

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  $\alpha_2$ -adrenérgicos y cáncer de mama

*$\alpha_2$ -adrenoceptors and breast cancer*

*Receptores  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -adrenergic subtype in 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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -adrenérgicos e no efeito de sua estimulação em diferentes modelos experi-*

*mentais de câncer de mama para contribuir a melhorar a qualidade de vida das pacientes. Em células tumorais e não tumorais mamárias humanas encontramos que as catecolaminas endógenas adrenalina e noradrenalina e o agonista específico  $\alpha_2$ -adrenérgico clonidina estimulam significativamente a proliferação celular. A inibição dos níveis de AMP cíclico se correlaciona com a estimulação de tais receptores. Temos descrito a expressão de pelo menos um subtipo de receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico nestas linhas tanto em nível de ARNm (medida por RT-PCR) quanto de proteína (por imunocitoquímica e união de um antagonista radiativo). Além disso temos demonstrado que os agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos aumentam o crescimento tumoral em modelos experimentais de câncer de mama (tumores induzidos originalmente por acetato de medroxiprogesterona e xenotransplantes de células tumorais humanas). Em todos os casos o antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico rauwolscine inibiu o crescimento dos tumores controle, podendo pensar em utilizá-lo como terapia adjuvante.*

**Palavras chaves:** *câncer de mama \* receptores adrenérgicos \* clonidina \* rauwolscine*

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres (23%) (1). En la Argentina, cada año, mueren aproximadamente 5.400 mujeres y se estima que se diagnostican alrededor de 17.000 casos nuevos (2). Es, además, el cáncer más prevalente en la mayoría de las áreas geográficas. Por lo tanto el cáncer de mama es un problema relevante para la salud en nuestro país así como en la mayoría de los países del mundo. Los antiestrógenos han sido la terapia más importante para las pacientes con cáncer de mama con receptores positivos y han logrado un indudable progreso en el tratamiento, mejorando significativamente la sobrevida (3). Sin embargo, en una gran proporción de pacientes, sobre todo en aquellas con recurrencia o metástasis, se produce resistencia al tratamiento (3). Por esta razón es de importancia clínica encontrar otros tratamientos con mecanismos de acción diferente para complementar las terapias disponibles.

Las experiencias estresantes activan componentes del sistema límbico, que incluye el hipotálamo, el hipocampo y la amígdala entre otras regiones. En respuesta a señales neurosensoriales, se activa por un lado el eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal y por otro lado el sistema simpático. Los ganglios cercanos a la médula espinal liberan noradrenalina, mientras que las células cromoaafines de la médula suprarrenal liberan adrenalina (4). Las catecolaminas naturales adrenalina y noradrenalina se unen a 9 receptores adrenérgicos, que se dividen en tres grandes grupos, receptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ -adrenérgicos, ejerciendo su acción a través de esta unión. Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G (GPCR). Luego de la unión de los ligandos endógenos epinefrina y norepinefrina, se pro-

duce un cambio conformacional que lleva a la activación de proteínas heterotriméricas que unen GTP. Los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos se acoplan fundamentalmente con proteínas G de la familia  $G_{i/o}$ . La señalización es tanto por la subunidad  $G\alpha$  inhibitoria como por las subunidades  $\beta\gamma$ . La activación de la proteína  $G\alpha_i$  lleva a una inhibición de la adenilil ciclasa que resulta en una disminución de los niveles intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). En cambio, la liberación de las subunidades  $\beta\gamma$  cumple importantes roles en la función celular (por ejemplo neuronal) mediante la regulación de canales de  $Ca^{2+}$  y la activación de proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPK) fundamentalmente kinasas reguladas por señales extracelulares (Erk) 1/2 (5).

Nuestro grupo ha estado trabajando durante los últimos años en la caracterización de los receptores  $\alpha_2$ -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. El objetivo de estos trabajos es contribuir al conocimiento de la influencia de estos receptores sobre la progresión de estos tumores.

