



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

**Antiprogestágenos como agentes terapéuticos
en el tratamiento de
Cáncer de mama**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área ciencias de la salud**

Gonzalo Ricardo Sequeira

Director de tesis: Dra. Claudia Lanari

Director adjunto: Dra. Paola Rojas

Consejero de Estudios: Dr. Carlos Davio

Lugar de trabajo:
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)
Buenos Aires, Argentina

Marzo 2015

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mi directora de tesis Claudia Lanari la cual siempre estuvo disponible para cualquier tipo de discusión y de la mejor manera. A las personas del Instituto y a mis amigos del Instituto que generaron el mejor ambiente. A los chicos del laboratorio que les voy a guardar un enorme aprecio por siempre. A mi familia, que a la distancia cuando tengo un problema hacen hasta magia para ayudarme.

Porque creo que uno es la consecuencia de los que nos rodean, cada logro que se consigue es gracias a haberte cruzado a las personas correctas para que el logro ocurra.

Hay hombres que de su cencia
tienen la cabeza llena;
Hay sabios de todas menas;
más digo, sin ser muy ducho:
es mejor que aprender mucho
el aprender cosas buenas

Martín Fierro/ José Hernández (1834-1886)

Resumen

A pesar de los grandes avances que existen en el conocimiento del cáncer de mama, los principales tratamientos sistémicos que se utilizan para el tratamiento de la enfermedad avanzada son la hormonoterapia y la quimioterapia. En la actualidad, el tratamiento endócrino tiene como blanco al receptor de estrógenos (RE), aunque existen numerosas evidencias que indican que el receptor de progesterona (RP) también es un blanco promisorio. Existen dos isoformas del RP, ambas codificadas por el mismo gen, la isoforma A (RPA) y la isoforma B (RPB).

Los estudios de investigación en quimioterápicos están orientados a aumentar la eficacia de las drogas reduciendo sus efectos colaterales. Dentro de las antraciclinas, se han desarrollado liposomas pegilados de doxorubicina (DOX; PEG-LD) y en el grupo de los taxanos el paclitaxel (PAX) acoplado a albúmina (Nab-paclitaxel).

En esta tesis doctoral nos propusimos como objetivo evaluar la eficacia del antiprogéstágeno Mifepristona (MFP) en combinación con PEG-LD y Nab-paclitaxel. Los experimentos se realizaron en modelos de carcinomas mamarios murinos y humanos creciendo *in vivo*. Para ello se eligieron tumores con expresión diferencial de ambas isoformas del RP.

Utilizamos carcinomas mamarios pertenecientes al modelo murino inducido por acetato de medroxiprogesterona (MPA) desarrollado en el laboratorio. Se utilizaron 4 tumores con distinta relación RPA/RPB y sólo aquellos con mayor proporción de RPA que RPB se beneficiaron con las terapias combinadas de MFP y PEG-LD o Nab-paclitaxel. Los resultados fueron validados en xenoinjertos de células de cáncer de mama humano T47D-YA (expresan solo RPA) y T47D-YB (expresan solo RPB): sólo los xenoinjertos de T47D-YA se beneficiaron con las terapias combinadas por sobre las monodrogas. Los dos modelos mostraron alta sensibilidad a ambas drogas, sin embargo, algunos tumores del grupo RPA>RPB resultaron más sensibles a DOX, mientras que los tumores de tipo RPA<RPB fueron más sensibles a PAX.

Postulamos que la MFP, al inducir un mecanismo de remodelación tisular y vascular, podría afectar la entrada y acumulación de nanopartículas intratumorales. Demostramos que la MFP induce también una remodelación vascular con incremento de vasos sanguíneos inmaduros. Dichos vasos, presentan un buen grado de funcionalidad, mayor al de los vasos en los tumores controles, permitiendo

un aumento en el flujo sanguíneo. Esta remodelación estaría facilitando el ingreso de una segunda droga.

Se midieron los niveles de PEG-LD intratumorales indirectamente, evaluando la autofluorescencia de la droga, y la concentración de Nab-paclitaxel utilizando inmunofluorescencia indirecta determinando la cantidad de albúmina humana intratumoral. Demostramos un aumento en la concentración de nanoquimioterápicos en los tumores con niveles de RPA>RPB tratados con MFP, explicando así la mayor eficacia terapéutica observada en los tratamientos combinados. Los resultados se corroboraron evaluando la acumulación intratumoral de eritrocitos GFP inyectados en forma endovenosa.

Este fenómeno no es específico de MFP ya que el tratamiento con E₂, una hormona que al igual que MFP induce regresión tumoral en el modelo experimental murino, también mejoró la eficacia terapéutica de los tratamientos combinados utilizando los mismos tumores.

Para evaluar si la respuesta selectiva a la DOX observada *in vivo* se debía a un efecto directo sobre las células tumorales, se realizaron curvas de dosis-respuesta y análisis de ciclo celular en distintas variantes de la línea celular T47D. Si bien estos análisis se llevaron a cabo sólo con esta droga, corroboran los resultados observados *in vivo* y confirmaron la mayor susceptibilidad a la DOX de las células T47D-YA con respecto a las T47D-YB.

Por último, estudiamos en muestras derivadas de biopsias humanas, la respuesta a los distintos tratamientos antes mencionados y su correlación con el perfil de isoformas del RP a fin de determinar si se correspondían con los resultados observados en el modelo murino y en los xenoinjertos. Este análisis se llevó a cabo a través de cultivos tisulares de pequeñas secciones de tejido (100µm), incubados o no con las diferentes drogas durante 48 hs. Luego se evaluaron diferencias en la proliferación celular en los distintos tratamientos utilizando el marcador Ki-67. Las muestras con mayor proporción de RPA que RPB resultaron sensibles no sólo al tratamiento con MFP sino también al de DOX y no hubo diferencias significativas entre el tratamiento combinado y cada una de las monoterapias.

Las muestras con niveles de RPB mayor que RPA tratadas con MFP no mostraron disminución de la proliferación (índice de Ki-67) con respecto al control y el tratamiento con DOX fue efectivo en una de las dos muestras. Estos resultados, aunque preliminares por el bajo número de muestras estudiadas, en concordancia

con los resultados observados *in vivo*, sugieren que el aumento de la eficacia de los tratamientos combinados se debe a un fenómeno de remodelación tisular *in vivo*.

En conclusión, en este trabajo demostramos la importancia de la determinación de la relación entre las isoformas del RP en carcinomas mamarios debido a que: a) MFP podría aportar beneficios terapéuticos en los tumores RP+ del tipo RPA>RPB; b) MFP podría mejorar la eficacia en la llegada de partículas nanoquimioterápicas a los tumores RPA>RPB, en los cuales la quimioterapia está indicada. Por otro lado, los estudios abrieron una nueva línea de trabajo que consiste en evaluar si en los pacientes con carcinomas mamarios con niveles de RPA mayor a RPB la quimioterapia debiera estar basada en antraciclinas mientras que en los de proporción opuesta en taxanos.

Publicaciones relacionadas con el trabajo de tesis

Sequeira, G. et al., 2014. The effectiveness of nano chemotherapeutic particles combined with mifepristone depends on the PR isoform ratio in preclinical models of breast cancer ABSTRACT : *Oncotarget*, 5(10).

Las fotografías de DOX en ratones GFP de la anterior publicación fueron elegidas para formar parte de la portada de la revista Endocrine-Related Cancer en octubre del 2013. (<http://erc.endocrinology-journals.org/content/20/5/local/front-matter.pdf>)

Wargon, V. et al., 2014. Progesterin and antiprogestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoter. *International Journal of Cancer*.

El anterior trabajo que será publicado en el mes de julio del corriente año va a ocupar la tapa de la revista con una portada en la cual participe del diseño.

Presentaciones a Congreso relacionadas con el trabajo de tesis

2012 - **Gonzalo Sequeira**; Silvia I Vanzulli MD, PhD; Caroline A Lamb PhD; Paola A Rojas PhD; Claudia Lanari PhD. Mifepristone modifies the tumor microenvironment increasing the therapeutic efficiency of low doses of Paclitaxel-albumin nanoparticles or Doxorubicin liposomes in a murine model of breast cancer. CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, December 4-8 2012.

2013 - **Gonzalo Sequeira**; Paola A Rojas PhD; Maria May MD; Claudia Lanari PhD. Antiprogestin responsiveness of a human breast cancer xenograft model overexpressing progesterone receptors isoforms A (PRA) or B (PRB). AACR Annual meeting 2013, april 6-10, 2013, Washington, DC.

2013 - **Gonzalo Sequeira**, María May, Paola Rojas, Caroline Lamb, Alfredo Molinolo, Claudia Lanari. Antiprogestins administration to progesterone receptor isoform A (PRA)-overexpressing mammary carcinomas is associated with increased intratumor concentrations of doxorubicin and paclitaxel. Gordon Research Conferences: Hormone-Dependent Cancers Development and Progression July 28 - August 2, 2013 Bryant University Smithfield, RI.

2013 - **Gonzalo R Sequeira**, Silvia I Vanzulli, María May, Paola Rojas, Caroline A Lamb, Alfredo Molinolo and Claudia Lanari. Antiprogestins induce tumor vessels remodeling and increase the effects of albumin-bound paclitaxel or doxorubicin-pegylated liposomes in PR-A (+) but not in PR-B (+) T47D xenografts. *Advances in Breast Cancer Research: Genetics, Biology, and Clinical Applications* The Manchester Grand Hyatt San Diego, CA. October 3-6, 2013.

