

Finalmente, nuestro estudio de búsqueda de mutaciones menos frecuentes o noveles en los pacientes, nos ha permitido establecer que muchas de las pacientes diagnosticadas como NC poseen sólo un alelo con mutación o bien ninguno (11). Estos resultados cobran importancia dado que demostrarían que el hiperandrogenismo que se observa en estos pacientes se debe a otras causas y no a la deficiencia de 21-hidroxilasa, y que los valores hormonales considerados como límite de corte para su inclusión, estarían sobreestimando la frecuencia de la patología. De hecho, todos aquellos pacientes analizados que presentan valores de 17 OH-progesterona post-estímulo con ACTH menores a 14 ng/mL (valor de corte: 10 ng/mL) poseen sólo un alelo del gen mutado o bien ninguno (4) (11)(12).

Referencias bibliográficas

1. White PC, Speiser PW: Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21: 245-91.
2. Koppens PFJ, Hoogenoerem T, Degenhart HJ: Duplication of the CYP21A2 gene complicates mutation analysis of steroid 21-hydroxylase deficiency: characteristics of three unusual haplotypes. *Hum Genetics* 2002; 111: 405-10.
3. Human Gene Mutation Database (HGMD) Cytochrome P450, subfamily XXIA (steroid 21-hydroxylase, congenital adrenal hyperplasia), peptide 2. <http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120605.html>.
4. Dain L, Buzzalino N, Onetto A, Belli S, Oneto A, *et al.* Classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency: A molecular study of Argentine patients. *Clin Endocrinol* 2002; 56:239-45.
5. Pasqualini T, Alonso G, Tomasini R, Galich A, Buzzalino N, *et al.* Congenital adrenal hyperplasia: Clinical characteristics and genotype in newborn, childhood and adolescence. *Medicina* 2007; 67: 253-61.
6. Taboas M, Fernández C, Belli S, Buzzalino N, Alba L, Dain L. Isolated p.H62L in a classical 21-hydroxylase deficient patient. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* (en prensa).
7. Dain L, Minutolo C, Buzzalino N, Belli S, Oneto A, *et al.* A novel CYP21A2 point mutation in a 21-hydroxylase deficient patient. In: *Novel human pathological mutations*. *Hum Genet* 2006; 119: 359-64.
8. Minutolo C, Nadra A, Fernández C, Buzzalino N, Belli S, *et al.* Structure-based analysis of five novel disease-causing mutations in 21-hydroxylase-deficient patients *PLoS ONE* 2011; 6: e15899. doi:10.1371/journal.pone.0015899.
9. Fernández C, Buzzalino N, Belli S, Oneto A, Stivel M, *et al.* Novel allelic variant within the Z promoter: putative miss-regulation effect on CYP21A2 transcription. *Manuscrito en preparación*.
10. Fernández C, Buzzalino N, Oneto A, Stivel M, Belli S, *et al.* Caracterización del módulo RCCX en una mues-

tra de pacientes argentinos con deficiencia de 21-hidroxilasa. XX Congress Brasileiro de Genética Médica y III Congresso Brasileiro de Enfermagem em Genética 2008.

11. Buzzalino N, Fernández C, Taboas M, Minutolo C, Belli S, *et al.* Caracterización molecular del gen CYP21A2 en una muestra de 241 pacientes con Hiperplasia Suprarrenal Congénita de nuestra población. *RAEM* 2009; 46 Sup I: 130 (manuscrito en preparación).
12. Taboas M, Minutolo C, Fernández C, Buzzalino N, Casali B, *et al.* Caracterización molecular por secuenciación de pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) por deficiencia de 21 hidroxilasa en nuestra población. *Medicina* 2010; 70 Sup.II: 132.

LABORATORIO DE ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN CELULAR EN REPRODUCCIÓN Y CÁNCER

Bases moleculares de la interacción celular en modelos de reproducción y cáncer: identificación de proteínas y mecanismos involucrados

Molecular basis of cell-cell interaction in reproduction and cancer models: identification of proteins and mechanisms involved

Bases moleculares da interação celular em modelos de reprodução e câncer: identificação de proteínas e mecanismos envolvidos

Mónica H. Vazquez-Levin, Laura I. Furlong, Clara I. Marín-Briggiler, Carolina Veaute, María F. Veiga, María L. Matos, Lara Lapyckyj, Nieves Gabrielli, Marina Rosso, María M. Arzondo, Nadia Y. Edelsztejn, María J. Besso

Resumen

La interacción entre las células somáticas y entre las gametas involucra una serie de eventos moleculares que no han sido dilucidados totalmente. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado proyectos dirigidos a profundizar el conocimiento de dichos eventos. Los estudios han comprendido el análisis de moduladores de la funcionalidad espermática (ej.

efecto de la temperatura de incubación, las concentraciones del ión calcio, los anticuerpos antiespermáticos de fluidos biológicos en la motilidad, la capacitación y la exocitosis acrosomal). Asimismo, hemos caracterizado componentes del espermatozoide (ej. CaM Kinasa IV, proacrosina/acrosina) y de secreciones del tracto femenino (ej. Grp78/BiP), evaluado su rol en el desarrollo de capacidad fecundante y, en algunos casos, investigado su relación con la infertilidad. En años recientes, nuestros proyectos se han extendido al estudio de las cadherinas en eventos de adhesión celular durante la fecundación; hemos caracterizado la expresión de cadherina epitelial y neural en tejidos reproductivos y gametas y evaluado su participación en la fecundación. Dada su reconocida relevancia en el cáncer, hemos abordado estudios en diversos modelos tumorales. Nuestras investigaciones han contribuido a la comprensión de los eventos de interacción de las gametas durante la fecundación así como entre las células somáticas durante la progresión tumoral.

Palabras clave: interacción celular * fecundación * progresión tumoral * proacrosina/acrosina * Grp78/Bip * cadherinas clásicas

Summary

Cell-cell interaction between somatic cells as well as gametes involves molecular events that have not been completely elucidated. Our research group has developed projects aimed at studying proteins and mechanisms participating in these interactions. Several modulators of sperm functions have been analyzed (i.e. incubation temperature, calcium ion concentration, and antisperm antibodies present in biological fluids upon sperm motility, capacitation and acrosomal exocytosis). In addition, proteins from spermatozoa (i.e. CaM Kinase IV, proacrosin/acrosin) and from secretions of the female tract (Grp78/BiP) have been characterized, and their role in the development of sperm fertilizing ability assessed. In some cases, their relationship with infertility was evaluated. In recent years, our projects have been extended to study members of the cadherin superfamily and related proteins; in particular, the expression of epithelial and neural cadherin in reproductive tissues and gametes was characterized and evidence of their participation in fertilization-related cell-cell adhesion events shown. Based on the vast evidence of the role of these proteins in tumor progression, our current research also involves studies of cancer models. Our projects have contributed to the understanding of the molecular basis of cell-cell interaction during fertilization as well as during tumor progression.

