva a que pienses de otra forma", resaltan con consenso.

Valoran las actividades de seguimiento longitudinal de pacientes ya que les permite abordar el tema de la muerte y el morir desde diferentes perspectivas, por lo que lo consideran otra buena oportunidad educacional.

"me pasó ahora, hace muy poquito con un paciente de seguimiento familiar, un paciente terminal, con cáncer de pulmón ya de 5 años, y... es un paciente que ya está resignado, que no se quiere hacer más quimioterapia. Y bueno entonces lo que hacemos nosotros es más que nada tratar de brindarle una mejor calidad de vida o sea ayudarlo para que tenga una mejor calidad de vida" (Juan)

### **Competencias adquiridas en la formación**

Al debatir sobre el manejo de una situación con un paciente con una enfermedad que amenaza su vida, con los estudiantes que pronto van recibirse, perciben que cuentan con herramientas que les han dado cierta aceptación sobre el proceso del morir pero que no se sienten del todo preparados para afrontarlo. Y se preguntan si en realidad alguna vez se está preparado para poder hacerlo, para poder enfrentar algo así. Creen que la muerte de su primer paciente va a marcar un hito en su vida profesional e insinúan: "el sistema pega fuerte", "nos va a dar una cachetada", "a cargo tuyo yo creo que va a cambiar un montón tu pensamiento". (Varios)

Es por esto que a modo de ejemplo, reproducimos la primera reacción de una de las participantes del grupo focal: "¿Qué van a hacer con su primer paciente? ¡No sé! No sé qué voy a hacer. De la boca para afuera te lo digo pero en el momento no sé qué voy a hacer (...)". (Florencia)

### **Propuestas de oportunidades educacionales:**

Ante la pregunta, de qué es lo que podría mejorar su formación, proponen diferentes oportunidades educacionales en torno a la muerte y el morir. Incluyendo al arte (cine, literatura, pintura) ya que permitiría recrear el punto de vista del paciente y de la familia con respecto a una enfermedad o el proceso del morir. Frente a la complejidad del tema proponen seminarios o actividades similares interdisciplinarias incluyendo la mirada del paciente. Conciernen que los espacios de reflexión deberían incluirse en el quehacer del médico.

"A mí me encantaría una residencia que tenga un espacio de reflexión, he visto videos o situaciones o bibliografía (...), tienen un espacio semanal de una hora, como si fuera una terapia de grupo, una catarsis digamos hay una comunicación tal que vos puedes decir: me pasó..." (Otros asienten) (Camila)

### **Estudiantes de cuarto año de medicina**

#### **I) Percepción sobre la muerte y el proceso del morir**

Tras la pregunta de que les sugiere la palabra "muerte", debaten el miedo, un "vacío" o incertidumbre. La definen como el fin del contacto con el entorno, con el otro, el cese de la vida biológica, y también como un fin físico. Para algunos la percepción varía de acuerdo a la edad del paciente (si es un niño, un adulto, etc.), otros concuerdan en que depende del grado de sufrimiento que padezca el paciente, y otros según el vínculo médico- paciente por morir.

"Quizás también depende del vínculo, me estoy imaginando yo como médico en frente de un paciente, depende quizás del vínculo... quizás por determinada cuestión sentiste más cariño o algo y lo vas a vivenciar distinto, quizás lo veas como "bueno, qué alivio" como decían los chicos, o lo pienses "que injusto" por otro lado"(Carla)

Reconocen también el "dolor" y "sufrimiento" por el que la persona en situación de morir atraviesa. Acuerdan en que son términos diferentes, pero no su significado. Algunos relacionan al sufrimiento como algo más "espiritual", y al dolor como algo más "físico". Otros consideran al dolor como parte del sufrimiento o el sufrimiento como vivencia del dolor.

"Yo considero que del dolor parte el sufrimiento, en algunos de los casos. Y en otros hay dolor solo y la persona no sufre. Hay cosas en el entorno que hacen que la persona sufra." (Darío)

#### **I) El proceso del morir en relación a la práctica clínica**

Frente al manejo de un paciente moribundo que no desea vivir más, surgen distintas posiciones de su conducta. Algunos destacan el principio bioético de autonomía, respetando la posición del paciente.