2013 - **Gonzalo Sequeira**, Silvia I Vanzulli, María May, Caroline Lamb, Alfredo Molinolo, Claudia Lanari. Los antiprogestágenos aumentan la accesibilidad de nanopartículas quimioterapéuticas en carcinomas mamarios con alta expresión de RP-A. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, del 16 al 19 de noviembre del 2013, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Índice

INTRODUCCIÓN	18
Incidencia y mortalidad en cáncer de mama	19
Factores de Riesgo	19
Clasificación molecular en cáncer de mama	20
Terapias en cáncer de mama.....	21
Terapias Biológicas	21
Terapias Hormonales	23
Quimioterapia.....	31
Terapias combinadas	38
Modelos en cáncer de mama	39
Modelos experimentales de cáncer de mama murinos	41
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	45
Construcción de la hipótesis.....	46
Objetivo general:	46
Objetivos particulares:.....	46
MATERIALES Y MÉTODOS	48
Animales.....	49
Tumores	49
Líneas celulares utilizadas	50
Xenoinjertos	51
Tratamientos de quimioterápicos	51
Tratamiento de antiprogestágenos.....	52
Seguimiento de los animales.....	52
Western Blot.....	53
Estudios de toxicidad y selección de dosis	54

Cálculo de la equivalencia de dosis entre ratones y humanos	54
Estudios de fluorescencia	55
Cuantificación del estroma	55
Lectina de tomate (LT)	56
Inmunofluorescencia (IF).....	56
Tabla 2.1. Anticuerpos utilizados en este trabajo.....	57
Inyección de Glóbulos rojos GFP (GR-GFP).....	58
Determinación intratumoral de drogas	59
Estudios de inmunohistoquímica (IHQ).....	59
Evaluación de proliferación celular /apoptosis <i>in vitro</i>	60
Selección de pacientes	61
Cultivo de Tejidos y procesamiento de muestras humanas	61
Análisis estadístico.....	63
RESULTADOS.....	64
PEG-LD y Nab-paclitaxel en terapias combinadas con MFP en un modelo murino..	65
Evaluación de la toxicidad de PEG-LD vs. DOX en función a la pérdida porcentual de peso en ratones BALB/c.....	65
Comparación de la eficacia terapéutica de DOX y PEG-DL sobre el crecimiento de tumores del modelo de carcinomas mamarios inducidos por MPA	66
PEG-DL en terapias combinadas con MFP en carcinomas mamarios con distinta relación RPA/RPB.....	68
Eficacia de Nab-paclitaxel en terapias combinadas con MFP en carcinomas mamarios con distinta relación RPA/RPB	75
PEG-LD y Nab-paclitaxel en terapias combinadas con MFP en un modelo experimental de células de cáncer de mama humano	78
Estudio de los mecanismos implicados en el aumento de eficacia de MFP en combinación con PEG-LD o Nab-paclitaxel	86
El efecto inducido por MFP puede ser producido por otras drogas que aumenten la remodelación tisular	94

Efecto de DOX <i>in vitro</i> sobre células T47D, T47D-YA O -YB.....	95
Efecto de DOX y MFP <i>in vitro</i> sobre cultivos tisulares de cáncer de mama humano	100
DISCUSIÓN	104
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	112
APÉNDICE	116
BIBLIOGRAFÍA	124

Abreviaturas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CK	Citoqueratinas
DAB	diaminobenzidina
DOC	Docetaxel
DOX	Doxorubicina
E₂	17 beta estradiol
ERE	Elementos de respuestas a estrógenos
FAC	Citomería de flujo
FUL	Fulvestrant (ICI 182780)
GFP	<i>Green fluorescent protein (proteína fluorescente verde)</i>
GR	glóbulos rojos
GR-GFP	glóbulos rojos de ratones BALB/c GFP
Hs	Horas
H&E	Hematoxilina y Eosina
IAs	Inhibidores de Aromatasa
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Ioduro de propidio
KO	<i>Knock out</i>
LON	Lonaprisan
LT	Lectina de tomate
MDR-1	Gen de resistencia a multidroga 1
MFP	RU-486 o Mifepristona
MMPs	Metaloproteasas
MMTV	Virus de tumor mamario murino
MPA	acetato de medroxiprogesterona
Nab-paclitaxel	PAX unida a la albúmina
NSG	ratones <i>NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice</i>
OH-TX	Hidroxitamoxifeno
ON	<i>overnight</i>
ONA	Onapristona (ZK 98.299)
PAX	Paclitaxel
PBS	<i>buffer</i> fosfato
PEG-DL	Doxorubicina Liposomada

RA s	Receptores de Andr3genos
RE s	Receptores de estr3genos
RH	Receptores hormonales
RPA	Isoforma A del RP
RPB	Isoforma B del RP
RP s	Receptores de progesterona
RTK s	Receptores de tirosina quinasa
RX	Raloxifeno
SERM s	Moduladores selectivos del receptor de estr3genos
SFB	Suero fetal bovino
TX	Tamoxifeno
VEGFR	Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
3D	3 dimensiones
2D	2 dimensiones

Prólogo

El cáncer de mama a nivel mundial es el cáncer más frecuente en mujeres. Con el advenimiento de las nuevas clasificaciones moleculares se ha podido avanzar en la selección de las mejores estrategias terapéuticas a utilizar. Si bien el diagnóstico precoz ha producido una disminución en la mortalidad, aun queda mucho camino por recorrer.

Nos propusimos evaluar el desempeño de determinados tratamientos combinados en cáncer de mama centrándonos en su clasificación molecular y en la racionalidad de su tratamiento. Utilizamos un antiprogestágeno, Mifepristona, que luego de hacer blanco en el Receptor de Progesterona inhibe su actividad y dos agentes quimioterapéuticos. Los quimioterápicos que se utilizaron pertenecen a dos familias de drogas de gran importancia en el tratamiento de esta enfermedad, las antraciclinas y los taxanos.

Para entender la importancia de este trabajo de tesis y el por qué de ciertos aspectos metodológicos es necesario describir algunos temas que serán tratados en la introducción. Empezando por la repercusión del cáncer de mama en la salud humana, algunas de las distintas terapias disponibles con especial relevancia en la hormonoterapia, el Receptor de Progesterona y Mifepristona, los agentes quimioterápicos y los mecanismos de acción de las antraciclinas y los taxanos.

Por último se describirán los modelos experimentales in vitro e in vivo que resultaron ser adecuados para el contexto particular en el que fueron utilizados y lo suficientemente buenos para responder a los objetivos que nos planteamos. Su selección racional nos permitió disecar los fenómenos a nivel histológico de los que ocurren a nivel

celular dejándonos ver que ciertos problemas son mejor entendidos si se analizan al nivel adecuado.

Introducción

Incidencia y mortalidad en cáncer de mama

El cáncer de mama a nivel mundial es el cáncer más frecuente en mujeres con aproximadamente 1,5 millones de casos nuevos diagnosticados por año. Constituye el 25 por ciento de todos los cánceres en mujeres y es el responsable de ocasionar 522.000 muertes anuales (Ferlay et al. 2015). En Estados Unidos, pese a que el cáncer de mama sigue siendo el de mayor incidencia en mujeres, la mortalidad causada por el mismo pasó a ser superada, desde los años 90, por el cáncer de pulmón (Siegel et al. 2015). Es interesante resaltar que la Argentina puede considerarse como uno de los países con una incidencia media o alta. Dentro de los casos totales de cáncer, en nuestro país el de mama constituye un 18% de la totalidad de los casos y un 36% de casos de cáncer en mujeres. Le sigue en orden de número de casos, el cáncer de próstata en hombres (<http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>). Estos datos destacan la importancia del estudio del cáncer de mama en Argentina.

Factores de Riesgo

En nuestro país, así como en el resto del mundo, la alta tasa de incidencia de cáncer de mama en principio no estaría asentada en razones genéticas, sino que serían de índole ambiental. Se comprobó que inmigrantes en Argentina adquieren las tasas de mortalidad por cáncer de mama de los nacidos en nuestro país (Matos et al. 1991). El cáncer de mama de origen genético abarca a menos del 5% de los cánceres de mama humanos y están ligados a mutaciones de los genes *BRCA1* (55-85%) o *BRCA2* (35-60%) descubiertos en los años 1994 y 1995 respectivamente [citado en (Venkitaraman 2002; Lagos-Jaramillo et al. 2011)], en menor medida están asociados a mutaciones de *TP53* (<1%; Síndrome de Li-Fraumeni), de *PTEN* (<1%; enfermedad de Cowden) o de *LKB1* (síndrome de Peutz-Jeghers). Estas mutaciones de alta penetrancia son de fácil detección en el laboratorio bioquímico molecular. Tanto *BRCA1* como *BRCA2* están involucrados en la reparación de DNA de doble cadena. Curiosamente *BRCA1* también se encuentra involucrado en la

regulación transcripcional del receptor de estrógeno (RE) y de progesterona (RP), aunque los tumores *BRCA1+* son en general RE negativos (Poole et al. 2006).

Dentro de los factores causales de esta enfermedad se encuentra la exposición a hormonas (menarca temprana/ menopausia tardía), la nuliparidad, las terapias de reemplazo hormonal como así también la exposición a radiaciones ionizantes, el alcohol, la obesidad a edad avanzada o susceptibilidades de índole genético no asociadas a los genes de alta penetrancia anteriormente descritos (Siegel et al. 2012).

Clasificación molecular en cáncer de mama

Históricamente la clasificación del cáncer de mama se basó en las características histopatológicas incluyendo el tipo histológico y el grado nuclear. Luego se incluyó la expresión de REs y de RPs como así también posteriormente, la sobreexpresión o la amplificación del gen *c-ERBB2/HER2*. Estos marcadores determinan la prognosis y la respuesta potencial a terapias endócrinas o al anticuerpo trastuzumab (Herceptin).

Con el advenimiento de las técnicas moleculares se intentaron nuevas clasificaciones que tuvieran en cuenta la expresión de nuevos *clusters* de genes. Se han definido 5 grupos principales dentro de los tumores de mama: 2 grupos RE+ denominados luminal A y luminal B, los que tienen alta expresión de HER2, los basales, que serían principalmente los triple negativos y los que se asemejan a tejido normal (Vuong et al. 2014). Luego se incorporaron los grupos denominados *claudin low*, y *molecular apocrine* (Prat et al. 2010). Todos estos grupos presentan características biológicas distintivas.

Los grupos luminal A y B se caracterizan por la expresión de citoqueratinas (CK) típicas de células luminales de la glándula mamaria, como la CK 8, y por su alta expresión de REs. Esto define que tengan una alta expresión de genes regulados por el RE como ser el RP, el factor de transcripción GATA-3, la proteína de unión X y el factor nuclear alfa 3 de hepatocitos, los cuales también son expresados por las células luminales normales de mama.

Los tumores con alta expresión de HER2 también suelen sobreexpresar otros genes que se encuentran alojados en el mismo amplicón en la región 17q. El subtipo

basal like no expresa REs o RPs, pero expresa CK-5 y CK-17, las cuales también son expresadas por la capa de células basales del epitelio de mama normal. En lo que respecta al *normal like* corresponde a un tipo de tumor que expresa genes comúnmente atribuidos a tejido adiposo. El subtipo de *claudin low* está asociado a una baja expresión de claudinas 3, 4 y 7 como así también de E-cadherina y CD24 (Prat et al. 2010). Por último, el subtipo molecular apócrino no expresa REs pero sin embargo, sí expresa altos niveles de Receptores de Andrógenos (RAs).