Key words: cell-cell interaction* fertilization* tumor progression* proacrosin/acrosin* Grp78/Bip * classical cadherins

Resumo

A interação entre as células somáticas e entre os gametas envolve uma série de eventos moleculares que não têm sido elucidados totalmente. Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido projetos encaminhados a aprofundar o conhecimento de tais eventos. Os estudos têm compreendido a análise de mo-

duladores da funcionalidade espermática (ex. efeito da temperatura de incubação, as concentrações do íon cálcio, os anticorpos antiespermáticos de fluidos biológicos na motilidade, a capacitação e a exocitose acrossomal). Do mesmo modo, caracterizamos componentes do espermatozoide (ex. CaM Kinase IV, proacrosina /acrosina) e de secreções do trato feminino (ex. Grp78/BiP), avaliamos seu papel no desenvolvimento de capacidade fecundante e, em alguns casos, investigamos sua relação com a infertilidade. Em anos recentes, nossos projetos se têm estendido ao estudo das caderinas em eventos de adesão celular durante a fecundação; temos caracterizado a expressão de caderina epitelial e neural em tecidos reproductivos e gametas e avaliamos sua participação na fecundação. Dada sua reconhecida relevância no câncer, temos abordado estudos em diversos modelos tumorais. Nossas pesquisas têm contribuído à compreensão dos eventos de interação dos gametas durante a fecundação bem como entre as células somáticas durante a progressão tumoral.

Palavras chave: interação celular * fecundação * progressão tumoral * proacrosina/acrosina * Grp78/Bip * caderinas clássicas

Introducción

La interacción entre las células somáticas y entre las gametas involucra una serie de eventos moleculares complejos que no han sido dilucidados totalmente. Desde su constitución hace 15 años, nuestro grupo de investigación ha desarrollado proyectos de investigación dirigidos al estudio de los mecanismos moleculares y las entidades que participan en el reconocimiento de las gametas durante la fecundación. Como parte de los proyectos, hemos estudiado el rol de diversos componentes del espermatozoide y de las secreciones del tracto femenino en el desarrollo de su capacidad fecundante, así como hemos evaluado requerimientos *in vitro* (ej. el rol de la temperatura de incubación y del ión calcio (Ca²⁺) del medio de cultivo de espermatozoides para el desarrollo de estrategias de abordaje de algunos de los eventos de este proceso). En años recientes nuestras investigaciones están enfocadas en el estudio de miembros de la superfamilia de moléculas de adhesión llamadas cadherinas y proteínas relacionadas a éstas en eventos de adhesión celular durante la fecundación. Dada la reconocida relevancia de miembros de esta familia de moléculas de adhesión en la progresión del cáncer, nuestras investigaciones se han extendido a su estudio en diversos modelos tumorales. Los diseños experimentales han involucrado el uso de gametas y tejidos reproductivos de distintas especies de mamíferos (modelo humano, murino y bovino) así como líneas celulares y muestras de tejidos no tumorales y tumorales de diversos orígenes. En los abordajes de estudio empleamos estrategias celulares, bioquímicas, moleculares y funcionales. En los párrafos siguientes se presenta una revisión de algunos de los proyectos realizados.

GENERALIDADES DEL PROCESO DE LA FECUNDACIÓN

La fecundación involucra una secuencia coordinada de interacciones moleculares entre el espermatozoide y el óvulo que dan origen a una cigota. Los espermatozoides son células altamente especializadas y polarizadas, que se forman de manera continua en el epitelio seminífero del testículo durante la espermatogénesis. Sin embargo, el espermatozoide que deja la gonada es inmóvil o presenta motilidad no progresiva y no puede fecundar al ovocito; ambas propiedades son adquiridas durante su tránsito por el epidídimo en un proceso conocido como maduración epididimaria. Luego de la eyaculación, los espermatozoides deben permanecer un tiempo en el tracto reproductivo femenino donde sufren una serie de cambios metabólicos y funcionales conocidos en conjunto como capacitación espermática. Los espermatozoides interactúan con las células del tracto reproductivo de la hembra y sus secreciones y desarrollan un patrón de motilidad llamado hiperactivación, que facilita su acercamiento y la penetración de las envolturas del ovocito. Una vez en el sitio de fecundación, los espermatozoides comienzan una serie compleja de interacciones con el ovocito y sus envolturas, particularmente las células del cumulus y la corona radiata y la zona pellucida (ZP) hasta alcanzar el citoplasma. Los espermatozoides sufren la exocitosis acrosomal (EA), evento que permite la liberación de enzimas acrosomales que asisten al espermatozoide en el proceso, así como la redistribución de proteínas en diferentes subregiones de la gameta y el consecuente desarrollo de capacidad fusogénica del segmento ecuatorial, que participaría en la fusión con el oolema (1-3).

En las últimas décadas, mucho se ha avanzado en relación al conocimiento de las bases de este proceso; sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados aún no han sido dilucidados en su totalidad. La identificación y caracterización de las moléculas que participan en el proceso de fecundación así como la comprensión de los mecanismos que regulan su expresión y funciones pueden contribuir no solo a comprender los mecanismos involucrados en la interacción espermatozoide-ovocito, sino también al mejoramiento de las herramientas actuales para el manejo de las gametas, el desarrollo de nuevas alternativas para el diagnóstico y tratamiento para la infertilidad humana y nuevos métodos anticonceptivos.

REQUERIMIENTOS DE TEMPERATURA Y DE IONES CALCIO EN LOS PROCESOS DE CAPACITACIÓN Y DE EXOCITOSIS ACROSOMAL

Los eventos de la capacitación y la EA se encuentran estrechamente relacionados, situación que hace difícil la evaluación de los mecanismos y los componentes involucrados de manera independiente. En un

proyecto orientado a disociar estos procesos, evaluamos los requerimientos de temperatura e iones Ca^{2+} para su ocurrencia en condiciones *in vitro* en el modelo del espermatozoide humano. Los resultados de estos estudios revelaron que la incubación de los espermatozoides a 20 °C impide la capacitación espermática pero es suficiente para sostener una respuesta a la inducción de la EA por un inductor fisiológico (fluido folicular) en espermatozoides previamente capacitados (4). Los estudios permitieron determinar además el requerimiento de concentraciones diferenciales de iones Ca^{2+} en el medio de incubación de los espermatozoides *in vitro* para la ocurrencia de ambos eventos: mientras 0,22 mM es suficiente para el desarrollo de eventos asociados a la capacitación (niveles de fosforilación en proteínas fosforiladas en residuos tirosina y motilidad hiperactivada), se necesitan concentraciones mayores del catión divalente (al menos 0,58 mM) para producir la máxima respuesta de las gametas a la inducción de la EA mediada por el fluido folicular y para obtener la máxima tasa de unión a la ZP (5). La formulación de medios de cultivo con cantidades diferenciales de ión Ca^{2+} permitió abordar otros estudios, entre ellos identificar anticuerpos anti-espermáticos inductores de la EA en sueros de mujeres en consulta/tratamiento por infertilidad y determinar su efecto sobre la interacción espermática sobre componentes de la ZP (6) (7), así como determinar que la chaperona Grp78/Bip, que se incorporaría al espermatozoide durante la capacitación, modula la interacción entre ambas gametas de manera dependiente de los iones Ca^{2+} (8 ver en detalle más adelante). Teniendo en cuenta que los medios de cultivo para manejo de espermatozoides en general tiene concentraciones milimolares de iones Ca^{2+} (2 mM), la formulación de medios de cultivo con cantidades diferenciales del catión divalente podrán impactar en el manejo de patologías espermáticas, entre ellas la ocurrencia prematura de la capacitación y/o EA.

PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA MOTILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE: KINASAS DEPENDIENTES DEL IÓN CALCIO EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO

Los mecanismos involucrados en la regulación de la motilidad del espermatozoide de mamíferos no se conocen totalmente. Los estudios mencionados en la sección anterior (5) revelaron que los iones Ca^{2+} juegan un rol clave en el mantenimiento de la motilidad. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a este fenómeno no han sido dilucidados. Dado que los iones Ca^{2+} pueden unirse a calmodulina y este complejo regula la actividad de muchas enzimas, entre ellas las proteínas kinasas dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaM kinasas), desarrollamos un estudio iniciado como parte de la tesis doctoral de la Dra. C. Marín Briggiler y luego completado de manera conjunta con el grupo liderado por

el Dr. P. Visconti, en ese momento miembro de la Univ. de Virgina, EEUU. En el mismo, evaluamos la relevancia de la presencia de iones Ca^{2+} en el medio de incubación para la motilidad de los espermatozoides humanos y estudiamos la participación de las proteínas CaM kinasas en la motilidad. Los estudios confirmaron el requerimiento de los iones Ca^{2+} en el medio de incubación para el mantenimiento de la motilidad, determinándose que una concentración de 0,22 mM del ión divalente es suficiente para su mantenimiento. La participación de las CaM kinasas en la regulación de la motilidad espermática dependiente de los iones Ca^{2+} fue confirmada a través del uso de inhibidores de estas kinasas (activos: KN62, KN93; inactivos: KN04 y KN92), observándose una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides móviles; en particular, la incubación con el KN62 condujo a una reducción significativa en los valores de los parámetros cinemáticos y afectaron negativamente de manera significativa la cantidad de ATP en la gameta, pero no alteraron la viabilidad celular, la fosforilación global en residuos tirosina y la respuesta de las células a inductores fisiológicos de la EA. Finalmente, estudios adicionales permitieron detectar una forma de 61 kDa para la proteína quinasa IV Ca^{2+} /calmodulina-dependiente (CaM quinasa IV) espermática, que fue localizada en el flagelo; los estudios además demostraron un aumento de su actividad durante la capacitación y su inhibición con KN62 (9).

ADQUISICIÓN DE PROTEÍNAS DURANTE LA CAPACITACIÓN: LA CHAPERONA Grp78/BiP

Como se mencionara previamente, los espermatozoides completan la adquisición de su capacidad fecundante durante su tránsito por el tracto reproductor de la hembra (1-3). Numerosas evidencias sugieren que el entorno oviductal tiene un rol esencial en las etapas finales de la adquisición de competencia funcional de las gametas que llevan al éxito de la fecundación. Los espermatozoides que llegan al oviducto, interactúan con las células del epitelio oviductal y con sus secreciones, habiéndose observado un efecto del medio condicionado de cultivos de estas células en la preservación de la vitalidad y motilidad espermáticas, así como en la estimulación de eventos relacionados con la capacitación en animales, especialmente en el modelo bovino (10). Sin embargo, los efectos sobre la capacitación en el modelo humano no son concluyentes (11). Teniendo en cuenta evidencias previas que demostraron la detección de una forma secretoria la chaperona Grp78/BiP (*Glucose regulated protein 78/ Binding immunoglobulin Protein*) y hallazgos preliminares en nuestro laboratorio sobre su detección en el fluido folicular, realizamos un proyecto en colaboración con la Dra. V. Corrigan y col. del *King's College London School of Medicine* (Londres, Reino Unido) para estudiar su expresión en

tejidos y secreciones del oviducto humano y evaluar su asociación al espermatozoide y su rol en eventos relacionados con la fecundación. En cortes histológicos de las secciones del *isthmus* y *ampulla* del oviducto humano, la Grp78/BiP fue inmunolocalizada en las células oviductales de ambas regiones, presentando mayor señal en la última. La forma secretoria de esta chaperona fue inmunodetectada en perfiles electroforeticos de proteínas de fluido oviductal y de medio condicionado de cultivos de células de tejido tubario humano. El análisis de los fluidos recuperados en diferentes momentos del ciclo menstrual además reveló la presencia de mayores niveles de Grp78/BiP en el período periovulatorio. Asimismo, Grp78/BiP recombinante se asoció a la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide humano capacitado y demostró tener un rol modulador de la interacción entre las gametas de manera dependiente de los iones Ca^{2+} . Los resultados obtenidos concordaron con dos informes publicados durante el curso de la investigación en el modelo humano que describieron formas secretorias de la chaperona, su expresión en el oviducto y su capacidad de interactuar con el espermatozoide (12) (13). El estudio completado por nuestro grupo reportó, por primera vez, la secreción de la Grp78 por las células epiteliales oviductales humanas, así como demostró su asociación a la región del capuchón acrosomal del espermatozoide y presentó evidencias de su rol modulador de la activación de la gameta en eventos de la fecundación (Figura 1).

PROTEASAS ESPERMÁTICAS Y EL PROCESO DE LA FECUNDACIÓN: PROACROSINA/ACROSINA

La participación de proteasas de tipo tripsina en la interacción de gametas fue propuesta a partir de estudios que revelaron la capacidad de los inhibidores de tripsina de bloquear la penetración espermática del ovocito (14). De las proteasas acrosomales de este tipo, una de las más abundantes y estudiadas es Acrosina (EC 3.4.21.10), una endoproteasa con sitio activo de serina y especificidad por las uniones peptídicas de residuos Arginina o Lisina. Acrosina se sintetiza y almacena como zimógeno inactivo (proacrosina) en el acrosoma de las espermátidas redondas de todos los mamíferos estudiados y se activaría durante la EA en el sitio de la fecundación (15) (16).