Otros expresan que no saben cómo responderían y que deberían estar en dicha situación para saber su reacción, viéndolo como una situación muy difícil para el profesional. Surge el lugar de muerte como un problema de la práctica clínica para el paciente que atraviesa el morir. Varios concuerdan que las acciones se centran en la figura del médico, es éste quien decide donde va a morir el paciente y destacan que no suele existir un acuerdo con la familia. Otros expresan que la decisión depende también del sistema de salud, responsable de proveer los recursos necesarios para poder ofrecer al paciente la decisión de elegir donde morir.

“Yo también involucraría una parte más dentro de todo esto, que es el sistema para mí, porque una vez que, en el caso de que se tome la determinación de que una persona muera en su casa con sus cosas, todo esto que estamos hablando, también el sistema tiene que acompañar, y por ejemplo si el paciente necesita una cosa para morir dignamente, para morir bien, sin dolor o cómodo, que el sistema lo pueda proveer” (José)

Al plantear *cómo* debería ser una buena práctica clínica con respeto a un paciente moribundo, la mayoría de los estudiantes concuerdan en que fundamentalmente se debería acompañar al paciente y a la familia y respetar sus decisiones.

“El “debería” que debería estar es tratar de adaptarse a la decisión del paciente y la familia me parece, priorizar más las decisiones de ellos que por ahí los conocimientos nuestros en tratamientos, en técnicas. Por ahí escucharlos más a ellos, a la familia y al paciente y tratar de acompañarlo en ese sentido. Por ahí a veces el sistema no lo permite, y bueno, tratar de ver cómo se puede hacer para respetar sus decisiones.” (Sol)

Surge aquí también, con respecto a la figura del médico, la “impotencia” pero en este caso producida por el manejo actual de un paciente moribundo en los escenarios de salud.

“Ver al paciente ese que muere en el hospital por ahí da impotencia, por que por ahí es un paciente que se podría haber manejado de una manera diferente. Que podría haber estado en su casa, con sus cosas. Distinto es por ejemplo si es una muerte súbita o un accidente... se debería evitar directamente el accidente pero si es una patología ya instalada, el manejo debería ser otro y eso causa impotencia.” (Flavia)

### III) Percepción sobre las herramientas que reciben y las competencias que han desarrollado en relación al proceso del morir

#### **Oportunidades educacionales**

##### **a. El contacto con los pacientes**

Los estudiantes valoran la herramienta de la Práctica clínica que les brinda la carrera de Medicina como una oportunidad para observar las discrepancias que existen entre el desarrollo profesional y el modelo de atención que se propone en la carrera. Por un lado refieren observar cierta violencia y falta de empatía hacia el paciente moribundo. Por el otro, identifican las barreras del sistema sanitario que impiden el desarrollo ideal de la profesión basada en una atención centrada en el paciente y su familia.

##### **b. Aspectos comunicacionales en el desarrollo de las competencias**

Los estudiantes valoran más las experiencias vivenciales que la teoría. Reconocen la necesidad de ver conceptos básicos pero los consideran insuficientes. Refieren que la práctica es lo que les brindara el verdadero conocimiento para formar competencias y les permitirá afianzarlos para su profesión futura. Por ejemplo, a la hora de dar malas noticias, los estudiantes destacan el aprendizaje a partir de acompañar al tutor en dicha labor.

“Eran seis pasos, los aprendías de memoria, los explicabas y ¡Listo! Y creo que fue mucho más productivo para los chicos que fueron con el Dr. Gómez y acompañaron a dar una mala noticia. Entonces me parece que la experiencia que podamos, que no sé, es una manera distinta de hacerlo y que el día de mañana cuando tengas que dar una mala noticia te vas a acordar de ese momento más que los seis pasos de dos personas que se pusieron a escribir sobre malas noticias.” (Teresa)

Los estudiantes identifican haber visto contenidos de Cuidados Paliativos y algunos aspectos sobre el proceso del morir dentro del programa, lo que les permitió procesar la muerte como algo inherente al ser humano, y a la cual van a tener que enfrentarse inevitablemente a lo largo de la práctica clínica.

