

nueva intervención terapéutica para tumores mamarios PR+/ErbB-2+ que consiste en el bloqueo específico de la translocación de ErbB-2 al núcleo. Otro campo de activa investigación en nuestro laboratorio son los efectos no genómicos de los progestágenos en el desarrollo del cáncer de mama. Demostramos que los progestágenos inducen el crecimiento celular; regulan la actividad de las metaloproteasas y la metástasis a través de la capacidad del PR de activar vías de señalización dependientes de la quinasa c-Src (10). Estos resultados sugieren una intervención terapéutica para tumores PR+ que consiste en el bloqueo específico de la función del PR como activador de las vías de señalización.

Actualmente estamos estudiando los efectos no genómicos de los progestágenos en el factor de transcripción AP-1, dímero compuesto por Jun y Fos, activados por fosforilación y cuya presencia en tumores mamarios está asociada a mal pronóstico. Nuestro objetivo es demostrar la activación de AP-1 por progestágenos y demostrar su participación en la transcripción del gen de ciclina D1 que contiene elementos respondedores a AP-1 en su promotor.

Referencias bibliográficas

1. Lange CA, Richer JK, Horwitz KB. Hypothesis: Progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. *Mol Endocrinol* 1999; 13(6): 829-36.
2. Balana ME, Lupu R, Labriola L, Charreau EH, Elizalde PV. Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 1999; 18(46): 6370-9.
3. Balana ME, Labriola L, Salatino M, Movsichoff F, Peters G, Charreau EH, *et al.* Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells. *Oncogene* 2001; 20(1): 34-47.
4. Salatino M, Beguelin W, Peters MG, Carnevale R, Proietti CJ, Galigniana MD, *et al.* Progestin-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 2006; 25(59): 7723-39.
5. Labriola L, Salatino M, Proietti CJ, Pecci A, Coso OA, Kornblihtt AR, *et al.* Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23(3): 1095-111.
6. Proietti C, Salatino M, Rosembliht C, Carnevale R, Pecci A, Kornblihtt AR, *et al.* Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 200; 25(12): 4826-40.
7. Proietti CJ, Beguelin W, Flaque MC, Cayrol F, Rivas MA, Tkach M, *et al.* Novel role of signal transducer and activator of transcription 3 as a progesterone receptor coactivator in breast cancer. *Steroids* 2011; 76(4): 381-92.
8. Proietti CJ, Rosembliht C, Beguelin W, Rivas MA, Diaz Flaque MC, Charreau EH, *et al.* Activation of Stat3 by heregulin/ErbB-2 through the co-option of progesterone receptor signaling drives breast cancer growth. *Mol Cell Biol* 2009; 29(5): 1249-65.
9. Beguelin W, Diaz Flaque MC, Proietti CJ, Cayrol F, Rivas MA, Tkach M, *et al.* Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3. *Mol Cell Biol* 2010; 23: 5456-72.
10. Carnevale RP, Proietti CJ, Salatino M, Urtreger A, Peluffo G, Edwards DP, *et al.* Progestin 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): 1335-58.

LABORATORIO DE CARCINOGENESIS HORMONAL

Crecimiento del cáncer de mama dependiente de receptores hormonales: aportes de un modelo experimental

Growth of hormone receptor dependent breast cancer: Contributions of an experimental model

Crescimento do câncer de mama receptor de hormônio dependente: contribuições de um modelo experimental

Claudia Lanari, Virginia Novaro, Carolina Lamb, Victoria Fabris, Paola Rojas, Sebastián Giulianelli, María Gorostiaga, Victoria Wargon, Tomás Guillardoy, María Laura Polo, Marina Riggio, Gonzalo Sequeira, Ana Sahores, María Pampera

Resumen

Si bien los estrógenos han demostrado tener un rol protagónico en el cáncer de mama, hoy se sabe que la progesterona, así como sus derivados sintéticos, ejercen roles proliferativos tanto en la glándula mamaria normal como

neoplásica. Utilizando un modelo experimental de cáncer mamario murino, iniciado en la Academia Nacional de Medicina y trasladado al IBYME en el año 1995, demostramos la importancia de los fibroblastos asociados a tumor en la provisión de factores de crecimiento que activan en forma ligando-independiente a los receptores de progesterona (RPs) en las células tumorales. En este artículo mencionamos la importancia por un lado de la proporción de isoformas del RP en la determinación de la respuesta al tratamiento hormonal, y por otro, los mecanismos por los cuales el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) estromal participaría en el crecimiento tumoral imitando la acción de la hormona.

