

El *imprinting* de la Sección Leucemia Experimental en mi  
camino hacia la investigación.

**Claudia Lanari**

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

**Dirección postal:**

**Dra. Claudia Lanari**

Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Vuelta de Obligado 2490

1428 Buenos Aires

lanari.claudia@gmail.com

## **Resumen**

En esta reseña histórica trato de resumir 33 años de investigación que comenzaron en la Sección Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina y luego continuaron y dieron lugar a la creación del laboratorio de Carcinogénesis Hormonal en el IBYME en el año 1995. Se cuenta en detalle el origen del modelo de cáncer de mama murino por inducción de acetato de medroxiprogesterona, los aportes principales a lo largo del tiempo y cómo esto fue el inicio de un trabajo con proyección clínica que jerarquiza el rol de los receptores de progesterona en cáncer de mama. Se pone especial énfasis en los primeros años que marcaron el rumbo de las investigaciones.

## **Abstract**

In this review I tried to summarize 33 years of scientific research which started at the Laboratory of Experimental Leukemia, Institute of Hematologic Investigations, National Academy of Medicine, and then in 1995, to the creation of the Lab of Hormonal Carcinogenesis at the Institute of Biology and Experimental Medicine (IBYME). The origin of the experimental breast cancer model known as *The MPA-induced breast cancer model* is reviewed as well as the main discoveries and preludes that led us to design a clinical project to evaluate the role of progesterone receptors in breast cancer patients. Special emphasis is given to the imprinting that the first years of research had in the rest of the entire career.

**Palabras clave:** cáncer de mama, progesterona, receptores de progesterona, isoformas, hormono dependencia

**Key words.** Mammary carcinomas, breast cancer, progesterone receptor isoforms, hormone –independence

### **En la Academia...**

Durante mi carrera universitaria, mientras estudiaba, trabajé como secretaria de la revista MEDICINA durante la mañana y mi jefa directa era la Dra. Christiane Pasqualini. La *Dra.* de ahora en más. Luego tuve mi primer bebé y me dediqué a terminar la carrera. Ya cerca del final vi un cartelito en la facultad que decía que el Dr. Pivetta incorporaba becarios o técnicos. Cuando la llamé a la Dra. para preguntarle si lo conocía y si sabía de qué tipo de trabajo se trataba, me dijo inmediatamente que si quería trabajar en investigación fuera a su laboratorio, Programa Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas (PLEX) en la Academia Nacional de Medicina (la Academia), ya que justamente estaban haciendo las presentaciones para becas al CONICET y tenía dos candidatas que no estaban muy seguras de querer tomar el cargo. Por supuesto había que hacer un proyecto de beca en tres días y la Dra. decidió darme un tema que era completamente distinto al tema del laboratorio pero que reunía una temática en la cual estaba trabajando mi padre, el Dr. Alfredo Lanari en pacientes y en la cual ella había trabajado en Chile con el Dr. Lipschutz en cobayos. El tema de mi beca consistía en estudiar el efecto de la progesterona sobre fibrosarcomas murinos. Me tenía que recibir antes del 1ro. de Abril de 1980, y para ello faltaban sólo 4 meses. La Dra. y el Dr. Rabassa, asesor de la Sección Leucemia Experimental, decidieron darme un tema para la tesina de Licenciatura, creo que la primera del Laboratorio, que consistía en tratar de entender por qué se había perdido una cepa endocriada de ratones BALB/c. El trabajo era en realidad, un análisis de todos los apareos que se habían hecho en los últimos diez años, trabajo que era factible de realizar en un tiempo breve. Asimismo me hice cargo del reemplazo de verano del Bioterista Antonio Morales en sus vacaciones. Este paso por el

Bioterio manteniendo la cría de todas las cepas me sirvió para poder estar embebida en temas de Bioterio y aún hoy recuerdo esos días de verano y de olor de ratón impregnado en el pelo imposible de ocultar en el colectivo....

La tesina salió y publicamos el trabajo en la revista Mendeliana. Era un tema tan ajeno al de la Sección Leucemia Experimental que los que me ayudaron fueron además del Dr. Rabassa, Frida Bergman de Rosario, y la Dra. Susana Merani con quien posteriormente seguí colaborando. Así me gradué y presenté mi Seminario de Licenciatura el último día hábil de marzo en el día de marzo más caluroso registrado desde 1886, en el cual casi cierran la facultad debido a la intensa ola de calor; los 3 docentes y yo.