En estudios realizados por nuestro grupo de investigación, el sistema proacrosina/acrosina fue inmunolocalizado en la región apical de la cabeza y correspondiente al gránulo acrosomal de espermatozoides permeabilizados no capacitados y capacitados, mientras que luego de la EA se observó inmunoreactividad en la región ecuatorial o desaparición de la señal para la proteasa. Dado que la secuencia aminoacídica de pro-

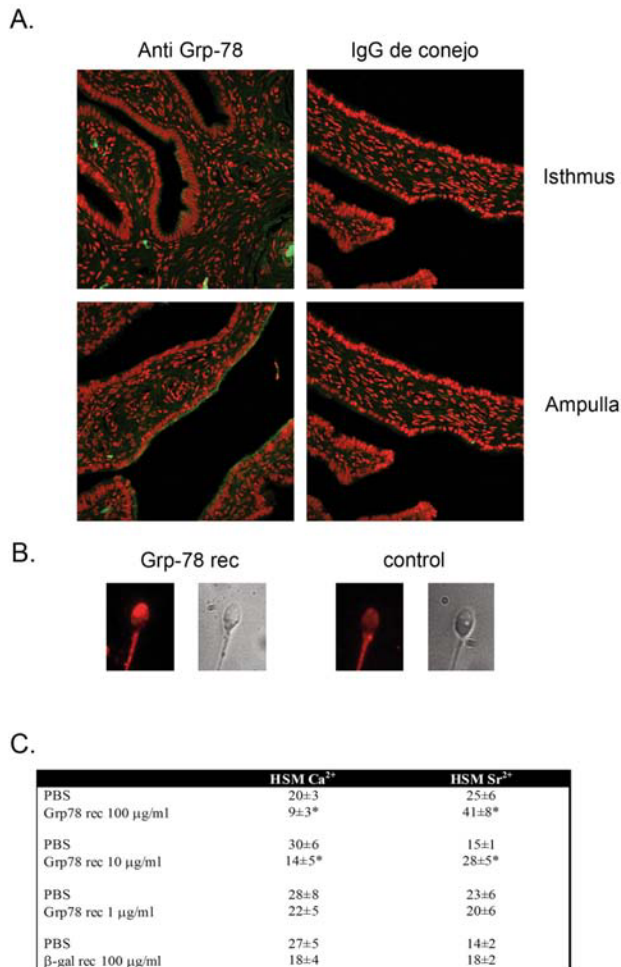


Figura 1. Expresión de Grp78 en el oviducto humano, su incorporación al espermatozoide humano y efecto sobre la interacción de las gametas. **A.** Inmunolocalización de Grp78 en secciones de trompa de Fallopio (*isthmus* y *ampulla*) humanas utilizando anticuerpo anti Grp78 (Santa Cruz Biotech) 2 mg/mL, anti conejo marcado con FITC (1:100), y contratinción con yoduro de propidio. Como control se incluye tinción con IgG de conejo 2 µg/mL. **B.** Unión de Grp78 recombinante (Grp78 rec) a espermatozoides humanos. Los espermatozoides capacitados por 4 h se incubaron con Grp78 rec (100 µg/mL) o PBS (control) por 4 h adicionales, fueron lavados para eliminar la proteína no unida y procesados para inmunocitoquímica. Se utilizó anti Grp78 (Santa Cruz Biotech) 20 µg/mL, anti conejo marcado con CY3 (1:750). **C.** Efecto de la incubación de espermatozoides sobre la interacción con la ZP. Los espermatozoides móviles fueron incubados por 4 h en condiciones capacitantes y expuestos a Hemizonae (HZ) en presencia de diferentes concentraciones de Grp78 rec. La HZ correspondiente fue incubada con PBS como control. Luego de 4 h de incubación, se removieron los espermatozoides débilmente unidos y se contaron los espermatozoides unidos por HZ. Se realizaron ensayos con 100 µg/mL de β-galactosidasa como control. Los resultados se expresan como media ± EEM; n ≥ 7. * P < 0.05 vs. control. El experimento fue realizado en medio conteniendo Ca²⁺ o Sr²⁺ (datos de ref. 8).

acrosina no indica la presencia de regiones transmembrana, la proteasa no estaría asociada directamente a la membrana del acrosoma y sería un componente de la matriz acrosomal. La proenzima humana puede ser extraída de espermatozoides utilizando soluciones ácidas que permiten disociar complejos formados con proteínas acrosomales y con el agregado de inhibidores de proteasas para prevenir su activación. En electroforesis bajo condiciones reductoras, proacrosina humana migra como una forma doble de Mr 53.000-55.000 y 58.000-61.000, igual tamaño molecular que el observado en ensayos de zimografía de extractos ácidos. La activación de la proenzima seguiría el mecanismo propuesto para la isoforma de cerdo, observándose formas de 52 kDa y 34 kDa que representarían el intermedio α-acrosina y la proteasa activa β-acrosina, respectivamente, además de otras formas de procesamiento de 22-24 y 16 kDa. Su activación puede ser completamente inhibida en presencia de benzamidina, sugiriendo la participación de serina proteasas en el mecanismo de activación. Si bien proacrosina purificada tiene capacidad de autoactivarse *in vitro*, el proceso de activación en el acrosoma estaría regulado por otros factores. En particular, estudios conjuntos entre nuestro laboratorio con el grupo del Dr Coronel de la Universidad de Córdoba, Argentina, revelan que tanto la activación como la actividad de la proteasa humana presente en extractos ácidos serían inhibidas por la proteína caltrin del plasma seminal (16-18).

En relación a las funciones del sistema proacrosina/acrosina, estudios realizados utilizando el modelo de *knock out* indicaron que esta enzima no sería esencial para el proceso de fecundación (19) (20). Sin embargo, los espermatozoides deficientes en proacrosina/acrosina mostraron un retraso en la penetración de la ZP normales y en ensayos de competencia espermática no fecundaron al ovocito (20). Estudios complementarios llevaron a proponer su participación en la activación/liberación de los contenidos acrosomales durante la EA. En concordancia con estas observaciones, se identificaron alteraciones en los patrones de activación de proacrosina de espermatozoides de individuos subfértiles sin alteraciones en los parámetros seminales y con una capacidad disminuida de fecundar ovocitos *in vitro* (21) así como un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio de activación de la proenzima produjo una inhibición del porcentaje de espermatozoides humanos reaccionados sobre la ZP homóloga (22).

Además de su función de proteasa, el sistema proacrosina/acrosina tendría un rol en el reconocimiento y unión del espermatozoide a glicoproteínas de la ZP homóloga (15); sin embargo, los estudios en el modelo humano eran escasos. Empleando ensayos de unión en fase sólida (*Ligand blot* y ensayo en placa de poliestireno) se completaron una serie de experimentaciones para caracterizar la interacción entre proacrosina/acrosina hu-

mana y glicoproteínas de la ZP homóloga. Para los estudios se utilizó proacrosina/acrosina recuperada de espermatozoides y glicoproteínas obtenidas de ovocitos humanos de descarte de programas de fecundación *in vitro*, así como formas recombinantes de proacrosina (Rec-40) y productos truncados de su expresión (Rec-30, Rec-20, Rec-10, Rec-6) generados en bacterias y glicoproteínas recombinantes de la ZP expresadas en células CHO (rec-hZPA, rec-hZPB, rec-hZPC). Los estudios revelaron la capacidad máxima de Rec-40 de interactuar principalmente con rec-hZPA, en concordancia con estudios en otras especies y demostraron el rol de los azúcares fucosa y manosa, presentes en los oligosacáridos de la ZP, en la interacción con la proenzima (23-25).