Palabras clave: cáncer de mama * receptores de progesterona * hormono independencia * estroma * factor de crecimiento fibroblástico * receptores de factor de crecimiento fibroblástico

Summary

It is well known that estrogens are key players regulating breast cancer growth. In addition, there is compelling evidence pointing out that progestins induce proliferative effects in normal and in neoplastic mammary glands. Using a murine breast cancer model, first developed in the National Academy of Medicine in Buenos Aires, and then moved to the IBYME in 1995, we demonstrated that carcinoma associated fibroblasts provide growth factors such as fibroblast growth factor 2 (FGF2), which are involved in the ligand independent activation of progesterone receptors (PR) of tumor cells. This article briefly describes, on one hand, the relevance of the evaluation of the PR isoform ratio to predict hormone responsiveness, and on the other hand, the mechanisms by which stromal FGF2 mimics the effects of progesterone to stimulate tumor growth.

Key words: breast cancer * progesterone receptors * hormone independence * stroma, * fibroblast growth factor * fibroblast growth factor receptors

Resumo

Embora os estrógenos tenham demonstrado ter um papel protagônico no câncer de mama, hoje se sabe que a progesterona, bem como seus derivados sintéticos, exerce papéis proliferativos tanto na glândula mamária normal quanto neoplásica. Utilizando um modelo experimental de câncer mamário murino, iniciado na Academia Nacional de Medicina e trasladado ao IBYME no ano 1995, demonstramos a importância dos fibroblastos associados a tumor na provisão de fatores de crescimento que ativam em forma ligando-independente os receptores de progesterona (RPs) nas células tumorais. Neste artigo mencionamos a importância, de um lado, da proporção de isoformas do RP na determinação da resposta ao tratamento hormonal, e do outro, dos mecanismos pelos quais o fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2) estromal participaria no crescimento tumoral imitando a ação do hormônio.

Palavras chave: câncer de mama * receptores de progesterona * hormônio independência * estroma * fator de crescimento fibroblástico (FGF) * receptores de FGF (FGFR)

Cuando en el año 1983, trabajando en el Laboratorio de Leucemia Experimental de la Academia Nacional de Medicina con el Dr. A Molinolo y la Dra. CD Pasqualini, teníamos ratones BALB/c tratados con acetato de medroxiprogesterona (MPA) para inhibir la fibromatogénesis inducida por un cuerpo extraño, y aparecieron carcinomas mamaros, nos sorprendimos. Si bien había datos que vinculaban a los progestágenos con cáncer de mama, la mayoría de ellos apuntaban a los estrógenos como hormonas promotoras y/o iniciadoras en cáncer de mama. Hoy, casi treinta años después, no quedan dudas que los progestágenos participan en el desarrollo del cáncer de mama. El uso de MPA en la terapia de reemplazo hormonal fue lo que marcó la diferencia. Las evidencias experimentales estaban a la vista sin embargo el consenso se obtuvo después de la publicación del *WHI Study* en Estados Unidos en el 2002 (1) y del *Million Study* en Inglaterra 2003 (2)(3), que mostraron claramente un aumento de cáncer de mama en mujeres tratadas con ambas hormonas.

Las investigaciones en nuestro laboratorio se basaron en caracterizar este nuevo modelo experimental en el cual la mayor parte de los tumores de mama se clasificaron como carcinomas mamaros ductales infiltrantes con expresión de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) y se mantenían por transplantes singéneos en ratones tratados con hormona. Ocasionalmente surgían variantes tumorales con crecimiento autónomo, llamadas hormono-independientes por su capacidad de crecer sin el aporte exógeno de hormona. Cuando se evaluó la capacidad de los tumores de responder a distintos tratamientos hormonales descubrimos que muchos de ellos desaparecían casi completamente con tratamiento con antiprogestágenos o estrógenos y parcialmente con tamoxifeno. Otros tumores eran resistentes desde el comienzo; sin embargo, todos mantenían la expresión de RE y RP. Esto motivó que la mayor parte de las investigaciones de nuestro laboratorio, ya mudado en 1995 al IBYME se han dedicado a tratar de comprender los mecanismos por los cuales los tumores se vuelven hormono independientes o se hacen resistentes a la terapia hormonal (revisado en (4)).