Cuando comencé mi beca, Abril de 1980, Miguel Angel Basombrio ya estaba trabajando en Chagas con planes de irse a Salta y trabajaba en forma muy aislada junto con sus dos técnicos Volny y Beatriz. Luego estaba el grupo de Isabel Piazzón, Marta Matusевич y Adriana Deroche que trabajaban en inmunología y Raúl Ruggiero que trabajaba en virus oncogénicos. Éramos todos becarios chicos y no había investigadores generación intermedia. La Dra., ya no estaba en la mesada y Basombrio estaba más preocupado por sus vinchucas que por nuestros problemas. Todos aprendíamos del técnico Juan Portaluppi a quien le encantaba enseñarnos, y siempre tenía una respuesta para todo. Me quería particularmente, y lo recuerdo con mucho cariño. Al poco tiempo entraron Oscar Bustuoabad, un investigador formado en embriología, y Daniel Bonfil, otro estudiante de Biología a trabajar en áreas más cercanas a las de Raúl. En ese momento lo único que se hacía eran experimentos *in vivo* con pasajes de tumores y *las chicas* injerto contra huésped, pesando ganglios. Comencé explorando el efecto de la progesterona (Pg) y del acetato de medroxiprogestrona (MPA) sobre el crecimiento de fibrosarcomas inducidos por cuerpo extraño que Juan mantenía por pasajes seriados.

Los resultados eran muy pobres. Sólo tuvimos algún efecto protector cuando inoculábamos los tumores junto con la droga en el mismo lugar. Era un sistema muy sucio, aunque específico, ya que no ocurría lo mismo cuando trasplantábamos algún carcinoma del cual ya no recuerdo el nombre. Al ser un tema totalmente nuevo en el laboratorio no tenía mucha colaboración de los otros becarios, quienes estaban a su vez sacando adelante sus tesis doctorales.

Por otra parte decidimos explorar el efecto *in vitro* de la progesterona sobre la proliferación celular de fibrosarcomas. Esto fue un desafío porque no teníamos infraestructura para ello. Basombrío me mostró una vez cómo hacía cultivos de fibroblastos embrionarios, sin flujo laminar, con sólo un mechero. Sin embargo, en la Academia había laboratorios con la infraestructura para hacerlo. Exploré ayuda en citogenética con Mabel Labal, y luego, con la llegada de María Marta Bracco al primer piso de la Academia comencé a poner a punto los cultivos de fibrosarcomas por método del explanto. Fue muy interesante porque apliqué técnicas que eran exclusividad de inmunólogos al área de oncología. Para ese entonces casi no se usaban los ensayos de timidina tritiada para evaluar proliferación y la liberación de Cr51 para evaluar citotoxicidad en el área de oncología. Así fue como mostramos que los fibroblastos son más sensibles a la progesterona que las células epiteliales, pero en concentraciones muy altas, casi cercanas al límite de solubilidad (100  $\mu$ M). Resultado no muy fácil de explicar y con poca proyección fisiológica.

Mientras trataba de aprender las técnicas de cultivo y releendo los trabajos del laboratorio pensé que quizás era muy difícil detener el crecimiento de un fibrosarcoma con una hormona, un poco naive, teniendo en cuenta que los tumores desmoides de pacientes o las fibromatosis agresivas que habían respondido bien en la clínica a la progesterona no son neoplasias malignas. Allí di un giro en la investigación. Por un lado

diseñamos los experimentos para investigar el efecto de los progestágenos sobre la inducción de los fibrosarcomas, experimentos que llevaban un año y medio, y por otro, volvimos al modelo de cobayo de Lipschutz induciendo tumores desmoides y estudiamos los efectos de hormonas.