Teniendo en cuenta las funciones identificadas para el sistema de proacrosina/acrosina y que anticuerpos contra proteínas espermáticas han sido asociados a infertilidad humana, resultó relevante determinar la incidencia de anticuerpos contra el sistema proacrosina/acrosina en el suero de las mujeres en consulta por infertilidad. Empleando un ensayo de ELISA con la proacrosina humana recombinante (Rec-40) como antígeno (ELISA-Acro), se determinó una incidencia del 19% sobre un total de 179 sueros con anticuerpos contra el sistema de la proteasa. Una evaluación en paralelo realizada con el método de rutina de diagnóstico de infertilidad inmunológica (ensayo de inmunobeads, IBT), arrojó resultados similares (incidencia de anticuerpos anti-espermáticos contra proteínas espermáticas de superficie: 20%). Sin embargo, de los sueros antiacrosina positivos, sólo 6 fueron IB positivos, indicando que el ensayo clínico de rutina no permite predecir la presencia de anticuerpos antiacrosina. Estudios complementarios permitieron identificar un grupo de sueros que sólo reconocieron la región C-terminal de proacrosina, involucrada en el mecanismo de activación de la proenzima y en la interacción de proacrosina con componentes de la ZP. Todos esos sueros afectaron la unión de proacrosina recombinante a la proteína ZPA y en algunos casos también inhibieron la activación de la proenzima (26) (Figura 2). Estos estudios, en conjunto con los que realizamos usando un anticuerpo monoclonal contra la proenzima que mostraron un comportamiento similar y que inhibieron la EA (22), sugirieron el posible efecto deletéreo de los anticuerpos antiacrosina sobre la fertilidad. Empleando un modelo experimental murino de inmunización genética contra proacrosina humana, se comprobó la respuesta humoral hacia la proacrosina/acrosina humana en los animales inmunizados, determinándose además la capacidad de esos anticuerpos generados de afectar la activación de proacrosina y de bloquear la interacción con la rec-hZPA; asimismo, los anticuerpos inhibieron de forma dosis-dependiente la fecundación *in vitro* y afectaron la fertilidad *in vivo* de los ratones, observándose un menor número de crías en las hembras inmunizadas y de un tamaño significativamente menor que las nacidas de hembras con-

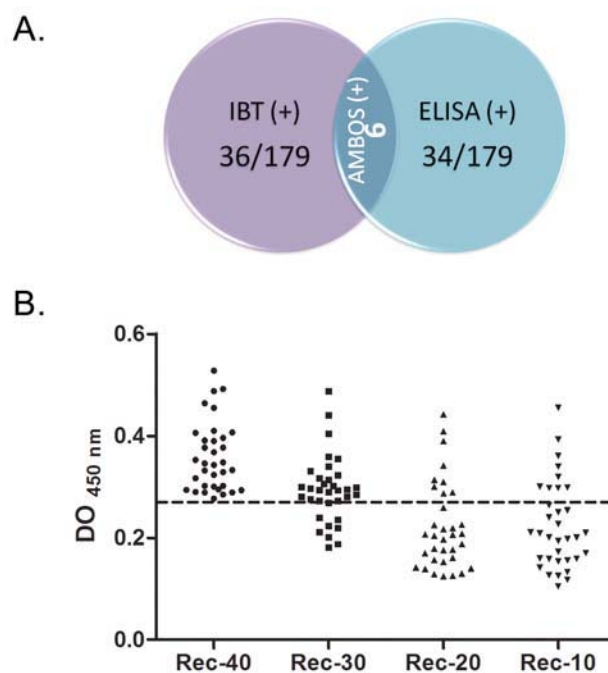


Figura 2: El sistema proacrosina/acrosina. Detección de anticuerpos en el suero de mujeres en consulta por infertilidad y reactividad a distintas regiones de la proenzima. **A.** Detección de anticuerpos anti-proteínas espermáticas de superficie, mediante "Immunobead Binding Test" (IBT) y anticuerpos anti-proacrosina/acrosina, mediante ELISA indirecto (ELISA-Acro). Se analizaron los sueros de 179 mujeres en consulta por infertilidad, 36 (20%) presentaron anticuerpos contra antígenos de superficie según ensayo de IBT (>50% de espermatozoides unidos a microesferas) y en 34 (19%) se detectaron anticuerpos anti-proacrosina, según ensayo de ELISA-Acro. Sólo en 6 pacientes se encontró concordancia entre ambos ensayos. **B.** Análisis de las regiones de proacrosina reconocidas por los anticuerpos presentes en pacientes en consulta por infertilidad. Los sueros en los que se detectaron anticuerpos anti-proacrosina (n=34) utilizando proacrosina recombinante humana (Rec-40; aa 1-402) como antígeno fueron enfrentados a segmentos de la proteína truncados en el extremo C-terminal: Rec-30 (aa 1-300), Rec-20 (aa 1-190) y Rec-10 (aa 1-160). De los 34 sueros analizados, 25 presentaron reactividad contra Rec-30 y 9 reconocieron a Rec-20 y Rec-10. En línea de puntos se indica el valor de corte establecido para el ensayo (DO=0,270) (datos de ref. 26).

troles (27), confirmando su efecto negativo sobre la fertilidad e indirectamente la relevancia de este complejo enzimático en el proceso de la fecundación.

EXPRESIÓN DE MIEMBROS DE LAS CADHERINAS CLÁSICAS EN TEJIDOS REPRODUCTIVOS Y GAMETAS Y EVALUACIÓN DE SU PARTICIPACIÓN EN LA FECUNDACIÓN

La adhesión célula-célula regula numerosos procesos como el crecimiento, la movilidad, la diferenciación y la supervivencia de las mismas. Las cadherinas conforman una superfamilia de glicoproteínas transmembrana que intervienen en la unión célula-célula en

forma dependiente de iones Ca^{2+} . Dentro de la familia de las cadherinas Tipo I o clásicas, se encuentran la cadherina epitelial (uvomorulina, CAM120/80; cadE) y la cadherina neural (cadN). Como el resto de los miembros de la familia, poseen 5 dominios extracelulares cadherina (EC1-EC5), un dominio único transmembrana y un dominio citoplasmático. Los dominios cadherina extracelulares participan en las interacciones con moléculas de cadherina en la superficie de células adyacentes; una vez más los iones Ca^{2+} cumplen un rol clave, dado que su unión a sitios específicos cambia la conformación de la proteína haciendo que el dominio EC1 adquiera rigidez y permita la interacción entre cadherinas. Por su parte, el dominio citoplasmático une a la cadherina con moléculas adaptadoras, entre ellas β -catenina, y a través de ellas interactúa con la red de filamentos de actina, para estabilizar la adhesión celular; esta región de la proteína también está involucrada en el tráfico y señalización celular (28) (29).