“Porque por ahí nosotros en la carrera ya vimos un poco lo que eran cuidados paliativos, o por ahí el tema de acompañar al paciente y entender que la muerte por ahí es una parte más a la que nos vamos a

enfrentar y no hay que evitarla a toda costa, sino por ahí entenderla, y que es una cosa más que puede estar y que va a estar varias veces, muchas veces.” (Flavia)

### **Propuestas de oportunidades educacionales y mejora de los espacios existentes**

#### **a. Formación de docentes para la mejora del modelo de rol**

Los estudiantes consideran que los docentes, que se formaron con un sistema de educación tradicional, deberían tener un espacio de reflexión sobre la muerte y el morir para enriquecer su propia práctica y la de los estudiantes a cargo.

“Creo que el aprendizaje hoy de nosotros depende mucho de esas personas, esas personas también tendrían que tener un ámbito para charlarlo, para plantearse; porque capaz que en su aprendizaje no lo tuvieron y a lo largo de su vida siguieron con ese aprendizaje.” (Carla)

#### **b. Momentos de reflexión en la práctica:**

Los estudiantes reconocen la necesidad de un espacio de reflexión, no sólo durante los primeros años, sino también durante el Ciclo clínico, para encontrarse, intercambiar experiencias y elaborar de forma continua aspectos de la práctica clínica que van más allá de la mera teoría.

“Para mí no está mal que esté dentro de la currícula generar espacios de debate, porque yo creo que por ahí todos nos podemos poner a pensar; pero hacer una reflexión no la hacemos siempre, entonces si se da un lugar donde podemos hacerla (...) pero si está el espacio, por ahí más de uno que no se lo iba a preguntar se lo pregunta.” (José)

### **Expectativas educacionales:**

Los estudiantes plantean que se sigan desarrollando estos temas durante el Ciclo Clínico. Piensan que debería reforzarse en seminarios de años más avanzados de la carrera por la diferente percepción que pueden tener de los mismos en diferentes momentos del programa

“Habría que ver qué pasa, nosotros ahora justo estamos medio en una transición de emm, cerrando otra etapa, ¿qué pasa ahora? Porque bueno de alguna manera en estos tres primeros años algo se habló del tema, algo sabemos, y ahora que estamos más en contacto con pacientes estaría bueno ver si alguien nos sigue acompañando en ese aprendizaje, si ya nos tenemos que manejar solos. Antes había seminarios, se charlaba en clase, ahora no sé si ese se mantiene o ya se va mas a lo que es la parte biológica. Pero bueno, yo creo que en los primeros años de la carrera algo se tocó del tema que me parece que está bueno, no sé si en todos lados será igual.” (Teresa)

### **Estudiantes de primer año de medicina**

#### **I) Percepción sobre la muerte y el proceso del morir**

Con un juego de asociación de palabras relacionan la muerte y el morir con dolor e impotencia. Es la impotencia del médico de no poder curar y la de otros actores, los familiares, que tampoco podrán hacer “nada” con ese familiar muriente que se va. Conciben que debiera hablarse más -incluso con la familia- de los pacientes que están por morir. La muerte les produce miedo, y no la propia, sino la de un ser querido. Temen a sufrir por esa pérdida, a enfrentarse a un “vacío” y, sumado a todo lo anterior, hace que eviten hablarlo.

“hay personas que lo pueden hablar más libremente. No tienen problema de hablar de la muerte. Yo en mi caso yo le tengo miedo a la muerte entonces, no a mi muerte sino a la muerte de mi familia o de alguien que quiero. No sé me cuesta mucho hablarlo y me retracto, lo evito.” (Mariana)

Son diversas las opiniones de cómo afrontarían la muerte de un paciente. Coinciden en que les afectaría, pero en la magnitud difieren: algunas piensan que lo podrán afrontar bien desde su rol profesional y otras que les revestiría gran dificultad, por lo que primero deberían tener una buena formación.

#### **II) El proceso del morir en relación a la práctica clínica**

Las estudiantes reconocen haber tenido pocas experiencias personales o familiares en relación a la atención de un paciente moribundo. Sin embargo perciben que la atención en general es “mala”, atribuyéndolo a que dejan solos a los pacientes. Consideran que el rol de otros profesionales de la salud, como “las enfermeras” influye en la calidad de atención y que su resultado está dado por todas las

partes involucradas. Aun reconociendo que debe ser difícil manejarlo, esbozan que algunos médicos se acostumbran a la muerte. Le otorgan un sentido peyorativo a esta actitud de la mayoría de los profesionales al tiempo que hacen hincapié en que se traduce en una mala comunicación de la muerte a la familia. Ven que convierten en “un trámite” una situación que para la familia es única.