Cada uno de los subtipos moleculares de cáncer de mama tiene una diferente prognosis, siendo los basales los de peor pronóstico. También se realizaron correlaciones entre los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama y la respuesta a quimioterápicos, siendo los basales y los que expresan altos niveles de HER2 los que muestran una mayor respuesta (Rouzier et al. 2005).

Terapias en cáncer de mama

Para el tratamiento de esta enfermedad existen numerosas estrategias y distintas terapias de aplicación sistémica. Las terapias de naturaleza sistémica pueden aplicarse antes de la cirugía (neo-adyuvancia) con el objetivo de reducir el tamaño tumoral antes del proceso quirúrgico o después de la cirugía (adyuvancia) para eliminar células malignas residuales en el sitio de la intervención, o a aquellas células tumorales que se puedan haber diseminado a sitios distantes del tumor primario. En aquellos casos en los cuales el tumor se encuentra alojado en un sitio anatómico de difícil acceso para procesos quirúrgicos, las terapias sistémicas junto con las terapias de rayos constituyen la única opción (Moulder & Hortobagyi 2008).

A continuación se hará mención a algunas las terapias utilizadas actualmente.

Terapias Biológicas

Las terapias biológicas son todas aquellas terapias en las que se usan como herramientas moléculas derivadas de organismos vivos o análogos de éstas, con el objetivo de modular procesos biológicos. Como por ejemplo, tratar de exacerbar el

sistema inmune con el objetivo de aumentar su capacidad de detectar y eliminar células tumorales (Tinoco et al. 2013).

Entre los ejemplos más conocidos de terapias biológicas se encuentran aquellas que hacen blanco en miembros de la familia del receptor de crecimiento epidérmico, como el ya mencionado trastuzumab (Herceptin) y el pertuzumab, ambos anticuerpos recombinantes monoclonales humanizados cuyo blanco es el HER2, miembro de la familia de receptores de tirosina quinasa (RTKs). Éste evita que el receptor interaccione con otros receptores miembros de la familia, deteniendo la proliferación celular e induciendo apoptosis. Ha demostrado ser útil en el tratamiento de un 25 a un 40% de carcinomas mamarios que muestran sobreexpresión de este receptor previamente confirmada por inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación *in situ* (Cheang et al. 2009; Esserman et al. 2012).

Dentro de este grupo de terapias también se encuentran las terapias antiangiogénicas, ya que la angiogénesis es un proceso clave en distintas etapas de la progresión tumoral. Para lograr este bloqueo se dispone del Sunitinib o Bevacizumab, que tienen como objetivo bloquear al Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGFR). Los ligandos de este receptor son los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F). Estas drogas demostraron ser útiles en terapias de adyuvancia de cáncer de mama metastásico en combinación con quimioterápicos como el Docetaxel (DOC) o incluso con Trastuzumab en estudios clínicos de fase II y III (Bachelot et al. 2014; Bergh et al. 2012).

Por último se encuentran las terapias que intentan reducir los efectos negativos en la salud provocadas por las metástasis óseas de cáncer de mama, los bifosfonatos. Estos compuestos son capaces de inhibir el proceso de resorción ósea que es clave para el ingreso de las células tumorales en los sitios de metástasis óseas, sitio frecuente de metástasis en cáncer de mama. Esto se debe a que cuando las metástasis se alojan en los huesos se genera un círculo vicioso en el cual las células tumorales promueven la actividad de los osteoclastos (células especializadas en la resorción ósea), y al mismo tiempo los osteoclastos liberan factores de crecimiento del hueso que promueve la proliferación de las células tumorales. La resorción además da lugar a fracturas patológicas, dolor óseo, eventos de compresión de la médula espinal e hipercalcemia (Coleman 2005).

Terapias Hormonales

Las terapias hormonales son aquellas en las cuales intervienen hormonas, agonistas o antagonistas hormonales o incluso agentes que regulan la producción de hormonas para finalmente modificar la acción del RE o del RP o incluso ambos ya que sus funciones están interrelacionadas. En resumen esto se consigue impidiendo el funcionamiento del receptor directamente, o interrumpiendo la producción de sus ligandos.

Las primeras ideas sobre la importancia de las hormonas endógenas en el crecimiento de los tumores mamarios provienen de estudios realizados por Beatson quien documentó que ocurrían regresiones tumorales luego de realizar ooforectomías a las pacientes (Beatson, GT 1896).

Luego del descubrimiento de las vías de señalización de los receptores hormonales (RHs), se abrió el panorama para el diseño de agentes farmacológicos capaces de interrumpir la acción de estos receptores con un objetivo terapéutico, ya que las células tumorales de cáncer de mama en general son dependientes para su proliferación de la actividad de estos receptores (Smith & Toft 1993).

Terapias hormonales que tienen como blanco terapéutico al RE

Existen dos isoformas del RE, RE α y RE β , las cuales se expresan a partir de distintos genes ubicados en los cromosomas 6 y 14. Su expresión es tejido específica. Los RE funcionan en forma de dímeros y ambas isoformas son capaces de unirse entre ellas para constituir heterodímeros. Éstas luego de dimerizarse se unen al ADN a secuencias conocidas denominadas elementos de respuestas a estrógenos (ERE) y de esta manera activan la transcripción de sus genes blanco (Osborne et al. 2004).

Con el objetivo de aprovechar la señalización del RE con fines terapéuticos se diseñaron numerosos moduladores selectivos del RE (SERMs) como lo son el tamoxifeno (TX) y el raloxifeno (RX). Estos son capaces de unirse al RE debido a las similitudes estructurales con los estrógenos, los ligandos naturales. Sin embargo, luego de la unión ejercen efectos funcionalmente distintos tanto en las células

normales como en las tumorales y pueden funcionar como agonistas o antagonistas en forma tejido específica (Jackson et al. 1997).

El TX fue utilizado por décadas para el tratamiento del cáncer de mama RE+ incluso en estadios avanzados y mostró un grado de efectividad similar a la ablación ovárica en mujeres premenopáusicas (Ingle et al. 1986). Cuando se utilizó durante 5 años como terapia adyuvante el uso del TX redujo un 47% la reincidencia y un 26% la mortalidad en mujeres RE+ (Breast et al. 2005) e incluso recientemente se llegó a la conclusión que el uso prolongado de TX, mayor a 5 años, resulta aun más beneficioso (Davies et al. 2013).

Si realizamos una comparación entre el RX y el TX, una desventaja del TX es que da lugar a una mayor cantidad de efectos colaterales a nivel de eventos tromboembólicos y ginecológicos. Sin embargo, cuando ambas drogas se compararon en el mismo ensayo clínico la eficacia del RX fue aproximadamente de un 25% menor que la del TX (Sestak 2014).

Otro tipo de terapia endócrina disponible que hace foco en el RE involucra a los Inhibidores de Aromatasa (IAs), que interrumpen la producción de los estrógenos. Dentro de este grupo los de mejor eficacia son los de tercera generación, entre los que se encuentran Anastrozole, Letrozole y Exemestano. Estos mostraron una mayor eficacia terapéutica que los SERMs como el TX y son los aconsejados en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama tanto *in situ* como metastásicos RE+ (Fabian 2007). Sólo son recomendados en mujeres post-menopáusicas debido a que la presencia de cierta función ovárica residual ante la presencia de IAs dispara el incremento de esteroides a nivel fisiológico que podría favorecer el crecimiento tumoral (Van Asten et al. 2014).

Por último cabe mencionar al Fulvestrant (FUL; ICI 182780) que es un antiestrógeno puro debido a que no muestra actividades agonistas, muy importante si consideramos el problema endometrial asociado con los SERMs. El FUL ha mostrado una actividad terapéutica similar a los IAs en tratamientos de segunda línea en carcinomas mamarios que habían resultado refractarios al TX. El inconveniente que tiene el FUL, lo cual es compartido con los IAs, y a diferencia del TX, es que los pacientes tratados con estas drogas tienden a presentar problemas óseos debidos a la acción de antagonista estrogénico en hueso (Howell et al. 2005).

Debido a que en este trabajo se va a hacer uso de un tipo particular de hormonoterapia que hace blanco en el RP se hace necesario hacer una revisión de las características estructurales y funcionales de este RH.

Receptor de Progesterona

El RP se encuentra constituido por dos isoformas, la A y la B (RPA y RPB respectivamente) las cuales se expresan a partir de un único gen pero de distintos promotores (Kastner et al. 1990). Ambas generalmente se coexpresan en una relación 1:1 en los tejidos normales. RPB tiene un peso molecular de 120 kDa en humanos (115 kDa en ratones) y RPA 94 kDa (83 kDa en ratones) ya que carece de un fragmento N-terminal presente en la isoforma B denominado BUS (Fig. 1.1.).

Clásicamente se describió que el mecanismo de acción de este receptor depende totalmente de la unión de su ligando. Éste induciría fosforilaciones en el receptor que lo liberarían de las proteínas chaperonas que lo mantienen estable en el citoplasma y posteriormente se translocaría al núcleo en donde es capaz de regular la expresión de sus genes blanco previa dimerización (Graham et al. 1995). Posteriormente se demostró que el RP se puede activar en forma ligando independiente por factores de crecimiento (Lange et al. 1998; Lamb et al. 1999; Labriola et al. 2003; Cerliani et al. 2011) y además que puede tener una localización en la membrana celular (Bottino et al. 2011) activando vías de señalización no genómicas (Lange 2008).

Se ha demostrado que la activación de RPA estaría asociada a funciones de represión génica y sobre todo tendría una función de inhibir la transcripción inducida por RPB o por otros receptores hormonales (Clark & McGuire 1983). Datos previos extraídos de *arrays* de expresión génica indican que ambas isoformas, tanto en presencia como en ausencia de ligando, son capaces regular la expresión de distintos genes. Incluso RPA es más activa en la regulación génica en ausencia de ligando. Es interesante destacar que ambas isoformas son capaces de regular algunos genes del ciclo celular como *p21* y Ciclina D1 (*CCND1*), mientras que BCL-XL, un gen que codifica para una proteína antiapoptótica, es regulada exclusivamente por RPA. RPB está más asociada al control de genes involucrados

en el desarrollo de la glándula mamaria y su diferenciación (J. K. Richer et al. 2002; Jacobsen et al. 2002a).

Los estudios realizados con ratones *knock out* (KO) para RPA o RPB muestran claramente las funciones diferentes de ambas isoformas en mama y en útero, siendo RPA más relevante en endometrio y RPB en la glándula mamaria, demostrando una vez más que ambas isoformas del RP tienen distintas funciones y que su expresión difiere tanto temporal como espacialmente cumpliendo con roles diferentes durante el desarrollo de la glándula mamaria (Aupperlee et al. 2005).