En un primer trabajo sobre acción adrenérgica en células tumorales mamarias humanas MCF-7 (6), encontramos que las dos catecolaminas endógenas, adrenalina o epinefrina y noradrenalina o norepinefrina, así como también el agonista específico  $\alpha_2$ -adrenérgico clonidina estimulan significativamente la proliferación celular (medida por incorporación de timidina tritiada) a concentraciones ente 10 pM y 10 nM. Al incubar las células en presencia de antagonistas de los receptores adrenérgicos, se observó que el antagonista  $\alpha$ -adrenérgico propanolol no revertía este aumento de la proliferación celular, mientras que el antagonista  $\alpha$ -adrenérgico fentolamina y el antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico yohimbina sí lo hacían. Para corroborar un efecto  $\alpha_2$ -adrenérgico, se analizaron los niveles de AMP cíclico (AMPc) con las diferentes incubaciones. Se observó que adrenalina, noradrenalina y clonidina provocaban una inhibición de estos niveles, que era revertida por la presencia simultánea del antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico yohimbina.

Posteriormente hemos descrito los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en diversas líneas celulares de mama humana, tanto tumorales como no tumorales (7). Las líneas mamarias humanas IBH-6 e IBH-7 desarrolladas en el laboratorio a partir de tumores primarios de pacientes (8), la línea MCF-7 y la no tumoral HBL-100 expresan los subtipos de receptor  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos. En cambio expresan un solo subtipo las células malignas HS-578T ( $\alpha_{2A}$ ) y MDA-MB-231 y la línea no tumoral MCF-10A ( $\alpha_{2B}$ ). Todos los compuestos  $\alpha$  y  $\alpha_2$ -adrenérgicos compitieron efectivamente en ensayos de *binding* por los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, incluyendo adrenalina o epinefrina, noradrenalina o norepinefrina, yohimbina, clonidina, rauwolscina y prazosin (que es un

antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico con alta afinidad por los subtipos  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ ). Se comprobó la expresión de dichos receptores mediante inmunocitoquímica. En todas las líneas celulares los agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos provocaban un incremento en la proliferación celular.

Además hemos demostrado que los compuestos  $\alpha_2$ -adrenérgicos aumentan el crecimiento tumoral en modelos experimentales de cáncer de mama (9). Se confirmó la expresión de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en la línea tumoral mamaria murina MC4-L5 mediante inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y RT-PCR. La incubación de esta línea tumoral por 2 días con agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos (clonidina y dexmedetomidina) incrementa significativamente la proliferación celular. Estos agonistas también estimularon significativamente el crecimiento de todos los tumores analizados (C4-HD, CC4-2-HD y CC4-3-HI) independientemente de la sensibilidad al acetato de medroxiprogesterona y de la inoculación de esta hormona a los ratones. Estos tumores fueron desarrollados en el laboratorio de la Dra. Claudia Lanari (10). Los antagonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos yohimbina y rauwolscina revirtieron completamente el efecto del agonista clonidina. Sin embargo, el grupo que recibió solamente yohimbina mostró en todos los casos un incremento constante aunque no significativo del crecimiento tumoral mientras que la rauwolscina sola disminuyó en todos los casos significativamente el crecimiento tumoral, comportándose como un agonista inverso. En los tumores CC4-3-HI, el tratamiento con rauwolscina aumentó la apoptosis y disminuyó el índice mitótico, mientras que la clonidina tuvo la acción inversa. Posteriormente (11) se analizó el efecto de las líneas tumorales mamarias humanas desarrolladas en el laboratorio y creciendo en ratones desnudos (12). Se comprobó que la clonidina también aumentó el crecimiento tumoral de las células IBH-4 e IBH-6 creciendo en ratones inmunodeficientes. En este modelo experimental también se observó una reversión del efecto del agonista  $\alpha_2$ -adrenérgicos por parte del antagonista rauwolscina, que en ausencia del agonista inhibió el crecimiento tumoral, comportándose nuevamente como agonista inverso. Se realizaron cultivos primarios de estos tumores, separando las células epiteliales de las estromales. Al incubar las células en cultivo con clonidina, se observó que la misma estimulaba la proliferación celular de la fracción enriquecida en células epiteliales, de la fracción enriquecida en fibroblastos asociados a tumor y del cocultivo de ambas fracciones en ambos tumores (IBH-4 e IBH-6). El antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico rauwolscina revirtió en todas las fracciones el efecto de clonidina. Sin embargo cuando se incubaron las células solamente en presencia de rauwolscina todas las fracciones procedentes de tumores IBH-4 evidenciaron una inhibición de la proliferación celular, mientras que no se observó este efecto en las fracciones provenientes de tumores IBH-6. En ese mismo trabajo describimos que