### III) Expectativas educacionales y comprensión del propio aprendizaje en relación al proceso del morir

Las estudiantes de primer año perciben muy importante la formación de un médico/a en relación a la muerte y al morir. Se identifica el propio aprendizaje de conceptos como empatía y cómo dar una mala noticia del curso de ingreso, de las clases de Relación Médico- Paciente. Centran sus expectativas en que se comience la formación sobre la muerte y el morir y el trato hacia los pacientes moribundos en un momento temprano en la carrera.

“yo pienso que como estudiante tengo que formarme un montón con respecto al tema de la muerte...Prepararnos nos tienen que preparar creo que desde el primer día en ese sentido, porque es como la etapa más dolorosa, porque o sea todos están esperando que podamos ser médicos y que todos solucionen las enfermedades, que curemos, o sea pero la muerte como que como estábamos hablando hasta recién, es la parte chocante.” (Mariana)

Sin embargo, casi como una condición sine qua non conciben que los espacios educacionales y el contacto en la práctica con pacientes por morir deberían ser incluidos de forma gradual.

“A mí me parece que ya, la semana que viene, no me gustaría verlo, sin ver otras cosas antes que muerte, o sea me gustaría ver otras cosas antes, que se yo, pero bueno... si me tiene que pasar me va a pasar, pero no me gustaría” (Marcela)

Les aportaría a su formación el desarrollo de habilidades de comunicación verbal y no verbal, aprender a dar malas noticias, y seguir reforzando actividades que aborden la empatía. Desean aprender a comunicarse con niños y adultos en su paso por el pregrado, dada la importancia que le atribuyen a esta competencia en general, y en el proceso del morir que atraviesa un paciente, en particular.

“...o que nos ayude no solamente a cómo decirlo, sino también, qué, cómo decirlo, o con los gestos, muchas veces la cara tuya, un gesto lo cambia todo, no va a cambiar que se muera o no, pero quizás el momento de angustia lo pueda llegar a cambiar.” (Catalina)

Con respecto a la comunicación en relación a las malas noticias hay un disenso; algunas piensan que los resultados se relacionan a las habilidades de comunicación de cada una en otras esferas de la vida. Otras, consideran que como toda competencia médica, podría ser adquirida.

“Porque es algo que uno por ahí no está preparado desde lo cotidiano como por ahí en otras cosas...no es una charla en casa tomando un mate... no es algo cotidiano, entonces en el vocabulario, en la manera, la forma, el lenguaje verbal, no verbal, es muy importante y es algo que no traemos, sino que hay que ejercitarlo.” (Juliana)

Remarcan la importancia de acompañar al paciente considerándolo una competencia más a desarrollar. Surge que es bueno que estén acompañados por su familia y seres queridos, más aún en los momentos donde una mala noticia debe ser dada. Tienen la creencia la carrera que empezaron va a ser planteada con enseñanzas centradas en el humanismo en medicina, por eso la eligieron. Y que esto les brindará las herramientas necesarias para acompañar, entre otras citadas anteriormente.

“Yo creo que lo van a plantear (en la carrera) desde una perspectiva más humana, más de hacer hincapié en el acompañamiento, en el conocimiento, más desde ese lado lo veo yo, más que si se va a morir o no, eso veo que lo van a plantear en la carrera de acá.” (Habla Marcela, todas asienten)

## **DISCUSIÓN**

La presente investigación es uno de los pocos estudios a nivel local y de Argentina que explora la educación que reciben los estudiantes de medicina en relación a la muerte y al proceso del morir en términos de herramientas y competencias. Como así también, sus percepciones en diferentes etapas de la formación. Se han desarrollado estudios en Argentina destinados a la enseñanza[17] y percepciones en el final de la vida[26], pero aquí hemos trabajado sobre la voz de sólo uno de los actores clave de la formación: los estudiantes.

En 2013 se publicó el Liverpool Care Pathway Review[27] que propone que el cuidado paliativo y el cuidado en el final de la vida deben ser incluidos formalmente en los programas de educación médica en su país. No es el primer documento que habla de ello, hay distintos trabajos que desde años atrás reconocen la importancia de estos aspectos en la formación de los médicos[28,29].