En la mayoría de los carcinomas mamarios existe un desbalance de estas isoformas con la supremacía alternativa de una de ellas. Con respecto a qué es lo que provoca este desbalance en los pacientes con cáncer de mama aún no está muy claro, pero uno de los mecanismos involucrados podría ser el silenciamiento por metilación (Wargon et al. 2011; Pathiraja et al. 2011)

En cuanto a los trabajos en bibliografía que muestran estudios de isoformas de RP en muestras de pacientes con cáncer de mama podemos mencionar los llevados a cabo por el grupo de Clarke y col., quien estudió la relación de isoformas en tejidos normales, hiperplasias ductales y carcinomas *in situ*. Este estudio permitió determinar que el desbalance en las isoformas del RP se da muy temprano en la progresión tumoral. Y de esta manera proponen que la relación de isoformas no sólo es importante en la prognosis, sino que también podría funcionar como un marcador temprano de malignidad (Mote et al. 2002).

Es importante el trabajo del grupo de Fuqua y col., en el cual se utilizaron 297 pacientes con metástasis en ganglio axilar. La determinación de la relación de isoformas del RP se hizo a través de inmunoblot. El objetivo fue correlacionar la relación de RP con la respuesta a la terapia endocrina y los autores concluyeron que aquellos pacientes con mayores niveles de RPA que RPB, que son el 60% de los tumores RP+, tienen 2,97 más probabilidad de tener una recidiva luego del tratamiento con TX (Hopp et al. 2004). Curiosamente, en un trabajo posterior en el cual se estudiaron 500 pacientes sin tratamiento sistémico o con terapia con TX se observó que la metilación de RPA, o sea su silenciamiento, correlacionaba con peor pronóstico (Pathiraja et al. 2011).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio realizando *Western blots* de muestras de pacientes con cáncer de mama coinciden con las proporciones ya

publicadas y la mayoría de los pacientes presentan una mayor proporción de RPA que de RPB (Mote et al. 2002) (Rojas et al 2010, SABC. Texas).

En estudios con líneas celulares creciendo *in vitro* se ha sugerido que la isoforma RPB en ausencia de ligando estaría asociada a mayor migración celular. La incubación con un progestágeno disminuiría este efecto, mientras que la MFP tendría un efecto opuesto. RPA por otra parte, potenciaría el efecto de RPB sólo en ausencia de ligando (Bellance et al. 2013).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, y resultados preclínicos obtenidos en nuestro laboratorio proponemos que el grupo de pacientes con altos niveles de RPA son los que se beneficiarían de una terapia con antiprogestágenos, moléculas que son capaces de inhibir la actividad del RP (Lanari et al. 2012).

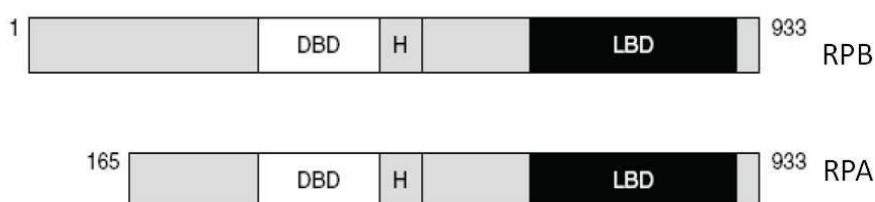


Fig. 1.1. Esquema ilustrando las isoformas de RP. LBD (sitio de unión del Ligando), DBD (sitio de unión al DNA), H (bisagra). Se puede observar el mayor tamaño de la isoforma B con respecto a la A constituido por el segmento BUS. Extraído de (Lanari et al. 2012).

Terapias hormonales que tienen como blanco terapéutico al RP

En este trabajo utilizamos el RU-486 o Mifepristona (MFP). Es el primer antiprogestágeno que fue utilizado en la clínica (Baulieu 1986) y fue desarrollado en Francia como antiglucocorticoide; sin embargo, su capacidad de unirse también al RP expandió su uso como agente abortivo [revisado en (Tieszen et al. 2011)]. Los ensayos clínicos se iniciaron en 1982 y fue rápidamente adoptada por el Reino Unido y Suecia (Mackenzie 1997). Una de las principales ventajas que posee en la actualidad con vistas a ser usada como agente de hormonoterapia en cáncer de

mama, es que es una droga ampliamente conocida desde el punto farmacológico (Simmonds 2002).

Para inducir abortos tempranos se administra en dosis de 600 mg seguida de una dosis de 40 mg de Misoprostol (Prostaglandina) por vía oral. Esto permite evitar las intervenciones quirúrgicas para provocar abortos que traen aparejado un mayor riesgo.

En Estados Unidos hace 15 años se aprobó el uso de MFP como agente abortivo en forma conjunta con Misoprostol y hace 3 años para el tratamiento del síndrome de Cushing (U.S. food and drug administration: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm111334.htm>). MFP muestra una alta afinidad por el RP y por el receptor de glucocorticoides (RG) (Baulieu 1986), donde su actividad antiglucocorticoide le otorga su potencialidad terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Cushing. Las dosis en este caso son superiores a 300 mg diarios y se administran por vía oral sin mostrar efectos tóxicos adicionales a los inducidos por su efecto endócrino (Check et al. 2010).

Desde su desarrollo en el año 1986, se propuso su uso para el tratamiento de distintas neoplasias, entre ellas meningiomas y cáncer de mama (Horwitz, 1992).

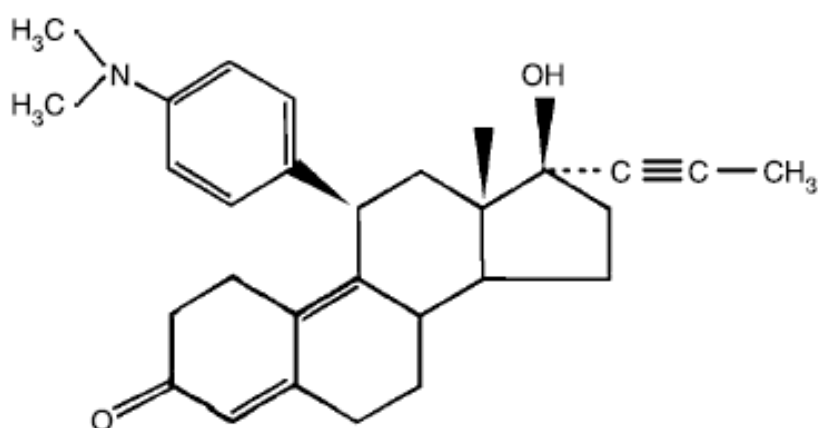


Fig. 1.2. Estructura química de Mifepristona (11-[4-(dimetilamino)fenil]-17-hidroxi-17-[1-propinil]-[11b,17b]-oestra-4,9-diene-3-one).

Mifepristona in vitro

En experimentos *in vitro*, hace ya tres décadas se demostró en pruebas llevadas a cabo con células de cáncer de mama humano T47D y MCF-7, que MFP e hidroxitamoxifeno (OH-TX) a bajas concentraciones (1-10 nM) inducen un efecto citotóxico y citostático (detención en G1-G0) en una fracción de las células. Ambos efectos a estas concentraciones han sido considerados receptor específicos ya que pueden ser revertidos por R5020, un agonista del RP y 17- β -estradiol (E_2) el ligando del RE.

En concentraciones mayores ejercen un efecto citotóxico que no puede ser revertido por agonistas y por ende estaría involucrando a otros mecanismos receptor independiente (Bardon et al. 1987).

Ensayos clínicos

En el año 1989 se realizó un ensayo clínico con 11 pacientes utilizando MFP como terapia de segunda línea luego del tratamiento con TX. El objetivo principal de este estudio fue evaluar los efectos colaterales. La MFP fue administrada en dosis orales de 200 a 400 mg diarios y a pesar de que no hubo una selección de los pacientes basada en algún criterio en función al estado de sus RH, se observó una clara respuesta en un paciente, una estabilización corta en 6 pacientes y progresión de la enfermedad en 4. En cuanto a los efectos colaterales se observaron algunos asociados principalmente a su actividad antiglucocorticoide (Klijn et al. 1989).

En otro estudio realizado con el antiprogéstágeno puro Onapristona (ONA; ZK 98.299, Schering) como tratamiento de primera línea se reclutaron 19 pacientes, RE+ y 18 también eran RP+. En este ensayo se consiguió una remisión del 67% con un tratamiento de 70 semanas en las cuales se administró ONA (100 mg/día por vía oral). La droga tuvo efectos hepatotóxicos por lo que se ordenó suspender el tratamiento en forma anticipada. Sin embargo, es de destacar que las respuestas a ONA fueron comparables a las obtenidas por TX en estudios como terapia de primera línea. Actualmente *ARNO Therapeutics Inc.* se encuentra reclutando

pacientes para un estudio nuevo con ONA en los cuales se seleccionarán los pacientes por expresar altos niveles de RP activado (NCT02052128).

Teniendo como referencia al anterior estudio podemos mencionar que en pacientes RH+ una buena terapia endocrina como tratamiento de primera línea tiene como resultado una tasa de respuesta máxima del 66% de los pacientes tratados, mientras que los agentes endocrinos como terapia de segunda línea dan respuestas positivas máximas sólo en el 10% aproximadamente.

Es interesante destacar que MFP indujo incrementos en los niveles de E₂ en plasma de cinco veces, efecto que no se manifestó cuando se administró ONA, es por eso que para la clínica de usarse MFP se recomendaría su uso en combinación con TX (Robertson & Willsher 1999).

Recientemente en otro ensayo clínico se utilizó Lonaprisan (LON; Bayer) otro antiprogéstágeno de última generación. Se utilizó como terapia de segunda línea en carcinomas mamarios estadio IV, RP+ y HER2-, que previamente ya habían recibido hormonoterapia o quimioterapia. Este ensayo dio una respuesta limitada, incluso se suspendió el protocolo antes de terminar de enrolar a todas las pacientes programadas dado que los resultados fueron desalentadores (Jonat et al. 2013). Creemos que estos resultados podrían sugerir que de utilizarse los antiprogéstágenos para tratamiento de cáncer de mama debería ser un tratamiento de primera línea, que es la etapa en la cual las hormonoterapias han mostrado ser más efectivas.