Para ese entonces andaban dando vueltas en la Sección 2 patólogos jóvenes que hacía poco habían concluido sus residencias, y que se habían incorporado al Centro de Estudios Oncológicos, ávidos de hacer ciencia. Para todos nosotros que hacíamos oncología sabíamos que era exactamente lo que necesitábamos, el nexo entre nuestras fantasías experimentales y la realidad de la clínica. Supongo que por afinidades personales el grupo de Raúl, Oscar y Daniel se fue asociando con Roberto Meiss y yo tuve más afinidad con Alfredo Molinolo. Este fue el comienzo de una estrecha colaboración que continúa luego de 30 años. Se entusiasmó con el proyecto y una vez por semana revisábamos los ratones en busca de fibrosarcomas alrededor del cilindro de vidrio, en los grupos de ratones tratados o no con acetato de medroxiprogesterona (MPA). Así fue como vimos con sorpresa la aparición de tumores no relacionados al cilindro de vidrio en animales tratados con MPA. Este experimento que fue uno de los pilares de mi tesis doctoral, nos había abierto la puerta al estudio del cáncer de mama experimental, tema que seguimos estudiando. Vimos por otro lado que el MPA disminuía la cápsula fibrosa alrededor del cuerpo extraño y así explicábamos su efecto protector. El trabajo combinando el efecto de MPA en fibrosarcomas ya inducidos junto con los resultados de inhibición de inducción por cuerpo extraño lo mandamos a publicar a Tumori. Afortunadamente lo rechazaron porque les parecía que la inoculación conjunta de droga y tumor era impublicable. Nos hicieron un gran favor, sacamos esa parte y publicamos los experimentos de protección en el JNCI una revista que actualmente tiene un factor de impacto mayor a 14 <sup>1</sup>.

Este fue un punto de inflexión, seguíamos con los fibrosarcomas o con el cáncer de mama? Alfredo estaba muy entusiasmado con los tumores de mama, porque histológicamente eran muy similares a los cánceres de mama humanos <sup>2</sup> y sin mucho esfuerzo me convenció. Sabíamos muy poco de receptores hormonales, y era el auge del estudio de los mismos por métodos de *binding*. Recién aparecían los primeros anticuerpos monoclonales para evaluar receptor de estrógenos en biopsias.

Por otra parte, para ese entonces ya teníamos los primeros tumores desmoides del modelo de cobayo inducidos por tratamiento continuo con estrógenos, y se los habíamos enviado al Dr. E. Charreau del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) para la medición de receptores de progesterona (RP) por *binding*. Estaba sorprendido por los valores tan altos obtenidos, y esto nos llevó a publicar estos datos <sup>3</sup>. Llamentablemente no seguimos con este tema que es un área de vacancia aun hoy. La forma en que cuidábamos los cobayos, casi en forma doméstica, juntando pasto de la Plaza Las Heras, es impensable en los días de hoy.

Si ahora ponemos en *Pubmed*, *medroxyprogesterone acetate*, y miramos lo que hay publicado antes de 1983, es muy poco y en general dirigido para el tratamiento de cáncer de mama. El dogma en cáncer de mama de la época era: estrógenos inducen, progestágenos protegen... era un tema desafiante pero nos encontrábamos con comentarios del estilo de para qué estudiar algo que en el ratón es al revés que en el humano?

La razón por la que seguimos fue instinto... pensamos que no había evidencias claras de que fuera así y sobre todo pensamos que era un modelo muy lindo para estudiar mecanismos de adquisición de hormono-independencia y que los mecanismos en sí seguramente eran generalizables y en el peor de los casos lo que aprendiéramos válido para una hormona en ratón podría ser extrapolable a otra en humano.

Nuestros grupos experimentales del experimento cuyo objetivo era investigar el efecto del MPA en la tumorigénesis por cuerpo extraño eran cajas del 1 al 12 con 4 ratones cada uno, el grupo A: control, el grupo B, cilindro de vidrio solo, grupo C, cilindro de vidrio y MPA del mismo lado y D, MPA contralateral al cilindro de vidrio. De ahí surge el famoso tumor denominado C4-HD (aunque algunos grupos que lo usan le han quitado el guión). Se denominó así porque surgió en el grupo C, caja 4, y al transplantarlo en ratones BALB/c sólo creció en ratones tratados con hormona (HD), de ahí su nombre C4-HD. Igualmente el C7-HD, a partir del cual surgió la variante HI, C7-HI. Hoy todavía seguimos usando estos tumores.

Defendí mi tesis en agosto de 1985, teniendo como jurado de lujo a la Dra. E. Sacerdote de Lustig y al Dr. Carlos Lantos. A la semana iba a presentar el trabajo en la primer Gordon Conference (GRC) de *Hormonal Carcinogenesis* lo que me tenía muy ansiosa. La Dra. me había entusiasmado mucho para ir y en esa época no había mucho apoyo económico para estos viajes. Para pagar el viaje, el *chair* de la GRC, el Dr. J. Li, me consiguió mil dólares para pagar los gastos de inscripción y el Dr. Claudio Conti que había presentado un Seminario en la Sección unos meses antes, y también iba a asistir a la misma reunión me ofreció dar una charlita en su Laboratorio, en el MD Anderson de la *University of Texas at Smithville*, y me podía conseguir fondos para ello. La verdad es que estoy muy agradecida a Claudio por esa oportunidad y creo que ha ayudado de la misma manera a muchísimos argentinos en sus carreras científicas. En esa primera reunión científica tuve la oportunidad de conocer a otros argentinos como los Dres. Irma y José Russo y Carlos Sonnenschein con los cuales sigo en contacto. Los Russo habían descripto la glándula mamaria de rata durante la lactancia y preñez, proponiendo que la diferenciación de la glándula mamaria es importante para inhibir la