Correlación de expresión de isoformas de receptor de progesterona y respuesta al tratamiento hormonal

Existen dos isoformas del RP ampliamente reconocidas que se transcriben a partir del mismo gen: la más grande es la isoforma B (RP-B) de 115 kDa y la más pequeña la isoforma A (RP-A) de 83 kDa en ratón y 94 kDa en humanos. La isoforma RP-A se ve más comprometida en cáncer de mama, ya que hay un mayor porcentaje de tumores RP positivos que expresan mayores niveles de

isoforma A que B. A su vez éstos responderían menos al tamoxifeno en comparación con los que expresan más isoforma B que A (5). Nuestro grupo demostró que el perfil de isoformas de RP es diferente en carcinomas mamarios con distinta respuesta hormonal. Los tumores HI que regresionaban con antiprogéstágenos o estrógenos expresaban altos niveles de RP-A, mientras que los resistentes constitutivos o los que fueron experimentalmente manipulados para ser resistentes (resistencia adquirida) mostraban mayores niveles de RP-B. Eso nos llevó a evaluar el porqué del silenciamiento de RP-A en tumores resistentes. Lo que sabemos al día de hoy es que los tumores resistentes constitutivos muestran metilación del promotor. Por lo tanto, el tratamiento de estos tumores con agentes desmetilantes, induce la re-expresión de RP-A y la consiguiente recuperación de la sensibilidad a los antiprogéstágenos (6). No ocurre lo mismo con los resistentes adquiridos, pero en éstos, el tratamiento con estrógenos induce la reexpresión de RP-A, respondiendo ahora a la terapia conjunta de estrógenos y antiprogéstágenos (7). Esta ida y vuelta de RP-A sugiere la presencia de mecanismos regulatorios epigenéticos más allá de la metilación que se están estudiados actualmente en el laboratorio. El mensaje clínico de esta parte de nuestro trabajo, es la sugerencia que aun los tumores que se hicieron resistentes a la terapia endócrina pueden ser direccionados para otro ciclo de tratamiento.

Quién activa a los receptores hormonales cuando las hormonas no están presentes o lo están en muy pequeña cantidad?

El otro tema que nos interesó es conocer qué es lo que activa a los receptores hormonales en tumores HI de modo tal que el bloqueo de los receptores permite frenar al crecimiento tumoral. Utilizamos nuestro modelo experimental para tratar de contestar este interrogante. Observaciones del laboratorio nos mostraban primero, que es muy difícil cultivar estos tumores en ausencia de fibroblastos, cuando los cultivos estaban contaminados con fibroblastos crecían mucho mejor y por otro lado, cuando las células tumorales purificadas de un tumor HD o de uno HI eran cultivados en plástico, eran indistinguibles entre sí. Esto sugería claramente que factores del huésped participan en el crecimiento HI. Uno de los componentes que conforma el estroma tumoral son los fibroblastos asociados a carcinoma (CAF). Postulamos entonces que los CAF de un tumor HI producirían factores de crecimiento que activarían a receptores de las células epiteliales que a su vez interactuarían con RP para activar la proliferación celular. Nos concentramos en el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) y sus receptores FGFR. Elegi-

mos este factor porque de los varios estudiados en su momento, fue el único capaz de reemplazar al MPA en su efecto proliferativo *in vitro*.

De acuerdo a la hipótesis planteada, demostramos que el estroma del tumor HI es diferente al del tumor HD (8) y que *in vitro* los CAF de los tumores HI producen más FGF2 que los tumores HD. El FGF2 por otra parte induce la activación de los RP. Demostramos asimismo que el FGF2 activa al FGFR2 e induce la traslocación nuclear del mismo de modo que interaccionaría con el RP junto con STAT5 induciendo la transcripción de genes blanco, como *MYC* y *Ciclina D1*, y la expresión de diversas proteínas reguladas por progesterona. La interacción entre FGFR-2 y RP fue confirmada por estudios de microscopía confocal, co-inmunoprecipitaciones y ensayos de EMSA en placa. Para confirmar la hipótesis planteada que el eje FGF2-FGFR-2 está involucrado en el crecimiento HI demostramos que el inhibidor de FGFR (PD173074) inhibe el crecimiento HI y que la administración exógena de FGF2 a un tumor HD es capaz de estimular el crecimiento de un tumor imitando la acción de la hormona (9) (10).

Todos estos estudios fueron corroborados en la línea celular humana T47D que se comportó de manera muy similar a los tumores de nuestro modelo experimental. Más aun, la transfección constitutiva de un dominante activo del FGFR-2 a células T47D logró volverlas tumorigénicas al implantarlas en ratones inmunosuprimidos en ausencia de hormona (11).

En conjunto estos resultados muestran la participación del estroma en el crecimiento tumoral y sugieren el uso de terapias combinadas incorporando a inhibidores de FGFR en conjunto con la terapia endócrina para demorar la resistencia endócrina.

Referencias bibliográficas

1. Women's Health Initiative. 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): 321-3.
2. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362(9382): 419-27.
3. Beral V, Reeves G, Bull D, Green J. Breast Cancer Risk in Relation to the Interval Between Menopause and Starting Hormone Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011; 16: 103(4): 296-305.
4. 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(2): 333-50.
5. Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, *et al*. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res* 2004; 10(8): 2751-60.