En resumen, entre los ensayos clínicos llevados a cabo con fármacos que hacen blanco en el RP se obtuvieron resultados discordantes, lo cual puede deberse principalmente a la falta de unificación en los criterios de enrolamiento de los pacientes, y a que muchos de ellos ya habían recibido previamente quimioterapia u hormonoterapia de algún tipo. Sin embargo, nosotros postulamos que los antiprogéstágenos representan una herramienta promisoriosa que debe ser aprovechada, y que su eficacia en los tratamientos va a estar directamente asociada a un adecuado criterio de selección de pacientes.

Para finalizar, sin utilizar las propiedades de la MFP como antiprogéstágeno, también se la utilizó como tratamiento paliativo en dosis de 200 mg por día en varios tipos de cáncer humano en los cuales previamente no hubo respuesta con otras drogas obteniéndose resultados positivos (Check et al. 2010).

Quimioterapia

La quimioterapia se basa en la administración de un grupo de agentes químicos que destruye a las células durante la división celular. Una característica muy importante si consideramos que las células neoplásicas son células que tienen una tasa de división muy elevada. Sin embargo, no son las únicas células con estas altas tasas de división y por esta razón el uso de estas drogas también se asocia a síntomas adversos. La quimioterapia es utilizada para tratamiento de neoadyuvancia, adyuvancia y paliativa en los pacientes con cáncer de mama metastásico o cáncer recurrente.

Dentro de las drogas quimioterápicas más utilizadas en cáncer de mama se encuentran las antraciclinas y los taxanos. Aun para tumores que son HER2 positivos, el Trastuzumab es usualmente administrado con taxanos como el DOC. En la Tabla 1 se muestran las drogas mayormente utilizadas en el tratamiento del cáncer de mama.

Familia de compuestos	Ejemplos	Mecanismos de acción
Taxanos	Paclitaxel Docetaxel Nab-paclitaxel	Se unen a los microtúbulos polimerizados y más específicamente a la subunidad beta de los microtúbulos. Los estabiliza afectando la dinámica global de su funcionamiento.
Antraciclinas	Doxorubicina liposomada	Son agentes intercalantes que inhiben el funcionamiento de la topoisomerasa 2, una enzima encargada de liberar tensiones durante la replicación, transcripción y reparación del ADN.
Agentes del platino	Carboplatino Cisplatino	Generan adición de grupos alquilo principalmente metilos. Esto provoca a nivel del ADN uniones entre bases nitrogenadas provocando errores durante la reparación y la replicación.
Alcaloides de la Vinca (vinca rosácea)	Vinorelbina Vincristina Vinblastina	Tienen la capacidad de unirse a los microtúbulos que están constituyendo el huso mitótico cristalizándolo y provocando un arresto en G2/M. Adicionalmente interfieren

		con muchos otros procesos metabólicos.
Análogos de los nucleósidos	Gemcitabina Capecitabina	Son compuestos cuyos derivados interfieren con la producción de timidina y la síntesis de RNAm.
Antraquinonas	Mitoxantrona	Son agentes intercalantes del ADN capaces de provocar entrecruzamientos y roturas de cadena. Interfieren en la síntesis de RNA e inhiben a la topoisomerasa 2.
Macrólidos	Exabepilona	Se unen a los heterodímeros de alfa y beta tubulina de la misma forma que los taxanos.
Hexosas	Eribulin	Son moléculas capaces de afectar la fase de crecimiento de los microtúbulos, sin afectar la fase de decrecimiento.

Tabla 1.1. Drogas quimioterapéuticas más utilizadas en el tratamiento de cáncer de mama. Información extraída de la Asociación Americana de Cáncer (<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-chemotherapy>). El mecanismo de acción de cada una de ellas fue extraída a partir de una base de datos online drugbank (<http://www.drugbank.ca/>).

En la actualidad se disponen de nuevas y mejores formulaciones que efectivamente mejoraron la capacidad de acumulación de los agentes quimioterápicos en el tejido tumoral reduciendo su concentración en los tejidos normales. Esto condujo a una reducción significativa en los efectos colaterales indeseados característicos de estas terapias.

En este trabajo se utilizó Doxorubicina libre (DOX) para los tratamientos en placa de las células tumorales y Doxorubicina Liposomada (PEG-DL) en los experimentos *in vivo* para el tratamiento de los tumores tanto murinos como los derivados de xenotransplantes, y paclitaxel (PAX) unido a albúmina (Nab-paclitaxel) para los experimentos *in vivo* exclusivamente. Se ha demostrado que estas drogas son las más efectivas en incrementar el periodo libre de enfermedad y la sobrevida total (Bria et al. 2006).

Antraciclinas (Doxorubicina)

La DOX y la Epirubicina pertenecen al grupo de drogas conocido como antraciclinas. El primer miembro de este grupo de antibióticos fue descubierto en 1950 y fue aislado de una cepa de bacterias perteneciente al género *Streptomyces* (*Streptomyces peuceticus*). Se intercalan en el ADN y ejercen su acción inhibiendo a la Topoisomerasa II, una enzima que juega un rol central en el mantenimiento de la estructura del ADN durante la replicación, la transcripción, la recombinación y la condensación/descondensación del ADN (Walker & Nitiss 2002).

En la actualidad se dispone de nuevas formulaciones de nanopartículas que se utilizan para incrementar la especificidad de las drogas dentro de los tumores disminuyendo los efectos colaterales sistémicos. Se han desarrollado liposomas recubiertos por moléculas de polietilenglicol que encierran en el interior a la DOX (Figura 1.3). Estos liposomas aprovechan las fenestraciones que se encuentran en gran cantidad en los vasos tumorales anormales para acumularse de forma específica en el intersticio del tumor. Además las moléculas de polietilenglicol disminuyen la capacidad del sistema monocítico mononuclear de detectar y eliminar a los liposomas. Esto permite que los liposomas incrementen su período de permanencia en la circulación reduciendo al mismo tiempo los problemas cardíacos causados por la DOX (Anders et al. 2013) (Figura 1.4). Actualmente es una de las más utilizadas, considerándose como parte de numerosos tratamientos combinados en varios esquemas de administración, lo cual se debe principalmente a que esta formulación disminuye notoriamente la toxicidad (Batist 2007).

Existen trabajos en bibliografía de marcadores asociados al uso de DOX. Como se mencionó anteriormente el blanco principal de las drogas pertenecientes a las antraciclinas es la Topoisomerasa II (TOP2A) y se sabe, a partir de un estudio llevado a cabo por Knoop y col., que existe un incremento en la sensibilidad a las antraciclinas en aquellos pacientes con TOP2A amplificado y que contrariamente, la delección de este gen genera resistencia (Knoop et al. 2005).

Es interesante por otra parte destacar que existe una correlación positiva entre la amplificación de TOP2A y la de HER2 (Järvinen et al. 2000). De forma similar en otros estudios retrospectivos, se observó que los pacientes con cáncer de mama con amplificación de TOP2A tratados con antraciclinas mostraron una sobrevida libre de enfermedad y una sobrevida total mayor que aquellos pacientes que no poseían la amplificación (Barrett-Lee 2005).

Actualmente las terapias que contienen antraciclinas y taxanos, que es el grupo que trataremos a continuación, son consideradas superiores y se encuentran incluidas en los protocolos de tratamiento más efectivos (Joensuu & Gligorov 2012).

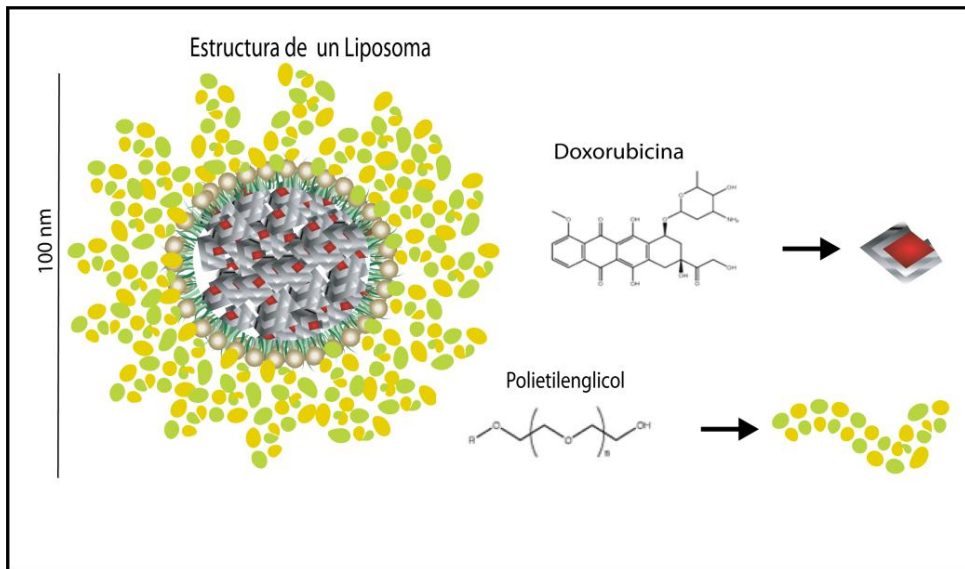


Fig. 1.3. Estructura de los liposomas PEG-LD. Las moléculas de DOX se encuentran en el interior de los liposomas. Los liposomas se encuentran cubiertos por largas moléculas de polietilenglicol que lo protegen del sistema fagocítico mononuclear.