carcinogénesis química <sup>4</sup>, y Sonnenschein me fascinaba por su forma de pensar diferente y desafiar los dogmas <sup>5</sup>. Esta primera GRC me *abrió la cabeza...*

En los 10 años siguientes que estuve en la Sección Leucemia Experimental fueron años de afianzamiento. No teníamos dudas con Alfredo Molinolo que nos complementábamos perfectamente, y no sólo actuaba como patólogo sino que planeábamos y escribíamos juntos los trabajos. Él intentaba terminar de escribir su tesis doctoral en cáncer de próstata e iba con su bochita de la IBM en busca de máquina de escribir disponibles por toda la Academia, mientras a su vez trabajaba no sólo conmigo sino con investigadores de citogenética y otros como Mirta Giordano, Marina Palermo y Martín Isturiz. Para esa época decidimos incorporar un estudiante para hacer su tesis de licenciatura y así fue como ingresó al laboratorio Edith Kordon, recomendada por Alicia Fontán la becaria del Dr. D. Sordelli, recientemente incorporado a la Sección, quien a su vez trajo la primer computadora al Laboratorio.

Edith Kordon revisaba los ratones del experimento a largo plazo que habíamos diseñado mientras a su vez estudiábamos los efectos de distintas hormonas sobre el crecimiento de tumores HD. En ese momento el elegido fue el C7-HD y éste terminó siendo el tema de su tesis de licenciatura y parte luego de la de doctorado <sup>6</sup>. Alfredo decidió realizar un postdoctorado en NIH bajo la dirección del Dr. Schlom y durante esos tres años Edith realizaba su tesis doctoral. Patricia Pazos, una estudiante que hacía una pasantía por la Sección comenzó a hacer la tesina y luego la tesis doctoral en la inducción de carcinomas mamarios por metilnitrosurea (MNU) <sup>7</sup>, ya que luego de asistir a la segunda GRC en el año 1987, me di cuenta que no había nada hecho de este tema en ratón. Los modelos de la época eran carcinogénesis mamaria en rata y el modelo se carcinoma renal inducido por estrógenos en los *Syrian hamsters* <sup>8</sup>. Ratón poco y nada.

Yo mientras tanto iba al IBYME una vez por mes para hacer receptores hormonales, de prolactina y receptores para EGF. Patricia Elizalde que trabajaba en Citogenética en la Academia me pidió que le hiciera un contacto con el Dr. Charreau ya que ella trabajaba en factores de crecimiento y de transformación en cáncer humano y así fue como ella ingresó luego al laboratorio del Dr. E. Charreau a estudiar los factores de crecimiento en nuestro modelo experimental. Mientras tanto, yo intentaba poner a punto los cultivos primarios de los carcinomas mamarios inducidos por MPA, tarea que no fue nada fácil. Ya habíamos instalado un cuarto de cultivo con flujo laminar, estufa gaseada y microscopio invertido, todo esto gracias a que Guillermo Muchinik iba a ir en un principio a la Sección a trabajar en SIDA. Yo había aprendido del laboratorio de Sonnenschein las técnicas para *charcolizar* el suero para evitar los esteroides endógenos. Isabel Luthy, regresaba al IBYME luego de una estadía postdoctoral con Labrie y tenía experiencia en cáncer de mama y técnicas de cultivo y en una charla informal en IBYME quedó encantada de colaborar. Así fue como comenzamos también una amistad que continua al día de hoy. Logramos con bastante éxito los cultivos primarios del tumor C4-HD. Habíamos comenzado con 3 tumores diferentes y éste fue el que mejor anduvo, por lo menos las células se pegaban... El problema que teníamos era la contaminación con fibroblastos que terminaban creciendo más que las células tumorales. La Dra. Irene Larripa del laboratorio de citogenética tenía como invitado al Dr. Limon de Polonia. Él había desarrollado un método para obtener metafases de carcinomas separando a los fibroblastos de las células tumorales y se ofreció a hacer el cultivo con nosotros <sup>9</sup>. Gracias a todos estos colaboradores pudimos poner a punto los cultivos primarios de C4-HD que luego fueron el pilar de la tesis de Graciela Dran.<sup>10</sup>

En 1990 volvía Alfredo Molinolo de su postdoc y tras una muy breve estadía en el CEO puso su escritorio con nosotros en el cuartito que ya habíamos conquistado al

lado del ascensor; el ex cuartito donde Basombrío tenía las vinchucas y que luego pasó a ser de Alejandro Mayer, quien estuvo unos pocos años y luego se volvió a USA.