Dado que cadE y cadN participan en la adhesión celular dependiente de iones Ca^{2+} y que el proceso de la fecundación involucra eventos de adhesión celular entre células somáticas y gametas y entre gametas entre sí que requieren de la presencia de este catión divalente, surgió el interés de caracterizar la expresión de ambas moléculas de adhesión en tejidos reproductivos y gametas y evaluar su posible participación en la fecundación; al inicio del proyecto, los estudios reportados sobre su presencia en las gametas eran escasos y el estudio de su rol en la fecundación no tenía antecedentes. La expresión de cadE en el epidídimo fue confirmada, determinándose la presencia del transcripto, así como la proteína en las células principales del epitelio epididimario y la forma completa de Mr 120.000 en extractos proteicos del epidídimo y de espermatozoides. CadE fue inmunolocalizada en espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados, en regiones subcelulares que participan en la interacción gamética en particular en la membrana plasmática del ovocito; la proteína adaptadora β -catenina acompañó la localización de cadE. En ensayos *in vitro* de interacción de gametas (ensayo de Hemizona para evaluar la interacción espermática con la ZP y ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin ZP para evaluar la unión y fusión del espermatozoide al ovocito) los anticuerpos anti-cadE inhibieron de manera significativa la unión del espermatozoide a componentes asociados a la estructura de la ZP y la penetración de los espermatozoides a ovocitos de hámster (30). Asimismo, se identificó la presencia y colocalización en el espermatozoide de un modulador negativo de las funciones de cadE, la proteína disadherina e inicialmente identificada principalmente en células tumorales invasivas (31).

Los estudios sobre cadN confirmaron la expresión de la molécula de adhesión en el testículo y permitieron determinar los niveles de expresión del trans-

cripto en la gonada y el epidídimo. Asimismo, las evaluaciones revelaron la presencia de la forma completa de cadN de 135 KDa en extractos de testículo y espermatozoides eyaculados. La proteína fue inmunolocalizada en el capuchón acrosomal de espermatozoides no capacitados y capacitados, mientras que se localizó en el segmento ecuatorial de los reaccionados. Asimismo, cadN fue localizada en la superficie del ovocito. La preincubación de los espermatozoides con anticuerpos específicos no afectó su capacidad de interactuar con la ZP pero produjo una inhibición significativa de la penetración de los ovocitos de hámster, permitiendo proponer un rol para cadN en eventos que llevan a la fusión del espermatozoide al ovocito (32) (Figura 3).

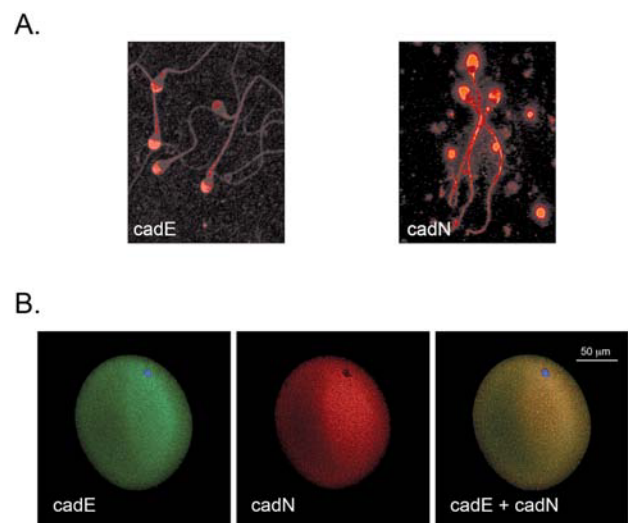


Figura 3. *Cadherinas epitelial y neural. Inmunodetección en gametas humanas.* Inmunolocalización de cadE y cadN en espermatozoides y ovocitos humanos **A.** Los espermatozoides fueron seleccionados y posteriormente fijados y sometidos a ensayos de inmunocitoquímica y registro por microscopía laser confocal. **B.** Inmunodetección de cadE y cadN en ovocitos humanos de descarte de programas de reproducción asistida sin ZP (estudios realizados en colaboración con el centro CEGYR) y evaluación empleando microscopía laser confocal. En A. y B. se emplearon los anticuerpos anti cadE (H-108) y anti cadN (H-63) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Santa Cruz Biotech) seguido de incubación con anti conejo marcado con CY3 (1:750). Como control se incluyó tinción con IgG de conejo 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (datos no mostrados) (datos de ref. 30 y 32).

Los estudios para ambas proteínas se han extendido a los modelos murino (Veiga *et al.*, resultados no publicados) y bovino (Caballero *et al.*, en consideración; Arzondo *et al.*, resultados no publicados), obteniéndose resultados que apoyan los encontrados en el modelo humano.

CADHERINA EPITELIAL Y LA PROGRESIÓN TUMORAL. ALTERACIONES EN LA ADHESIÓN CELULAR MEDIADA POR CADHERINA EPITELIAL. ESTUDIOS EN LÍNEAS CELULARES

La alteración de la adhesión celular es un mecanismo clave en la progresión tumoral y en los procesos de metástasis; como parte de ese proceso, en numerosos cánceres se han identificado anomalías en la expresión de cadE, la que se asocia de manera inversa a la agresividad del tumor. La pérdida de cadE en las células transformadas impide la formación de las uniones adherentes y les permite ignorar el ordenamiento tisular, infiltrar el estroma y eventualmente migrar hacia otros sitios. La supresión de la adhesión célula-célula puede disparar la liberación de células tumorales del tumor primario y conferirle propiedades invasivas. Los cambios en la expresión de cadE inducen respuestas celulares que llevan a la conversión de las células epiteliales en células con características mesenquimales, con un aumento de la motilidad y la invasividad, en un proceso llamado transición epitelio-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (33).

La presencia de alteraciones en la expresión de cadE ha sido documentada en numerosos tumores de diversos orígenes tisulares. Particularmente, el cáncer de mama es la causa principal de mortalidad por cáncer en mujeres, representando el 14%; es el tipo de cáncer más común en las mujeres y representa el 23% de los cánceres femeninos. Se ha descrito que la disminución parcial o total de cadE se asocia con la pérdida de características de diferenciación, la adquisición de invasividad celular, un mayor grado tumoral, un comportamiento metastásico de las células y un pronóstico pobre. Los estudios *in vitro* demuestran que las líneas celulares de cáncer humano con morfología epitelioide y diferenciada expresan cadE y son poco invasivas, mientras que las líneas con una morfología del tipo fibroblastoide son invasivas y han perdido la expresión de cadE. Como parte de los proyectos desarrollados por nuestro grupo en este área de investigación, se caracterizó la expresión de cadE y de proteínas relacionadas en las líneas celulares IBH-6 e IBH-4. Ambas líneas celulares fueron desarrolladas en el IBYME por la Dra. I.Luthy y col. a partir de carcinomas ductales infiltrantes de mama humanos. Como parte de los resultados, se identificó una forma distintiva de cadE de 89 kDa, truncada en el extremo C-terminal y presente en bajos niveles (<30% de la forma completa en células MCF-7), determinándose además la presencia de niveles de transcrito de cadE aproximadamente 1000 veces menores que en MCF-7. CadE presentó una localización intracelular puntillada y se contrapuso a la típica localización proteica en los bordes celulares y sitios de contacto en MCF-7; β -catenina acompañó a cadE y se identificaron cambios en la estructura de los filamentos de actina con detección de fibras de estrés de actina y una disminución de las adhesiones focales. Estos cambios son característi-