6. Wargon V, Fernandez SV, Goin M, Giulianelli S, Russo J, Lanari C. Hypermethylation of the progesterone receptor A in constitutive antiprogesterin-resistant mouse mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126(2): 319-32.
7. Wargon V, Helguero LA, Bolado J, Rojas P, Novaro V, Molinolo A, *et al.* Reversal of antiprogesterin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 116(3): 449-60.
8. Giulianelli S, Herschkowitz JI, Patel V, Lamb CA, Gutkind JS, Molinolo A, *et al.* MPA-induced gene expression and stromal and parenchymal gene expression profiles in luminal murine mammary carcinomas with different hormonal requirements. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 129(1): 49-67.
9. Giulianelli S, Cerliani JP, Lamb CA, Fabris VT, Bottino MC, Gorostiaga MA, *et al.* Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: A role for the FGF-2/FGFR-2 axis. *Int J Cancer* 2008; 123(11): 2518-31.
10. Cerliani JP, Giulianelli S, Sahores A, Wargon V, Gongora A, Baldi A, *et al.* Mifepristone inhibits MPA-and FGF2-induced mammary tumor growth but not FGF2-induced mammary hyperplasia. *Medicina (B Aires)* 2010; 70(6): 529-32.
11. Cerliani JP, Guillardoy T, Giulianelli S, Vaque JP, Gutkind JS, Vanzulli SI, *et al.* Interaction between FGFR-2, STAT5 and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer Res* 2011; 15; 71(10): 3720-31.

LABORATORIO DE HORMONAS Y CÁNCER

Receptores α_2 -adrenérgicos y cáncer de mama

α_2 -adrenoceptors and breast cancer

Receptores α_2 -adrenérgicos e câncer de mama

Isabel Alicia Lüthy, Ariana Bruzzone,
Cecilia Pérez Piñero, Lilian Castillo

Resumen

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres. Las experiencias estresantes causan la liberación de adrenalina y noradrenalina, que se unen a 9 receptores adrenérgicos. Nuestro grupo ha trabajado durante los últimos

años en la caracterización de los receptores α_2 -adrenérgicos y en el efecto de su estimulación en diferentes modelos experimentales de cáncer de mama para contribuir a mejorar la calidad de vida de las pacientes. En células tumorales y no tumorales mamarias humanas encontramos que las catecolaminas endógenas adrenalina y noradrenalina y el agonista específico α_2 -adrenérgico clonidina estimulan significativamente la proliferación celular. La inhibición de los niveles de AMP cíclico correlacionan con la estimulación de dichos receptores. Hemos descrito la expresión de por lo menos un subtipo de receptor α_2 -adrenérgico en estas líneas tanto a nivel de ARNm (medida por RT-PCR) como de proteína (por inmunocitoquímica y unión de un antagonista radiactivo). Además hemos demostrado que los agonistas α_2 -adrenérgicos aumentan el crecimiento tumoral en modelos experimentales de cáncer de mama (tumores inducidos originalmente por acetato de medroxiprogesterona y xenotransplantes de células tumorales humanas). En todos los casos el antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina inhibió el crecimiento de los tumores control, pudiendo pensarse en utilizarlo como terapia adyuvante.

Palabras clave: cáncer de mama * receptores adrenérgicos * clonidina * rauwolscina

Summary

Breast cancer is the most frequent women neoplasia. Stressing experiences enhance adrenalin and noradrenalin release. These catecholamines bind to 9 different adrenoceptors. Our group has described and characterized the α_2 -adrenoceptors and analyzed their effect in breast cancer models in order to contribute to a better quality of life in patients. The stimulation of these receptors with adrenalin, noradrenalin or α_2 -adrenergic agonists in both tumor and non-tumor human breast cells significantly stimulates cell proliferation, in correlation with inhibited cyclic AMP levels. At least one α_2 -adrenergic subtype is expressed in every cell line studied at the mRNA level (by RT-PCR) and at the protein level (immunocytochemistry and a radioactive antagonist binding). We have also found that the α_2 -adrenergic agonists enhance tumor growth in experimental models of breast cancer (transplanted mouse tumors originally induced by medroxyprogesterone acetate and human breast cancer cells xenotransplanted in nude mice). In every tumor model the α_2 -adrenergic antagonist rauwolscline inhibited tumor growth, suggesting the possibility of its utilization as an adjuvant therapy.

Key words: breast cancer * adrenoceptors * clonidine * rauwolscline

Resumo

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres. As experiências estressantes causam a liberação de adrenalina e noradrenalina, que se unem a 9 receptores adrenérgicos. Nosso grupo tem trabalhado durante os últimos anos na caracterização dos receptores α_2 -adrenérgicos e no efeito de sua estimulação em diferentes modelos experi-