Ya Edith estaba escribiendo la tesis; Patricia Pazos estaba induciendo carcinomas mamarios con MNU y Fernanda Montecchia comenzaba a hacer su tesina bajo la dirección de Alfredo realizando los *whole mounts* de las glándulas mamarias de ratones tratados con progesterona o MPA. Graciela Dran se había incorporado para realizar su tesis evaluando el efecto de las hormonas sobre el crecimiento *in vitro* de las células tumorales.

Uno de los resultados más sorprendentes fue ver que los tumores regresionaban completamente con estrógenos....nuevamente antidogmático <sup>11</sup>. Sin embargo los cánceres de mama han sido tratados en forma exitosa con estrógenos, más aún Craig Jordan, el padre del tamoxifeno, estudia actualmente los efectos inhibitorios de los estrógenos en cáncer de mama <sup>12</sup>.

Otro de nuestros hallazgos fue encontrar que en el suero de las hembras tratados con MPA encontrábamos niveles elevados de factor de crecimiento epidérmico (EGF) <sup>13</sup>, y esto se debe al efecto androgénico ya descrito sobre la glándula salivar. Esto quizás explique porqué la carcinogénesis mediada por MPA es un poco diferente a la inducida por progesterona <sup>13,14</sup>. Mientras que con MPA se obtenían tumores principalmente ductales, la mayoría de los inducidos por progesterona eran lobulillares. Teníamos muchas cosas para hacer y cada vez que elegíamos una línea de trabajo, era dejar de hacer muchas otras. No nos alcanzaba el Bioterio para hacer todo lo que teníamos en mente.

Recibimos el antiprogestágeno onapristona de Schering y con sorpresa también observamos regresión completa de los tumores de crecimiento hormono independiente <sup>15</sup>. Con Graciela Dran, el resultado más lindo fue ver que el antiprogestágeno podía

inhibir no sólo el efecto estimulador que tenía el MPA sino también el efecto estimulador de sueros sugiriendo lo que luego se llamó *crosstalk* de distintas vías. En 1995 se publicó en Science el trabajo pionero de Pierre Chambon publicando el *cross talk* entre receptores hormonales y factores de crecimiento <sup>16</sup>.

Mientras Graciela Dran escribía la tesis se incorporó Marina Simian, y el objetivo de su trabajo era estudiar marcadores cromosómicos en estos cánceres de mama experimentales tratando de hacer una colaboración con la Dra. Merani experta en citogenética murina. Este trabajo era muy tedioso para el espíritu inquieto que tenía Marina en busca de resultados más rápidos y en breve desistió de este tema y pasó al área de cultivo estudiando los efectos de los factores de crecimiento sobre la proliferación de C4-HD *in vitro*. Entre los distintos factores ensayados que teníamos en mente como EGF e IGFs 1 y 2, en la heladera encontramos FGF2 que Daniel Bonfil había adquirido para estudiar angiogénesis. Lo probamos y con sorpresa vimos que este era el único de los ensayados que tenía un efecto estimulador de la proliferación muy significativo <sup>17</sup>. Con el tiempo vimos que el FGF2 es capaz de activar a los receptores de FGF2 (FGFR-2) que a su vez activan indirectamente al RP de modo tal que éste induce la activación de Ciclina D1 y MYC, dos genes claves en la proliferación celular, y que el FGFR2 puede incluso actuar como coactivador de la transcripción <sup>18</sup>( tesis de Juan P Cerliani).

Edith se doctoró en 1992 y Alfredo le consiguió un lugar para hacer el postdoctorado en su ex laboratorio del NIH con Gil Smith, experto en glándula mamaria murina y como son las cosas de la vida, Edith salía con Omar Coso, a quien le consiguió también el lugar para hacer el postdoc en el laboratorio del Dr. Silvio Gutkind, actual laboratorio donde trabaja Alfredo. Nuestra filosofía era y sigue siendo que los becarios tienen que cambiar al menos una vez de lugar de trabajo. Es mucho mejor para uno que

se queden en el laboratorio cuando comienzan a producir... pero no para ellos. Tienen que conocer cómo se trabaja en otro laboratorio, cómo piensan otros jefes etc.. para sacar lo bueno de cada uno.