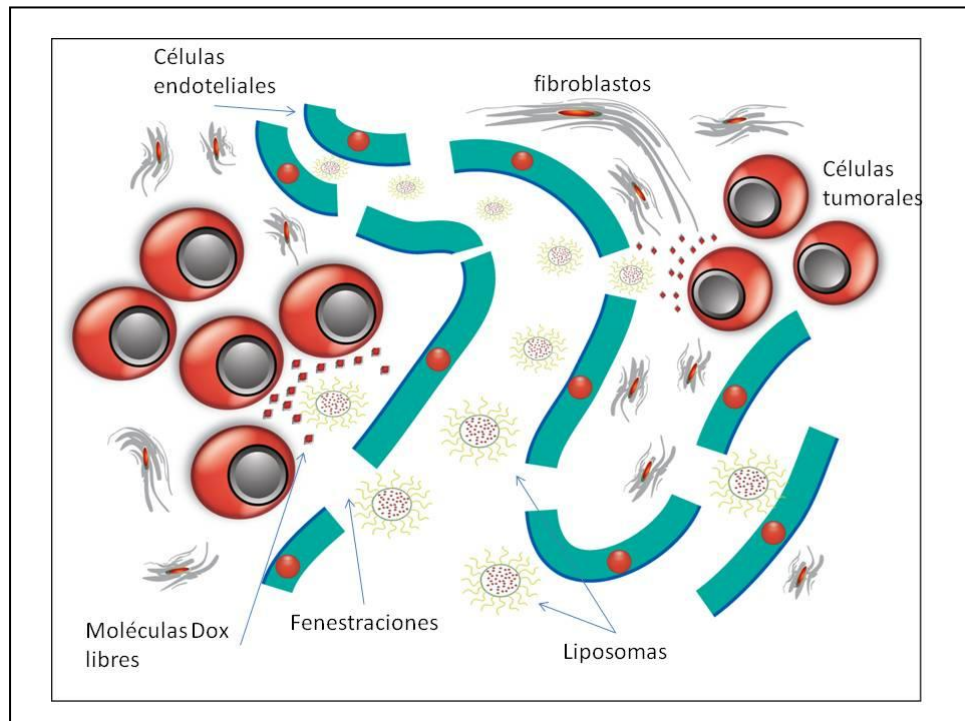


Fig.1.4. Esquema que ilustra la forma en que el liposoma se concentra en el tejido tumoral. Los liposomas de PEG-DL llegan a los nidos de células tumorales atravesando las fenestraciones del sistema vascular tumoral anormal. Adicionalmente, dado el mayor tiempo

en circulación en comparación con la DOX libre, muestra mayor acumulación en el tejido neoplásico.

Taxanos (Paclitaxel)

Los taxanos son terpenos extraídos de plantas del género *Taxus*, de ahí su nombre. Se introdujeron en la clínica por primera vez en la década de 1990. Dentro de este grupo se encuentra el PAX y el DOC, considerados como agentes quimioterapéuticos principales en el tratamiento del cáncer de mama. Los taxanos son capaces de unirse a los microtúbulos polimerizados, los estabilizan, y de esta manera interrumpen la dinámica global del citoesqueleto, impidiendo que las células sean capaces de llevar a cabo la mitosis (McGrogan et al. 2008).

Luego del tratamiento con PAX las células se arrestan en G2/M, y luego ocurre la muerte celular mediada por la vía mitocondrial (Fabbri et al. 2006; Ferlini et al. 2009). El PAX también causa disrupción en el sistema de microtúbulos que se encuentra funcionando durante la interfase afectando la proliferación y el metabolismo. Esto se debe a que la integridad de la dinámica de los microtúbulos no es sólo esencial para la separación y segregación de los cromosomas durante la división celular, sino también para el desarrollo y el mantenimiento de la forma celular, el transporte de vesículas, el transporte mitocondrial e incluso la transducción de señales (McGrogan et al. 2008). Sin embargo, el mayor inconveniente de estas drogas es la falta de solubilidad en medios acuosos. Por esta razón se requiere que ambas sean reconstituidas en un excipiente denominado cremophor que por sí mismo ya aporta un grado considerable de toxicidad (Hortobagyi 2000). La toxicidad resultante de la formulación Taxol (PAX en cremophor) termina limitando la cantidad de quimioterápico que es posible administrar a un paciente, ya que en estas condiciones tiene la potencialidad de provocar reacciones de hipersensibilidad pudiendo provocar la muerte (Moulder & Hortobagyi 2008).

Con el fin de mejorar las formas de administrar esta droga se generaron diversas formulaciones. En el caso específico del PAX se desarrolló una formulación en nanopartícula denominada Nab-paclitaxel (Fig. 1.5.). Esta formulación consiste en moléculas de PAX unidas a albúmina humana. De esta forma se evita el uso de excipientes tóxicos y además se aprovechan los mecanismos propios de los tumores

para acumular activamente las moléculas de albúmina, incrementando así los niveles de PAX en el tejido tumoral (Fig. 1.6.) (Guarneri et al. 2012). Adicionalmente también se elimina la necesidad de la administración de una medicación previa para reducir la incidencia de reacciones de hipersensibilidad (Moulder & Hortobagyi 2008).

Para dar un ejemplo de la ventaja de Nab-paclitaxel sobre el Taxol desde el punto de vista clínico, podemos mencionar un ensayo clínico utilizando pacientes con cáncer de mama avanzado en el cual se compararon ambas formulaciones. Con Nab-paclitaxel se consiguieron dosis máximas de 300 mg/m² administradas una vez por semana, mientras que con Taxol las dosis máximas alcanzadas fueron de 175 mg/m². Asimismo con Nab-paclitaxel en aquellos casos en los cuales los pacientes ya habían recibido previamente una terapia basada en taxanos la tasa de respuesta fue de un 13%, y en aquellos en los cuales no existió terapia previa con taxanos la tasa de respuesta fue de un 62% (Easton et al. 2007).

En cuanto a los mecanismos de resistencia a los taxanos descritos previamente podemos mencionar a uno de los más frecuentes y mejor conocidos, el que involucra a la proteína P que depende de la expresión del gen de resistencia a multidrogas 1 o MDR-1. La proteína P es una bomba que a través de transporte activo expulsa a las drogas quimioterapéuticas sin relación química desde el interior hacia el exterior de las células. Un mecanismo de resistencia que también se puede presentar para las antraciclinas (Cordon-Cardo et al. 1990; Dean et al. 2001).

Por otro lado, existen mutaciones en el dominio intermedio de la tubulina β que provocan modificaciones en el sitio de unión de la tubulina al PAX (Murray et al. 2012a). De forma alternativa la resistencia puede darse por un cambio en el patrón de expresión de las isoformas de tubulina por otras de menor afinidad, un incremento en la expresión de tubulina per se, una alteración de las proteínas que se asocian a los microtúbulos o incluso una sobre-expresión de las proteínas BCL-2 o BCL-XL, ya que como se mencionó anteriormente, la muerte celular programada provocada por taxanos involucra a la vía intrínseca de la apoptosis (Murray et al. 2012b; McGrogan et al. 2008; Flores et al. 2012).

Curiosamente, en el modelo de cáncer de mama T47D se ha asociado la resistencia a taxanos con altos niveles de expresión de RPA, la cual otorgaría a las células tumorales la capacidad de sobrepasar el punto de control del ensamble del huso mitótico en presencia de estabilizadores como el PAX y sobrevivir (Badtke et al.

2012). Además, uno de los genes que se encuentra regulado por el RPA, y no así por RPB, es *BCL-XL* (J. Richer et al. 2002), y como se mencionó anteriormente se encuentra asociado al control de la vía intrínseca de la apoptosis. La sobreexpresión de *BCL-XL* se encuentra también asociado a la resistencia a taxanos (Flores et al. 2012).

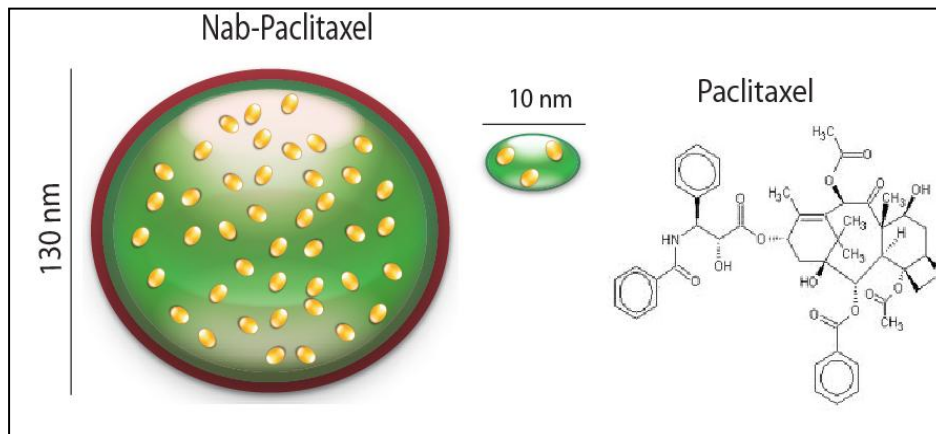


Fig. 1.5. Estructura de Nab-paclitaxel. Esquema representando a las partículas de Nab-paclitaxel. Las partículas contienen PAX y albúmina humana; tienen un tamaño promedio de 130 nm.

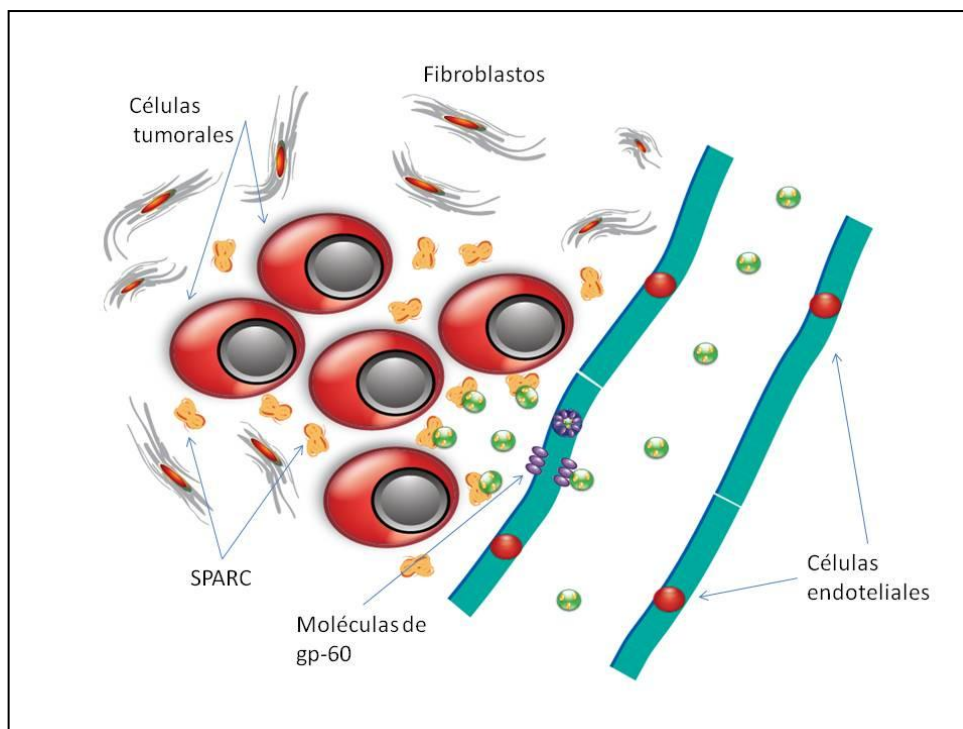


Fig. 1.6. Esquema ilustrando a Nab-paclitaxel ingresando al tejido tumoral. La albúmina humana además de aportar un mayor grado de solubilidad a la formulación también incrementa la acumulación de la droga en el tejido tumoral a través del transporte activo

llevado a cabo por la HP60 de las células endoteliales y la unión a la proteína SPARC secretada por las células neoplásicas.