los fibroblastos murinos normales y asociados a tumor expresaban receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos mediante inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Esta marcação era también visible en tumores murinos y humanos tanto en células epiteliales como estromales. Los compuestos  $\alpha_2$ -adrenérgicos en todos los casos estimularon la proliferación de ambos tipos celulares.

En conjunto, estos trabajos demuestran que los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos se expresan en tumores de mama tanto humanos como murinos y que su activación está asociada a un incremento de la proliferación celular y del crecimiento tumoral. En todos los casos el antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico rauwolscina revirtió el efecto proliferativo, y, lo que es más importante aun, en ausencia de agonistas inhibió la proliferación celular y el crecimiento tumoral al compararlo con el control, sugiriendo la posibilidad de su empleo como terapia complementaria para el cáncer de mama.

## Referencias bibliográficas

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-917.
2. Viniegra M, Paolino M, Arrossi S. Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. Organización Panamericana de la Salud; 2010.
3. Borley AC, Hiscox S, Gee J, Smith C, Shaw V, Barrett-Lee P, *et al.* Anti-oestrogens but not oestrogen deprivation promote cellular invasion in intercellular adhesion-deficient breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008; 10(6): R103.
4. Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, Dhabhar FS, Sephton SE, McDonald PG, *et al.* The influence of biobehavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(3): 240-8.
5. Hein L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res* 2006; 326(2): 541-51.
6. Vazquez SM, Pignataro O, Luthy IA. Alpha2-adrenergic effect on human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 55(1): 41-9.
7. Vazquez SM, Mladovan AG, Perez C, Bruzzone A, Baldi A, Luthy IA. Human breast cell lines exhibit functional alpha(2)-adrenoceptors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 50-61.
8. Vazquez SM, Mladovan A, Garbovesky C, Baldi A, Luthy IA. Three novel hormone-responsive cell lines derived from primary human breast carcinomas: functional characterization. *J Cell Physiol* 2004; 199(3): 460-9.
9. Bruzzone A, Pinero CP, Castillo LF, Sarappa MG, Rojas P, Lanari C, *et al.* Alpha(2)-Adrenoceptor action on cell proliferation and mammary tumour growth in mice. *Br J Pharmacol* 2008; 155(4): 494-504.
10. 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.
11. Bruzzone A, Pérez Piñero C, Rojas P, Romanatto M, Gass H, Lanari C, *et al.*  $\alpha_2$ -adrenoceptors enhance cell proliferation and mammary tumor growth acting through both the stroma and the tumor cells. *Current Cancer Drug Targets* 2011.
  12. Bruzzone A, Vanzulli SI, Soldati R, Giulianelli S, Lanari C, Luthy IA. Novel human breast cancer cell lines IBH-4, IBH-6, and IBH-7 growing in nude mice. *J Cell Physiol* 2009; 219(2): 477-84.