Cuando nos mudamos como grupo de la Academia al IBYME en 1995, nos fuimos Molinolo, Simian, Pazos, Montecchia y yo. Dran se quedó en la Academia luego de rendir su tesis doctoral y Kordon estaba en su postdoc. Un agradecimiento a este grupo de becarios que durante los primeros años pusieron todo su empeño para trabajar con mucho esfuerzo sin casi materiales...

Lo que más valoro de la etapa de becario, fue la libertad para trabajar en forma independiente. La Dra., te daba una fichita con el experimento que ella quería que hicieras pero además podías hacer todos los que quisieras, jamás te impedía hacer un experimento. Ibas con el experimento ya hecho y los resultados....No se trabajaba en base a los proyectos escritos. Los experimentos realizados marcaban el rumbo de los próximos, no estábamos atados a nada. Publicábamos muy bien! Sin ni siquiera pensar en los factores de impacto. No era un laboratorio que se destacara por la modernidad de las técnicas. Por el contrario, a veces costaba un poco convencer a la Dra. que era necesaria una técnica más moderna, porque al revés, le molestaban los trabajos de despliegue de técnicas con poca información novedosa. El rigor estadístico y la verdad ante todo, valores que lamentablemente no se ven en todos los laboratorios, caracterizaban a la Sección Leucemia Experimental. Más importante que el *paper* era el experimento. Aprender a leer lo que el experimento nos está diciendo que muchas veces poco tiene que ver con la hipótesis planteada.

El crecimiento origina roces, y como en todos lados la Sección no era ajena a estos problemas. Así fue como decidimos que habíamos cumplido una etapa y era

necesario ir en búsqueda de algo nuevo. El lugar razonable para ir dada nuestra colaboración previa fue el IBYME y afortunadamente fuimos muy bien recibidos.

### **En el IBYME...**

Continuamos básicamente con las líneas de trabajo en curso moviéndonos más a la biología molecular. El Bioterio era una limitante en el IBYME de esa época y nuestros experimentos se orientaron a líneas más mecanísticas aprovechando el *know how* del IBYME. Alejandro Colman Lerner y Mercedes Goin nos enseñaron las técnicas de electroforesis y western blot. Nuestros *papers* actuales tienden a comenzar en una problemática observable en curvas de crecimiento tumoral *in vivo* para terminar en una explicación molecular de la misma a diferencia de la mayoría de los trabajos que muestran preguntas bioquímicas que terminan en mostrar que el defecto de tal o cual proteína modifica el crecimiento tumoral. En nuestra mente, lo primero no vale la pena el esfuerzo si no termina en un importante cambio del crecimiento tumoral más allá de la significancia estadística.

En el IBYME, Pazos terminó su tesis doctoral y se fue a hacer un post doc con Nicolás Olea ex discípulo de Sonnenschein, Marina Simian terminó su tesina y se fue a lo de Claudio Conti (UT; Smithville) primero y luego a lo de Mina Bissell (Berkeley), y Montecchia se fue al Ministerio de Salud. El recambio de camada nos trajo a Caroline Lamb, Victoria Fabris y Luisa Helguero. Caroline Lamb se focalizó en el estudio de los fibroblastos asociados a tumor y receptores de FGF para su tesis doctoral, Victoria Fabris estudió la citogenética de todas las variantes tumorales y Luisa Helguero las isoformas de RP. Las dos primeras regresaron al laboratorio luego de sus postdoctorados en el laboratorio del Dr. Aldaz, UT en Smithville, USA, y O. Podhajcer en Instituto Leloir respectivamente. Luisa partió a Suecia al laboratorio de JA Gustaffson el descubridor del receptor de estrógeno beta. Molinolo en el año 2002

decidió emigrar al NIH, como patólogo del *Branch* que dirige Silvio Gutkind desde donde seguimos con una fructífera colaboración. Al poco tiempo entró la Dra. Novaro que venía de hacer un postdoctorado con la Dra. Mina Bissell en Berkeley, y estudió el papel de la vía de Akt en el crecimiento hormono independiente incorporando los cultivos en Matrigel al laboratorio.