La formación de los estudiantes de medicina de la UNS en los aspectos relacionados con el morir y la muerte es reconocida por ellos mismos como relevante y se valoriza su inclusión en los programas. Sus aportes en esta investigación no difieren de lo publicado acerca de estudiantes de otras latitudes. Los estudiantes de medicina reconocen que la muerte de un paciente es algo emocionalmente importante independientemente de cuán cerca hayan estado ellos de la situación[30].

Sin duda el desafío es cómo incluir estos temas dentro de los programas, y aquí necesariamente hay que tener en cuenta las distintas variantes que podrían haber en cada uno de ellos. Aquellos con modelos integrados y espiralados[31,32] permiten el desarrollo progresivo de las competencias incluyendo actividades de aprendizaje relacionadas con el tema desde etapas tempranas de la carrera[24]. Este es el caso de nuestra carrera. En nuestra investigación los estudiantes valoran que se comience en etapas tempranas a trabajar sobre el tema. Sin embargo proponen que persista en años superiores sobre todo en el ciclo clínico donde notan las deficiencias. Más aún, los estudiantes avanzados creen que aunque tienen herramientas necesarias, al recibirse no se sienten del todo conformes con ello.

Sin embargo deberíamos tener en cuenta lo que surge de nuestra investigación y que es común a lo que sucede en otras Universidades independientemente del programa que tenga y es la importancia del modelo de rol. Una interesante reflexión publicada por Lovell B. señala el sesgo que tienen los docentes de medicina en focalizarse en aspectos biomédicos en situaciones de final de la vida en lugar de los relacionados con el cuidado, los aspectos éticos, el control de los síntomas, el confort o simplemente las emociones que estas situaciones generan en el equipo de salud incluidos los estudiantes. Puntualiza además que esto es percibido, como vimos en nuestra investigación, como un déficit por los estudiantes que reclaman trabajar sobre estos aspectos también[33].

La relación que tiene el proceso del morir y la muerte con las humanidades médicas plantea la necesidad de las mismas como aspectos básicos muchas veces olvidadas en la formación de los médicos[34]. Los estudiantes tanto en etapas muy iniciales de la carrera como aquellos que están pronto a recibirse valoran la formación humanística que puede colaborar a comprender mejor estas situaciones.

Como hemos visto en nuestra investigación los de los primeros años tienen expectativas de recibir adecuada formación en situaciones de fin de la vida y los de años superiores valoran los espacios de reflexión (generados por situaciones reales o actividades con recursos literarios o cine) en los que se pudo o se podrá profundizar acerca de la muerte y el morir.

Finalmente nuestro trabajo está enmarcado en una Carrera que trabaja con un programa con un fundamento educacional central el aprendizaje colaborativo fundado en el constructivismo social. Tomando a Perkins D. y su Teoría Uno[35] el aprendizaje se da cuando existe una oportunidad adecuada y una motivación para ello. Hemos visto que los estudiantes tienen una motivación para enfocarse en el tema, por lo que tendremos entonces que trabajar en generar oportunidades de aprendizaje más adecuadas siendo este es uno de los desafíos que puede plantear nuestro trabajo.

Creemos que ayudará a reflexionar sobre la implementación de programas educacionales específicos y mejorar los espacios formales ya instaurados. Nuestros resultados podrían reforzar la importancia en el campo de la educación de los profesionales de la salud de las llamadas humanidades médicas y los cuidados paliativos.

Una de las limitaciones de nuestro trabajo es que obtuvimos la información de sólo uno de los actores la comunidad de aprendizaje. El presente estudio nos deberá animar a explorar percepciones de los docentes con mayor dedicación a los espacios de práctica de nuestra carrera y de otros actores clave. Esto será fundamental para completar las miradas acerca de la educación provista del tema de interés. Nos permitirá proseguir, a futuro, investigando la implementación de programas educacionales específicos y la mejora de los espacios formales ya instaurados. Creemos que esto favorecerá el cuidado integral de la diada paciente-familia que atraviesa dicha etapa trascendental de su vida. La educación y aprendizaje del accionar en dichas situaciones será la herramienta que permitirá naturalizar la muerte y el morir dejando de lado tabúes, tratar la totalidad del ser humano, brindar una atención en salud de

calidad preponderando valores e incorporar en las agendas políticas públicas que se traduzcan en una mejor accesibilidad al cuidado paliativo oncológico y no oncológico.