cos de la transformación celular y sugieren una reorganización dinámica del citoesqueleto celular (Figura 4). Los estudios se han extendido a la evaluación de modelos experimentales de cáncer murino de mama (Lapyckyj *et al*, manuscrito en elaboración), y de vejiga (Lapyckyj *et al*, manuscrito en elaboración). En colaboración con el grupo liderado por el Dr. J Reventós y col. del Hospital de Vall d'Hebron de Barcelona, España, nos encontramos estudiando diversos modelos de estudio de cáncer de endometrio y de ovario (análisis en curso). Los modelos serán empleados en el estudio de las bases moleculares del cáncer y podrán ser utilizados en el diseño de estrategias y herramientas para su diagnóstico y tratamiento.

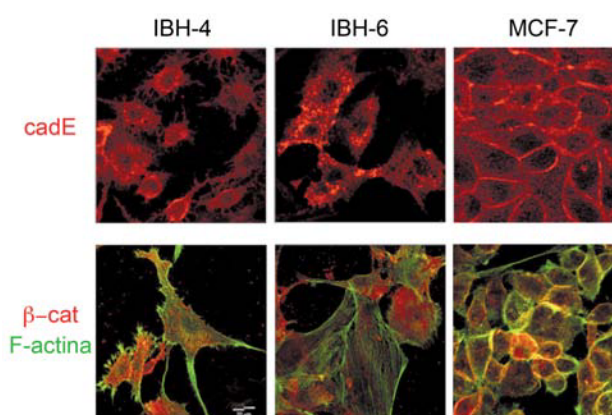


Figura 4. Expresión de miembros del complejo adherente: cadherina epitelial, β -catenina y actina filamentososa en líneas celulares de cáncer de mama humano. Análisis de localización de miembros del complejo adherente (cadE, β -catenina y actina filamentososa) líneas celulares de cáncer de mama humano IBH-4, IBH-6 y MCF-7. **A.** Inmunocitoquímica de fluorescencia y análisis por microscopía laser confocal de cadE (HECD-1, Zymed seguido de incubación con anti conejo marcado con CY3 1:750) en células IBH-6, IBH-4 y MCF-7. **B.** Detección de actina filamentososa (F-actina, verde) con faloidina-FITC (Invitrogen Life Technologies) en ensayos de colocalización con β -catenina (610153, BD Biosciences 1:1000), seguido de incubación con anti conejo marcado con CY3 1:750). Como control se incluyó tinción con IgG de conejo o ratón agregado a la misma concentración que el primer anticuerpo específico (datos no mostrados) (datos de ref. 34).

En conclusión, los proyectos abordados por nuestro grupo de investigación han contribuido a la comprensión de los eventos de interacción de las gametas durante la fecundación, así como entre las células somáticas durante la progresión tumoral.

Referencias bibliográficas

1. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: The Physiology of Reproduction. Editores: Knobil E y Neill JD. Nueva York: Raven Press; 1994.
2. Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* (2001);3:E59-E64.

3. Vazquez-Levin MH, Marín-Briggiler CI. An overview on the molecular mechanisms involved in human fertilization. En: *Infertility in the Male* (4ta Edición). Editores: L. Lipshultz, S. Howards, y C. Niederberger. Nueva York: Cambridge University Press; 2009.
4. Marín-Briggiler CI, Tezón JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril* 2002; 77(2): 252-9.
5. Marín-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverría F, Buffone M, Calamera JC, Tezón JG, Vazquez-Levin MH. Calcium requirements for human sperm function *in vitro*. *Fertil Steril* 2003; 79(6): 1396-403.
6. Marín-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Gonzalez-Echeverría F, Blaquier JA, Miranda PV, Tezón JG. Effect of antisperm antibodies present in human follicular fluid upon the acrosome reaction and sperm-zona pellucida interaction. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50(3): 209-19.
7. Marín Briggiler CI, Gonzalez Echeverria MF, Blaquier J, Tezon JG, Vazquez-Levin MH. Identifican proteínas espermáticas involucradas en la fecundación humana. Pagina de la Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC). <http://www.siicsalud.com/dato/autor.php/81116>
8. Marín-Briggiler CI, González-Echeverría MF, Munque MJ, Ghersevich S, Caille AM, Hellman U, *et al*. Glucose-regulated protein 78 (Grp78/BiP) is secreted by human oviduct epithelial cells and the recombinant protein modulates sperm-zona pellucida binding. *Fertil Steril* 2010; 93(5): 1574-84.
9. Marín-Briggiler CI, Chertihin O, Buffone M, Herr JC, Vazquez-Levin MH, Visconti P. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein Kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt9): 2013-22.
10. Hunter RHF, Fléchon B, Fléchon JE. Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: A scanning electron microscope study. *Tissue Cell* 1991; 23(5): 641-56.
11. De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 2005; 11(3): 205-14.
12. Delpino A, Castelli M. The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep* 2002; 22(3-4): 407-20.
13. Lachance C, Bailey JL, Leclerc P. Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Hum Reprod* 2007; 22(10): 2606-14.
14. Llanos M, Vigil P, Salgado AM, Morales P. Inhibition of the acrosome reaction by trypsin inhibitors and prevention of penetration of spermatozoa through the human zona pellucida. *J Reprod Fertil* 1993; 97(1): 173-8.
15. Urch UA. Biochemistry and function of acrosin. En: *Elements of Mammalian Fertilization*. Wassarman P. (Editor). Boca Raton, Florida, US: CRC Press, p. 233-48; 1991.
16. Vazquez-Levin MH, Furlong LI, Veaute C, Ghiringhelli PD. An overview of the proacrosin/acrosin system in human spermatozoa. En: *Treballs (Proceedings) de la Societat Catalana de Biología Endocrinologia molecular*. Volumen especial, p. 1-16; 2005.
17. Zahn A, Furlong LI, Biancotti JC, Ghiringhelli PD, Marín-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH. Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanism of activation in human sperm extracts. *J Reprod Immunol* 2002; 54(1-2): 43-63.
18. Biancotti JC, Furlong LI, Miranda S, Novella ML, Coronel CE, Vazquez-Levin MH. Caltrin-like proteins are found in human semen and may modulate proacrosin activation (en consideración).
19. Adham IM, Nayernia K, Engel W. Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod Dev* 1997; 46(3): 370-6.
20. Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 1994; 269(50): 31845-9.
21. Marí SI, Rawe V, Biancotti JC, Charreau EH, Dain L, Vazquez-Levin MH. Biochemical and molecular studies of the proacrosin/acrosin system in patients with unexplained infertility. *Fertil Steril* 2003; 79(Suppl 3): 1676-9.
22. Veaute C, Liu de Y, Furlong LI, Biancotti JC, Baker HW, Vazquez-Levin MH. Anti-human proacrosin antibody inhibits the zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction of ZP-bound spermatozoa. *Fertil Steril* 2010; 93(7): 2456-9.
23. Furlong LI, Hellman U, Krimer A, Tezón JG, Charreau EH, Vazquez-Levin MH. Expression of human proacrosin in *Escherichia coli* and binding to zona pellucida. *Biol Reprod* 2000; 62(3): 606-15
24. Furlong LI, Harris JD, Vazquez-Levin MH. Binding of recombinant human proacrosin/acrosin to zona pellucida (ZP) glycoproteins. I. Studies with recombinant human ZPA, ZPB, and ZPC. *Fertil Steril* 2005; 83(6): 1780-90
25. Furlong LI, Veaute C, Vazquez-Levin MH. Binding of recombinant human proacrosin/acrosin to zona pellucida glycoproteins. II. Participation of mannose residues in the interaction. *Fertil Steril* 2005; 83(6): 1791-6.
26. Veaute C, Furlong LI, Bronson R, Harris JD, Vazquez-Levin MH. Acrosin antibodies and infertility. I. Detection of antibodies towards proacrosin/acrosin in women consulting for infertility and evaluation of their effects upon the sperm protease activities. *Fertil Steril* 2009; 91(4): 1245-55.
27. Veaute C, Furlong LI, Cameo M, Harris JD, Vazquez-Levin MH. Antiacrosin antibodies and infertility. II. Gene immunization with human proacrosin to assess the effect of immunity toward proacrosin/acrosin upon protein activities and animal fertility. *Fertil Steril* 2009; 91(4): 1256-68.
28. Angst BD, Marozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt4): 629-41.
29. van Roy F, Bex G. The cell-cell adhesion molecule E-