El tema del *cross talk* entre el FGF2 y RP sigue siendo un tema de investigación en el laboratorio proponiendo que el FGF2 del microambiente tumoral participa en la hormono independencia <sup>19</sup>. El estudio de las isoformas de RP nos llevó a correlacionar la proporción de isoformas A y B del RP con respuesta a tratamiento, demostrando también mecanismos epigenéticos asociados a esta regulación diferencial<sup>20,21</sup> (tesis doctoral de Victoria Wargon). Estos resultados nos motivaron en primer lugar a estudiar la respuesta *in vitro* de muestras de pacientes a antiprogéstágenos y correlacionarlo con la proporción de isoformas de RP por western blot (tema a cargo de la Dra. Paola Rojas) y en segundo lugar a desarrollar un estudio piloto de neoadyuvancia con mifepristona en pacientes con altos niveles de isoforma A del RP, que esperamos comience pronto.

Uno de los últimos descubrimientos interesantes fue demostrar que el RE participa en la estimulación de la proliferación celular inducida por MPA al interactuar con el RP en los promotores de Cyclina D1 y MYC <sup>22,23</sup>; tesis del Dr. S. Giulianelli.

En estos últimos 15 años el Bioterio del IBYME cambió completamente. Como miembro de la Comisión de Bioterio me enorgullece ese cambio y haber contribuido a que el Bioterio IBYME se puedan mantener y criar animales delicados como los inmunosuprimidos o determinados transgénicos muy sensibles. Esto nos ha permitido reorientar nuevamente nuestros estudios y hemos incorporado animales inmunosuprimidos, transgénicos y knock out de RP. Priorizar el Bioterio sobre otras cosas es un legado sin duda de la Dra. Pasqualini.

### **Laboratorio actual**

Actualmente en el laboratorio de Carcinogénesis Hormonal hay 2 investigadores adjuntos (Dras. Lamb y Fabris; La Dra. Novaro ya ganó por concurso un nuevo laboratorio del IBYME), 2 asistentes (S. Giulianelli ubicándose en Puerto Madryn y Paola Rojas), un postdoc de CONICET (Cecilia Pérez Piñero) y varios becarios realizando sus tesis doctorales. Esperamos llevar a la clínica el uso de antiprogéstágenos para un grupo de pacientes con altos niveles de isoforma A del RP. A su vez nuestro objetivo es entender los mecanismos epigenéticos que regulan negativamente la isoforma A del RP en tumores con resistencia adquirida, comprender el papel del receptor de estrógenos en la estimulación de la proliferación celular inducida por FGF2, investigar el papel de los receptores de FGFR en el crecimiento hormono independiente y resistente a la terapia, el papel del estroma tumoral en cada caso y el uso racional de la quimioterapia en combinación con antiprogéstágenos en carcinomas mamarios seleccionados en base a su perfil de isoformas de RP.

Hoy ya está establecido en la comunidad científica la participación de la progesterona y sus receptores en la etiología del cáncer de mama. Los resultados experimentales más fuertes provienen principalmente de estudios realizados en ratones PRKO<sup>24</sup> y los clínicos obtenidos del WHI<sup>25</sup> y del Million Study<sup>26</sup> en el 2001 y en el 2002 respectivamente que demostraron con sorpresa que pacientes con terapia de reemplazo hormonal combinada de estrógenos más progéstágenos desarrollaron mayor incidencia de cáncer de mama. Sigue siendo un desafío cómo elegir aquellos pacientes en los cuales se puede proponer al RP como blanco terapéutico en cáncer de mama y ese es el objetivo principal de nuestro laboratorio.

Resumir en pocas palabras la etiología del cáncer es muy difícil. Las teorías absolutistas han fracasado. Coincido plenamente en que el cáncer es una enfermedad de



tejidos y que las líneas celulares son herramientas para diseccionar fenómenos no para extrapolar conclusiones biológicas. Creo por otra parte que en los tejidos las células sienten el microambiente y que desarreglos en estas señales puedan causar señales inapropiadas, que desreguladas favorecen la aparición de cambios en el *epigenoma* alterando la homeostasis celular. Esto a su vez conllevaría a células con inestabilidad génica favoreciendo la aparición de mutaciones que no tendrían lugar en un ambiente de normalidad. En cáncer de mama no creo que el sistema inmune cumpla función alguna, ya que estas células no serían antigénicas. Por el contrario, el crecimiento podría llevar a inflamaciones que podrían a su vez generar loops proliferativos. Es obvio que en el cáncer genético familiar el orden de estos factores es diferente y una *driver mutation* podría en sí misma favorecer los cambios subsiguientes. Mucho queda para seguir aprendiendo....