Terapias combinadas

Los regímenes de terapias combinadas se administran a pacientes que requieren una reducción significativa en su masa tumoral o en casos de una enfermedad rápidamente progresiva, con el objetivo de mitigar los síntomas paliativos o incluso para reducir las dosis máximas de cada una de las drogas individualmente, sin tener que llevar al límite la tolerancia del paciente. Este tipo de terapias maximizan el beneficio reduciendo el tamaño tumoral y la recurrencia, y al mismo tiempo incrementando la supervivencia libre de enfermedad y la sobrevida total (Breast et al. 2005).

Un escenario en el cual es conveniente realizar combinaciones de terapias es cuando un agente antitumoral puede modelar el microambiente tumoral y mejorar las condiciones para la acción de un segundo agente antitumoral. Esto es aplicable para drogas que son capaces de remodelar la vasculatura tumoral, cambiando al mismo tiempo las concentraciones de oxígeno y PH que podrían potenciar el efecto de la radioterapia o la quimioterapia tradicionales (Horsman & Siemann 2006; Ostergaard et al. 2013).

En este caso en particular vamos a referirnos a un tipo de terapia combinada entre hormonoterapia y quimioterapia. En bibliografía existen estudios tanto a favor como en contra de la hormono quimioterapia. Como ejemplo podemos citar un estudio llevado a cabo por Tominaga y col., en el que se usó acetato de medroxiprogesterona (MPA; agonista del RP) en forma conjunta con el esquema de CAF (ciclofosfamida, DOX y fluoracilo) en donde el resultado fue mejor cuando se utilizaron ambos tipos de drogas en forma conjunta (Barrios et al., 2012; Tominaga et al., 1994). También se comparó la efectividad de tratamientos que involucraron regímenes de CMF con o sin TX en pacientes post-menopáusicas con nodos positivos. Se llegó a la conclusión que es positivo agregar TX a la terapia de CMF (Breast et al. 1997).

Adicionalmente en trabajos del grupo de Ikeda y col. se mencionó que los taxanos como el PAX y el DOC muestran una muy buena actividad en hormono

quimioterapias que hacen blanco en el RE. Demostraron que estos taxanos tienen una alta eficacia en combinación con TX y FUL, a diferencia de DOX que llegó a mostrar un comportamiento antagonista con TX (Ikeda et al. 2011). Esto es debido a que en este caso particular el agente hormonal es capaz de reducir la expresión de la proteína tau, cuya sobreexpresión está asociada a la resistencia a taxanos (Ikeda et al. 2010). Por esta razón se podría pensar que en aquellos casos en los que los quimioterápicos muestren una baja efectividad en tumores RH+, resultaría útil la administración de terapias hormonales mejorando la efectividad del tratamiento antitumoral (Ikeda et al. 2011). También se ha postulado que la presencia de RHs sugiere un potencial beneficio de una terapia hormonal y menor o nulo efecto derivado del uso de una terapia basada en quimioterápicos (Alba et al. 2012), por lo tanto todavía es controvertido el uso de terapias combinadas endócrinas y químicas para el tratamiento de cáncer de mama RH+.

Modelos en cáncer de mama

Líneas celulares

Existen diferentes modelos de estudio en cáncer de mama y dentro de los más simples tenemos el cultivo celular bidimensional. Los cultivos celulares realizados a partir de muestras derivadas de tumores se denominan cultivos primarios y por otro lado se pueden realizar cultivos de líneas celulares ya establecidas, de las cuales existen varias disponibles comercialmente. Entre las más utilizadas tenemos a las líneas MCF-7, T47D y MDA-MB-231 (Burdall & Hanby 2003).

Los clásicos modelos de líneas celulares han aportado datos invaluable acerca de los mecanismos moleculares de las vías de señalización claves de los conductores oncogénicos que gobiernan la tumorigénesis, la progresión maligna y la resistencia a quimioterápicos. Sin embargo, el potencial de poder transferir los descubrimientos a nivel de estos modelos a lo que ocurre en los tumores humanos es cuestionable.

También se deben mencionar los cultivos celulares en 3 dimensiones (3D), los cuales han demostrado ser de una gran utilidad ya que permiten el análisis de otras características del comportamiento tumoral. Características que no se pueden poner

de manifiesto en un cultivo 2D, como por ejemplo el potencial de invasión en una matriz.

Por último hay que mencionar que los cultivos no necesariamente deben estar conformados por un solo tipo celular y que se pueden realizar co-cultivos celulares tanto en 2D como en 3D para desentrañar interacciones heterotípicas, pudiendo incluir células de naturaleza estromal.

Los estudios de asociación entre las características de tumores primarios y la respuesta a determinadas drogas aportan importante información pero los tumores primarios no son tan versátiles como las células en cultivo para ser manipulados (Villeneuve et al. 2006). Las líneas celulares exhiben una heterogeneidad genómica, transcripcional y biológica comparable en ciertos aspectos a la de los tumores primarios y con la versatilidad requerida (Kao et al. 2009), sin embargo poseen un número mayor de amplificaciones que los tumores parentales. Esto podría deberse a que las células con mayor número de amplificaciones tienen una ventaja selectiva de crecimiento *in vitro*. La falta de tejido estromal es otra de las características que impiden a las líneas celulares modelar interacciones celulares existentes en los tumores primarios (Burdall & Hanby 2003).

En las líneas celulares de cáncer de mama es posible distinguir genotipos luminales o basales. Las líneas celulares RE+ mantienen un espectro de expresión de genes relacionados al mecanismo de acción del RE que incluyen por ejemplo mediadores transcripcionales claves como FOXA1 y GATA3 (Burdall & Hanby 2003). Las líneas celulares que recibieron la denominación *basal like* son RE negativas y exhiben con una mayor frecuencia mutaciones de *TP53* y de *PTEN*, consistente con los descubrimientos que se llevaron a cabo en los *arrays* génicos de tumores primarios (Perou & Børresen-Dale 2011; Kao et al. 2009).

Se puede concluir que las líneas celulares de cáncer de mama son más complejas desde el punto de vista genético que los tumores primarios pero aún retienen los patrones de expresión que permiten la distinción troncal entre basal-luminal a nivel molecular.

Cultivos primarios y organotípicos

Es posible establecer cultivos primarios a partir de tumores de mama tanto murinos como humanos. Sin embargo tanto los cultivos primarios murinos como los humanos son complicados de establecer. Según la experiencia del laboratorio, en líneas tumorales murinas el procedimiento depende de la línea tumoral a partir de la cual se desea realizar el cultivo. Sin embargo luego de haber estandarizado el método la eficacia es relativamente elevada. Por otro lado el establecimiento de cultivos primarios a partir de biopsias humanas se mantiene siempre dificultoso, la eficacia es de un 10% solamente (porcentaje calculado a partir de 100 muestras procesadas).

Los cultivos organotípicos se originan a partir de explantos de tejidos y son utilizados en estudios en los cuales se requiere mantener la histología. Este tipo de modelos son capaces de arrojar información de las células localizadas dentro de su ambiente natural. La desventaja principal en este tipo de modelos es que las condiciones de cultivo deben ser cuidadosamente controladas para obtener resultados reproducibles (Pampaloni et al. 2007; Timmins et al. 2005).

Los explantos de tejidos en cultivo fueron utilizados por primera vez en las áreas de neurofisiología. Los tejidos se mantienen *in vitro* en el entramado de un gel o sobre una membrana semipermeable en la presencia de medio de cultivo isotónico. Las principales ventajas a destacar de esta forma de cultivo es que mantienen la arquitectura tisular y la presencia de distintos tipos celulares dentro del tejido (Pampaloni et al. 2007).

Modelos experimentales de cáncer de mama murinos

Dentro de los modelos para llevar a cabo estudios de la biología en cáncer de mama los modelos murinos constituyeron una pieza muy importante (Hollern & Andrechek 2014). Este tipo de modelos poseen orígenes entre los que se pueden mencionar los inducidos por el virus de tumor mamario murino (MMTV) (Gattelli et al. 2006), con mutagénesis química (Yin et al. 2005), o ratones genéticamente modificados lo cual ha permitido la identificación de un gran número de oncogenes. Asimismo, dentro del grupo de modelos de ratones modificados genéticamente a través de ciertos refinamientos en los sistemas se ha podido activar o inactivar

genes en tejidos y momentos específicos. Como ejemplos importantes de modelos tumorales en cáncer de mama podemos citar el modelo de HER-2 (NeuNT) que permitió reforzar la idea de este gen como oncogen conductor (Muller et al. 1988), el modelo de P53 mutado en epitelios mamarios (Zhang et al. 2008), o más recientemente un modelo de KO de STAT-1 en el cual los tumores inducidos expresan RE y RP (Chan et al. 2012).

En este trabajo en particular se utilizó un modelo murino que en el pasado ya contribuyó con importantes descubrimientos sobre la fisiología del cáncer de mama, como así también a colocar el RP junto con los antiprogéstágenos en un rol central como posible terapia (Lanari et al. 2012; Polo et al. 2010; Soldati et al. 2010; Cerliani et al. 2011).

Modelo de carcinomas mamarios murinos inducidos por MPA

Este modelo murino fue inducido por la administración continua de MPA en ratones BALB/c. Los tumores se han mantenido por trasplantes singeneicos. Presentan la mayor parte una histología ductal, son metastásicos y son RE+ y RP+, característica compartida con el 80% de carcinomas de mama humanos.

En un principio, en los primeros pasajes el crecimiento tumoral era totalmente dependiente de la administración de MPA ya que no crecían en ratones que no estuvieran recibiendo este progéstágeno (variantes hormono dependientes; HD). Sin embargo, con el tiempo aparecieron variantes tumorales que prescindían del agregado exógeno de hormona (variantes hormono-independientes; HI) (Lanari et al. 2009). La mayor parte de las variantes, tanto HI como HD, se mostraron sensibles a la administración de terapia hormonal con antiprogéstágenos como MFP, ONA, LON o Proellex o de E₂ (Wargon et al. 2009; Montecchia et al. 1999; Helguero et al. 2003; Wargon et al. 2014.), regresionando con este tipo de tratamiento hormonal tanto los tumores como sus metástasis (Vanzulli et al. 2005). Sin embargo, algunas de las variantes HI crecían en presencia de antiprogéstágenos y éstas se denominaron antiprogéstágeno resistentes, con resistencia constitutiva o *de novo*. Por otra parte por presión selectiva luego de inhibir las variantes sensibles al tratamiento se generaron variantes con resistencia al tratamiento y en este caso se las denominó

variantes con resistencia adquirida (Wargon et al. 2011). Este modelo tumoral resulta muy valioso debido a que a través de las variantes tumorales se recapitulan los pasos que siguen los tumores de mama a través de la progresión tumoral (Lanari et al. 2009).