#### **CONCLUSIONES:**

- Los estudiantes de las tres cohortes perciben que es de suma importancia la formación del médico/a en relación a la muerte y al proceso del morir.
- Los estudiantes de medicina de la UNS al tener contacto con pacientes en diferentes escenarios de salud pueden formar una percepción de cómo es la práctica clínica actual con los pacientes que atraviesan el morir y luego mueren.
- Los estudiantes avanzados perciben que aunque cuentan con herramientas para afrontar el proceso del morir no están suficientemente preparados para hacerlo.
- A pesar de que no se menciona como entidad propia el Cuidado Paliativo, figuran sus fundamentos de acompañar, respetar la autonomía del paciente, el interés por comunicarse bien, contemplar la familia, entre otros.
- Los estudiantes acuerdan que la práctica en relación a la muerte y el morir debiera ser incorporada de forma gradual en los programas educacionales.
- Los estudiantes esperan que se incorpore o refuercen los espacios destinados al arte (cine, literatura y pintura) dada su utilidad para aprender sobre el afrontamiento de la muerte y el morir.
- Los estudiantes perciben la muerte, en general, con una connotación negativa, al igual que el resto de la sociedad.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcuaz, A. El modelo de atención de personas con enfermedades crónicas- MAPEC. En: Dirección de Promoción de la Salud y Control de Enfermedades No Transmisibles y el Programa Redes, del Ministerio de Salud de la Nación. Abordaje integral de personas con enfermedades crónicas no transmisibles. Argentina. 2014:p. 8-16.
2. Block, SD. Medical education in end-of-life care: the status of reform. *J Palliat Med.* 2002; 5(2): p. 243-8.
3. El proceso biocultural de morir. En: Clavel, JM. Bioética y antropología. U. P. Comillas. Madrid. 1998: p. 139-170.
4. Elias N. La soledad de los moribundos. 3era edición. México. Fondo de Cultura Económica; 2009.
5. Ariès P. El hombre ante la muerte. Taurus. Madrid. 1992.
6. Mellor P, Schilling C. Modernity, self-identity and the sequestration of death. *Sociology.* 1993; 27 (3): p. 411-431.
7. Luxardo, N, Alonso, JP, Esquivel, JC. La secularización de la asistencia al moribundo: del cuidado cristiano en hospices a la expertise técnica de la medicina paliativa. *Sociedad y Religion.* 2013; Vol. XXIII, (40): p. 114-142
8. Knight JA. Doctor-to-be: coping with the trials and triumphs of medical school. Appleton Century Crofts. New York. 1981.
9. Ceriani Cernadas JM. La educación médica actual, sus desviaciones y debilidades. *Arch Arg de Pediatría.* 2014.
10. Theodore Lidz. The 1951 Ithaca conference on psychiatry in medical education. *Journal of Medical Education.* 1995; 30 (12).
11. Eron L. The effect on medical education on medical students attitudes. *J. Med. Educ.* 1955; 30: p. 559-566.
12. Coutts L., Rogers J. Humanism: is it evaluation captured commonly used performance measures? *Teaching and Learning in Medicine.* 2000; 12 (1): p. 28-32
13. Sullivan AM, Lakoma MD, Block SD: The status of medical education in end-of-life care: a national report. *J Gen Intern Med.* 2003; 18:p. 685-695.
14. Gibbins J, McCoubrie R, Forbes K: Why are newly qualified doctors unprepared to care for patients at the end of life? *MedEduc.* 2011; 45: 389-399.
15. Bramajo, M, Marquis, A, Blanco, VM, González, A. El médico frente al paciente con la vida amenazada. *Sociedad Argentina de Cancerología.* 2006. Disponible en: Publicaciones, artículos. <http://www.socargcancer.org.ar/publicaciones.php>
16. Morrison L, Thompson B, Gill A. A Required Third-Year Medical Student Palliative Care Curriculum Impacts Knowledge and Attitudes. *Journal of Palliative medicine.* 2012; 15 (7)
17. Mutto, E, Primogero, C, Villar, MJ. La enseñanza del cuidado de los pacientes en estado terminal en Facultades de Medicina públicas y privadas de Argentina. *Revista Argentina de Educación Médica.* 2007; 1(1). p. 23-30.
18. Comisión Nacional de evaluación y acreditación universitaria. Contenidos básicos y carga horaria mínima total de las carreras de medicina (Anexo I). Disponible en: <Http://www.coneau.edu.ar/archivos/537.pdf>
19. Paz S; Clark D. Palliative care in Argentina: barriers, opportunities and recommendations for future developments. *International Observatory on End of Life Care, Institute for Health Research, Lancaster University. Prog Palliative Care.* 2004; 12: p. 303-311.
20. Ponencia: "La estructura curricular en medicina en la Argentina, el lugar que ocupan el humanismo y las ciencias sociales". Encuentro organizado por la Sociedad Argentina de Pediatría. Mayo 2014.
21. Cruciani F, Insausti A, Neculpán Segura L, Ojeda O, Cragno A, García Dieguez M, et al. The resident as a teacher. Thoughts from advanced students in a problem-based learning (PBL) model. *Revista Facultad de Medicina.* 2013; 13 (1).
22. Tavakol M, Sandars J. Quantitative and qualitative methods in medical education research: AMEE Guide No 90: Part II. *Medical Teacher.* 2014; 36. p. 838-848.
23. Kitzinger J. The methodology of Focus Groups: The importance of interaction between research participants. *Soc Health Illn.* 1994; 16(1): p. 103-121.
24. Glaser BG. y Strauss AL. *The Discovery of Grounded Theory. Strategies for Qualitative Research.* New York: Aldine Publishing Company. 1967.
25. Comité inscripto en el Registro Provincial de Comités de Ética en Investigación, dependiente del Comité de Ética Central en Investigación- Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires con fecha 17/09/10, bajo el N° 017/2010, al Folio 54 del Libro de Actas N° 1. Última acreditación: 27/09/2013.
26. Tripodoro VA, et al. Implementación del Liverpool Care Pathway en español en Argentina y en España: exploración de las percepciones de los profesionales ante el final de la vida. *Med Palliat.* 2013.
27. Department of Health. Independent report. Review of Liverpool Care Pathway for dying patients. More care, less pathway: a review of the liverpool care pathway. England: 2013. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/review-of-liverpool-care-pathway-for-dying-patients>