Mientras estoy terminando, recibo este mail de la Dra: Claudia, esperaba tu trabajo la semana pasada ...¿Qué pasó?...un beso, Christiane. Y entonces me acuerdo de que me hubiera encantado que me haya quedado el *imprinting* de los *deadlines*. Jamás puedo terminar las cosas a tiempo, siempre necesito unos días más.

## REFERENCIAS

1. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD. Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77(1): 57-64.
2. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 1986; 33(2): 215-23.
3. Lanari C, Molinolo AA, Kordon E *et al.* Progesterone receptors in estrogen-induced fibromatosis of guinea pigs. *Cancer Lett* 1990; 51(3): 235-45.
4. Russo IH, Russo J. From pathogenesis to hormone prevention of mammary carcinogenesis. *Cancer Surv* 1986;5(3):649-70.
5. Sonnenschein C, Soto AM. Somatic mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped and replaced. *Mol Carcinog* 2000; 29(4): 205-11.
6. Kordon E, Lanari C, Meiss R *et al.* Hormone dependence of a mouse mammary tumor line induced in vivo by medroxyprogesterone acetate. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 17(1): 33-43.
7. Pazos P, Lanari C, Meiss R *et al.* Mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and medroxyprogesterone acetate (MPA) in BALB/c mice. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 20(2): 133-8.
8. Bursch W, Liehr JG, Sirbasku DA *et al.* Control of cell death (apoptosis) by diethylstilbestrol in an estrogen-dependent kidney tumor. *Carcinogenesis* 1991; 12(5): 855-60.
9. Pandis N, Heim S, Bardi G *et al.* Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer [published erratum appears in *Genes Chromosom Cancer* 1992 Nov;5(4):410]. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5(1): 14-20.
10. Dran G, Luthy IA, Molinolo AA *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): 173-86.
11. Kordon E, Lanari C, Molinolo AA *et al.* Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int J Cancer* 1991; 49(6): 900-5.
12. Jordan VC, Obiorah I, Fan P *et al.* The St. Gallen Prize Lecture 2011: evolution of long-term adjuvant anti-hormone therapy: consequences and opportunities. *Breast* 2011; 20 Suppl 3: S1-11.
13. Kordon EC, Guerra F, Molinolo AA *et al.* Effect of sialoadenectomy on medroxyprogesterone-acetate-induced mammary carcinogenesis in BALB/c

- mice. Correlation between histology and epidermal-growth-factor receptor content. *Int J Cancer* 1994; 59(2): 196-203.
14. Kordon EC, Molinolo AA, Pasqualini CD *et al.* Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between progestin dependence and morphology. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 28(1): 29-39.
  15. Montecchia MF, Lamb C, Molinolo AA *et al.* Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 68(1-2): 11-21.
  16. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y *et al.* Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995; 270(5241): 1491-4.
  17. Lamb C, Simian M, Molinolo A *et al.* Regulation of cell growth of a progestin-dependent murine mammary carcinoma in vitro: progesterone receptor involvement in serum or growth factor-induced cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 70(4-6): 133-42.
  18. Cerliani JP, Guillardoy T, Giulianelli S *et al.* Interaction between FGFR-2, STAT5, and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Cancer Res* 2011; 71(10): 3720-31.
  19. Giulianelli S, Cerliani JP, Lamb CA *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.
  20. Helguero LA, Viegas M, Asaithamby A *et al.* Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79(3): 379-90.
  21. Wargon V, Fernandez SV, Goin M *et al.* Hypermethylation of the progesterone receptor A in constitutive antiprogestin-resistant mouse mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126(2): 319-32.
  22. Giulianelli S, Vaque JP, Soldati R *et al.* Estrogen Receptor Alpha Mediates Progestin-Induced Mammary Tumor Growth by Interacting with Progesterone Receptors at the Cyclin D1/MYC Promoters. *Cancer Res* 2012; 72(9): 2416-27.
  23. Giulianelli S, Vaque JP, Wargon V *et al.* [The role of estrogen receptor alpha in breast cancer cell proliferation mediated by progestins]. *Medicina (B Aires)* 2012; 72(4): 315-20.
  24. Conneely OM, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8(2): 205-14.
  25. Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL *et al.* Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(8): 526-35.

26. Beral V, Reeves G, Bull D *et al.* Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362: 419-427.