## LABORATORIO DE SEÑALIZACIÓN EN MELANOMA

El receptor Ror1 y su rol en cáncer

*The role of Ror1 receptor in cancer*

*O receptor Ror1 e seu papel em câncer*

Pablo López Bergami

### Resumen

Las proteínas Wnt son ligandos que activan señales involucradas en proliferación, supervivencia, adhesión, migración, diferenciación y polaridad celular y como tal están involucradas en una amplia variedad de patologías. A diferencia de la vía Wnt canónica (o dependiente de beta-catenina) la vía no canónica posee numerosas ramificaciones y ha sido muy poco estudiada. Evidencias obtenidas en los últimos años sugieren que la vía Wnt no canónica (a través de Wnt5a) jugaría un importante rol en la progresión de numerosos tipos de tumores, incluyendo melanoma. Tradicionalmente, la mayor parte de la señalización por Wnt ha sido atribuida a la activación de Fzd y LRP. Sin embargo, evidencias más recientes indican que Wnt puede ejercer sus efectos a través de receptores alternativos Ror1 y 2 (receptor huérfano 1 y 2 similar a tirosina quinasa). Estas proteínas son receptores de Tirosina Quinasa con una arquitectura funcional excepcional dentro de su familia ya que son los únicos en poseer dominios Kringle y dominios ricos en serina y treonina en el extremo C-terminal. Originalmente clonados como receptores huérfanos, su caracterización como receptores Wnt es relativamente reciente por lo cual su rol está en proceso de ser elucidado.

**Palabras clave:** Wnt no-canónico \* receptores Ror \* cáncer

### Summary

*Wnts are ligands that stimulate several signal transduction pathways involved in cell proliferation, survival, migration, and differentiation. Wnt pathway mal-*

*function has been implied in various forms of disease. The most extensively studied Wnt pathway, termed canonical, results in stabilization of  $\beta$ -catenin and activation of gene expression by TCF and LEF transcription factors. However, Wnts can also activate numerous non-canonical pathways which are independent of  $\beta$ -catenin. These non-canonical pathways have been much less studied. Recent evidences suggest that the Wnt non-canonical pathway (via Wnt5a) would play an important role in several types of cancer, including melanoma. The Wnt signaling has usually been related to activation of Fzd and LRP receptors. However, more recent data indicate that Wnt can activate the alternative receptors Ror1 and 2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 and 2). These proteins belong to the Tyrosine kinase family and have particular functional domain such as the Kringle domains and Serine/Threonine domains at the C-terminal. Originally cloned as orphan receptors, they were more recently characterized as Wnt receptors and their cellular role is being elucidated.*

**Key words:** non-canonical Wnt \* Ror receptors \* cancer

### Resumo

*As proteínas Wnt são ligandos que ativam sinais envolvidos em proliferação, sobrevivência, adesão, migração, diferenciação e polaridade celular e como tal estão envolvidas numa ampla variedade de patologias. A diferença da via Wnt canônica (ou dependente de beta-catenina) a via não canônica possui numerosas ramificações e tem sido muito pouco estudada. Evidências obtidas nos últimos anos sugerem que a via Wnt não canônica (através de Wnt5a) teria um importante papel na progressão de numerosos tipos de tumores, incluindo melanoma. Tradicionalmente, a maior parte da sinalização por Wnt tem sido atribuída à ativação de Fzd e LRP. Entretanto, evidências mais recentes indicam que Wnt pode exercer seus efeitos através de receptores alternativos Ror1 e 2 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 and 2). Estas proteínas são receptores de Tirosina Quinase com uma arquitetura funcional excepcional dentro de sua família já que são os únicos em possuir domínios Kringle e domínios ricos em serina e treonina no extremo C-terminal. Originalmente clonados como receptores órfãos, sua caracterização como receptores Wnt é relativamente recente pelo qual seu papel está em processo de ser elucidado.*

**Palavras chave:** Wnt não-canônico \* receptores Ror \* câncer

El melanoma es un grave problema sanitario debido a su creciente incidencia (es el quinto tumor más frecuente), su pésimo diagnóstico en el estadio metastásico y la falta de terapias efectivas. Distintos enfoques terapéuticos han fallado debido, entre otros motivos, a que en este tumor se observa una activación simultánea de varias vías de señalización. El objetivo general de los estudios que lleva adelante nuestro laboratorio es contribuir a mejorar el conocimiento de las vías de transducción de señales activas en melanoma. La suma de estos