28. Wenk, R, de Lima L, Mutto E, Berenguel M, Centeno C. Encuentro sobre educación de cuidado paliativo en Latinoamérica. Recomendaciones sobre enseñanza en el pregrado y en el primer nivel de atención de salud. Medicina Paliativa. 2014. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1134248X14000287>
  29. Linklater GT, Bowden J, Pope L, Mc Fatter F, Hutchison SM, Carragher PJ, Walley J. et al. Developing learning outcomes for medical students and foundation doctors in palliative care: A national consensus-seeking initiative in Scotland. Med Teach. 2014; 36(5): p. 441-6.
  30. Rhodes-Kropf J, Carmody SS, Seltzer D, Redinbaugh E, Gadmer N, Block SD et. al. "This is just too awful; I just can't believe I experienced that..." Medical students' reactions to their "most memorable" patient death Academic Medicine: 80(7): p. 634-640.
  31. Harden RM. Ten questions to ask when planning a course or curriculum. Medical Education. 1986; 20(4): p. 356-365
  32. Harden RM. The integration ladder: a tool for curriculum planning and evaluation. Medical Education. 2000; 34: p. 551-57
  33. Lovell, B. "Do as I say, not as I do". Medical Teacher. 2014; 1-2, Early Online. Disponible en:  
[http://www.researchgate.net/publication/265791356\\_Do\\_as\\_I\\_say\\_not\\_as\\_I\\_do](http://www.researchgate.net/publication/265791356_Do_as_I_say_not_as_I_do)
  34. Britta M, Thompson JB, Vannata LE, Scobey MF. Providing context for a medical school basic science curriculum: The importance of the humanities. Medical Teacher. 2015; 1-6. Early Online.
  35. Perkins D. La escuela inteligente. Barcelona: Gedisa; 1997.
-

---



**INC**  
Instituto  
Nacional  
del Cáncer



Ministerio de Salud  
Presidencia de la Nación

## **Instituto Nacional del Cáncer**

Ministerio de Salud de la Nación  
Av. Julio A. Roca 781, Piso 10  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina  
[www.salud.gob.ar/inc](http://www.salud.gob.ar/inc)  
[inc@msal.gov.ar](mailto:inc@msal.gov.ar)