- cadherin. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(23): 3756-88.
30. Marín-Briggiler CI, Veiga MF, Matos ML, Echeverría MF, Furlong LI, Vazquez-Levin MH. Expression of epithelial cadherin in the human male reproductive tract and gametes and evidence of its participation in fertilization. *Mol Hum Reprod* 2008; 14(10): 561-71.
 31. Gabrielli NM, Veiga MF, Matos ML, Quintana S, Chemes H, Blanco G, Vazquez-Levin MH. Expression of Dysadherin in the human male reproductive tract and in spermatozoa. *Fertil Steril* 2011; Jul 19. [Epub ahead of print].
 32. Marín-Briggiler CI, Lapyckyj L, González Echeverría MF, Rawe VY, Alvarez Sedó C, Vazquez-Levin MH. Neural cadherin is expressed in human gametes and participates in sperm-oocyte interaction events. *Int J Androl* 2010; 33(1): e228-39.
 33. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 442-54.
 34. Lapyckyj L, Castillo LF, Matos ML, Gabrielli NM, Lüthy IA, Vazquez-Levin MH. Expression analysis of epithelial cadherin and related proteins in IBH-6 and IBH-4 human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 2010; 222(3): 596-605.

LABORATORIO DE MECANISMOS MOLECULARES DE CARCINOGENESIS

Interacciones entre factores de crecimiento (GFs) y el receptor de progesterona (PR) en cáncer de mama.

Growth factors (GFs) and progesterone receptor (PR) crosstalks in breast cancer

Interações entre fatores de crescimento (GFs) e o receptor de progesterona (PR) em câncer de mama.

Patricia V. Elizalde, Cecilia Proietti, Roxana Schillaci, María E. Balaña, Leticia Labriola, Mariana Salatino, Wendy Béguelin, Romina Carnevale, Celeste Díaz Flaqué, Eduardo H. Charreau

Resumen

En trabajos previos hemos demostramos la existencia de interacciones bi-direccionales entre las vías de los progestágenos y de la heregulina (HRG) en cáncer mamario. Encontramos que los progestágenos regulan la actividad y expresión del ErbB-2 y de la HRG. Describimos que la interacción en-

tre la vía de la progesterona y de la HRG ocurre a nivel del PR que es activado transcripcionalmente por la HRG. Además encontramos que los progestágenos inducen la activación transcripcional de la proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3 (Stat3), que es un requisito para el crecimiento inducido por progestágenos en cáncer mamario. Demostramos que Stat3 es un punto de convergencia entre las vías de PR y de HRG/ErbB-2 en cáncer de mama, ya que la HRG, a través del ErbB-2, induce la activación de Stat3 mediante la integración del PR como molécula señalizadora. En línea con estos resultados, describimos la función de Stat3 como coactivador del PR activado por progesterona y como integrante de un complejo transcripcional en donde ErbB-2 actúa como coactivador de Stat3 sobre el promotor de ciclina D1. Estos resultados proveen nuevos blancos moleculares como terapéuticas alternativas para el tratamiento del cáncer de mama resistente a las terapias anti-hormonales y anti-tirosina quinasa.

Palabras clave: cáncer de mama * receptor de progesterona * ErbB2 * heregulina

Summary

Accumulating findings, including ours, have proven the presence of bidirectional interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways in breast cancer. On the one hand, we showed that PR activates the HRG/ErbB-2 pathway. On the other, we found that HRG induces PR transcriptional activation. We have provided the first demonstration that progestins induced transcriptional activation of the signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), which is an absolute requirement for progestin-mediated in vitro and in vivo breast cancer growth. We have identified Stat3 as a convergence point between PR and HRG/ErbB-2 signaling pathways in breast cancer, given that Stat3 is activated by HRG via ErbB-2 and through the co-option of PR function as a signaling molecule. In line with these results, we have described Stat3 as a coactivator of ligand activated-PR and as part of a novel transcriptional complex where ErbB-2 functions as a Stat3 coactivator in progestin-induced cyclin D1 promoter activation. These results provide novel molecular targets as alternative therapies for breast cancer resistant to anti-hormonal and anti-tyrosine kinase therapies.

Key words: Breast cancer * progesterone receptor * ErbB2 * heregulin ErbB2

Resumo

Em trabalhos prévios temos demonstrado a existência de interações bidirecionais entre as vias dos progestágenos e da heregulina (HRG) em câncer mamário. Encontramos que os progestágenos regulam a atividade e expressão do ErbB-2 e da HRG. Descrevemos que a interação entre a via da progesterona e da HRG ocorre em nível do PR que é ativado transcripcionalmente pela HRG. Além disso encontramos que os progestágenos induzem a ativação transcripcional da proteína transdutora de sinais e ativadora da transcrição 3 (Stat3), que é um requisito para o crescimento induzido por progestágenos em câncer mamário. Demonstramos que Stat3 é um ponto