Es interesante destacar que las variantes HI, si bien prescindan del MPA para su crecimiento, requieren de un RP funcional y esto puede ser debido a que este receptor en estas líneas tumorales constituye una pieza central en la cual convergen diversas vías de señalización relacionadas con el crecimiento tumoral (Montecchia et al. 1999).

Curiosamente, las variantes que son sensibles a la administración de antiprogestágenos o de E₂ expresan una mayor proporción de RPA que RPB, mientras que las variantes resistentes a este tipo de terapia tienen una mayor proporción de RPB que RPA (Helguero et al. 2003)(Figura 1.7.). Se demostró que sólo en las variantes con resistencia constitutiva la isoforma RPA se encuentra silenciada por metilación del promotor (Wargon et al. 2011).

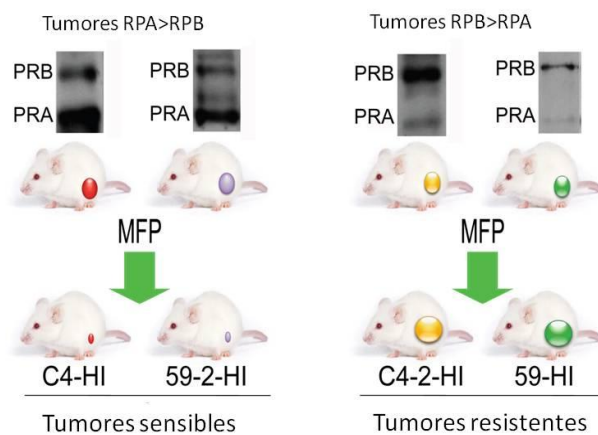


Fig. 1.7 Carcinomas mamarios murinos sensibles y resistentes a antiprogestágenos utilizados en este trabajo de tesis. Los tumores sensibles que expresan mayores niveles de RPA que RPB por *Western blot* regresan al tratarlos con MFP, mientras que los tumores resistentes, con proporción opuesta de isoformas de RP al tratarlos con MFP crecen igual o más que los tumores control.

Xenoinjertos de líneas celulares humanas en ratones

Con el uso de ratones inmunosuprimidos con una capacidad reducida de rechazar injertos es posible establecer tumores de origen humano para su evaluación en condiciones *in vivo*. Estos tumores pueden establecerse a partir de la inoculación de líneas celulares humanas, de un disgregado celular de una biopsia hospitalaria o incluso de la inoculación directa de fragmentos de biopsias.

Si bien el uso de líneas celulares tiene las limitaciones descritas anteriormente permite el estudio de la biología de células tumorales humanas en un contexto fisiológico más real que en condiciones *in vitro*, ya que se pueden evaluar las interacciones entre el componente epitelial y el estroma aunque hay que tener en cuenta que el primero es humano y el segundo murino (Barcellos-Hoff & Medina 2005).

Dentro de los ratones inmunocomprometidos que se pueden usar para el establecimiento de xenoinjertos tenemos varias opciones. Los ratones nude (*nu/nu*) que presentan problemas en el factor de transcripción Foxn1. El fenotipo de estos ratones se caracteriza por la alopecia y por ser atímicos con carencia de linfocitos T. Los ratones rag-1 que no poseen linfocitos B ni T, ya que existe una interrupción en uno de los pasos del proceso de maduración de estas células. Los ratones SCID-NOD (SCID: several combined immunodeficient disease) cuyo fenotipo no presenta linfocitos B ni T. Posteriormente a estos ratones SCID-NOD se les agregó, una mutación ligada al cromosoma X que provoca la ausencia total del receptor de interleuquina 2. Interleuquina 2 (IL2) es una citoquina esencial en la maduración de las NKs (natural killers) y en otros procesos del sistema inmune innato. Esta última versión de ratones SCID-NOD sin receptor de IL2 es denominada SCID-NOD gamma, es la utilizada en el trabajo para el establecimiento de xenoinjertos y en el presente es uno de los mejores para este propósito.

Objetivos e hipótesis

Construcción de la hipótesis

Teniendo en cuenta que los antiprogéstágenos representan un potencial agente terapéutico en los tumores RP+ (Horwitz 1992; Liang et al. 2007; Lanari et al. 2012), principalmente en aquellos con una mayor proporción de RPA con respecto a RPB (Helguero et al., 2003; Wargon et al., 2009) y que se han desarrollado formulaciones mejoradas de PAX (Nab-paclitaxel) (Ibrahim et al. 2002) y de DOX (PEG-DL) (Anders et al. 2013), hipotetizamos que la combinación de un antiprogéstágeno con estas nanoquimioterapias podrían aumentar el beneficio terapéutico en un grupo seleccionado de carcinomas mamarios que expresen mayores niveles de RPA que RPB.

Objetivo general:

Evaluar la eficacia de la terapia hormonal utilizando el antiprogéstágeno MFP en forma conjunta con nanoquimioterápicos en modelos experimentales que presentan distintas relaciones de RPA/RPB.

Objetivos particulares:

- a) Evaluar en carcinomas mamarios murinos con distinta proporción de RPA/RPB la respuesta de las terapias simples o combinadas de MFP con PEG-LD o Nab-paclitaxel evaluando el crecimiento tumoral y la toxicidad.
- b) Investigar el mecanismo por el cual se observa una ventaja de los tratamientos combinados sobre los tratamientos en monodroga.
- c) Validar los resultados obtenidos utilizando el modelo de células humanas T47D modificadas para expresar alternativamente las isoformas del RP, RPA o RPB.

- d) Evaluar en cultivos tisulares de muestras humanas los efectos de terapias combinadas.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones hembras de dos meses de edad.

- BALB/c criados en el IByME.
- BALB/c-GFP, adquiridos en Laboratorios Jackson (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) y criados actualmente por nuestro laboratorio en IByME. Expresan la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor de la ubiquitina C.
- *Nu/nu* (Swiss) adquiridos en el Bioterio de la Universidad de la Plata.
- *NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice* (NSG) adquiridos en Laboratorios Jackson (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) y criados por nuestro laboratorio en el Bioterio IByME.

Los animales se mantienen con una dieta a base de alimento balanceado *ad libitum*, bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) a una temperatura entre 20 y 23°C, siguiendo las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (Gonder & Laber 2007).

Los ratones NSG se mantienen en condiciones de esterilidad. Los protocolos están aprobados por el CICUAL del IByME.

Tumores

En este trabajo de Tesis se utilizaron los tumores C4-HI, C4-2-HI, 59-HI y 59-2-HI, los cuales pertenecen al modelo de carcinomas mamarios murinos generados por la administración de MPA (Lanari et al. 2009). Expresan REs y RPs y se mantienen por trasplantes singeneicos. Los mismos se transplantan en forma ortotópica en la glándula mamaria 4 de hembras BALB/c, BALB/c-GFP, *nu/nu* o NSG en los distintos experimentos.

Los tumores C4-HI y 59-2-HI expresan mayores cantidades de RPA que de RPB (RPA/RPB>1) y su crecimiento se inhibe o los tumores regresionan

completamente con la administración de antiprogéstágenos como MFP. Los tumores C4-2-HI y 59-HI expresan una mayor cantidad de RPB que de RPA ($RPA/RPB < 1$) y poseen una resistencia constitutiva a antiprogéstágenos (Helguero et al. 2003).

Histológicamente los tumores **C4-HI** están constituidos por células de tamaño mediano con núcleos moderadamente atípicos dispuestas en nidos sólidos y en formaciones glandulares con características histológicas de carcinomas ductales infiltrantes semidiferenciados. Presentan secreción intraglandular y vacuolas intracitoplasmáticas.

El tumor **C4-2-HI** es poco diferenciado, con crecimiento quístico y un escaso estroma interpuesto lo cual hace que sea un tumor con poca cohesión. El tumor **59-HI** es un tumor resistente a los tratamientos con antiprogéstágenos y su histología se corresponde a la de un carcinoma ductal poco diferenciado, que crece en nidos densos de células cohesivas con intensa atipía citológica y nuclear. Presenta frecuentemente figuras mitóticas atípicas, ocasionales apoptosis espontáneas y focos necróticos en el centro de los nidos tumorales. Muestra un patrón de crecimiento en playas.

Los tumores **59-2-HI** están constituidos por células de tamaño mediano con núcleos moderadamente atípicos, dispuestas en nidos sólidos y en formaciones glandulares con características histológicas de carcinomas ductales infiltrantes semidiferenciados. Su tejido conectivo es de tipo laxo constituido por fibroblastos, fibrocitos y la presencia de algunas células inflamatorias como eosinófilos y linfocitos.

Líneas celulares utilizadas

La línea celular T47D, desarrollada por Keydar et al., (Keydar & Aviv, 1979), fue adquirida en ATCC, y validada en el 2011. Son células epiteliales aisladas a partir de un derrame pleural de un paciente con cáncer de mama. Presentan una alta expresión constitutiva de $RE\alpha$ y RP, expresan también RGs y RAs, y tienen mutado el gen TP53 (p53) (Keydar et al. 1979). Se mantienen en el laboratorio en medio DMEM/F12 (Sigma, St Louis, MI) con suero fetal bovino (SFB; Natocor, Córdoba) al 10 % v/v. Las mismas se readquirieron en ATCC en 2013; los últimos experimentos *in vitro* se realizaron con el nuevo *batch*.

Las células T47D-YA y T47D-YB fueron cedidas gentilmente por la Dra. K. Horwitz (University of Colorado, EEUU) (Jacobsen et al. 2002b) y se mantienen en cultivo en forma similar a las T47D, con la adición de neomicina que se utiliza para mantener la selección de las células con los plásmidos transfectados. Las mismas se originaron por selección de un clon sin RP denominado T47D-Y, al cual le agregaron en forma exógena una u otra isoforma de RP, y de la misma forma que las T47D WT, mantienen la expresión de AR y GR aunque menor expresión de RE α (Ghatge et al. 2005).

Xenoinjertos

Células T47D, -YA e -YB se tripsinizaron y luego de bloquear la actividad enzimática de la tripsina, se resuspendieron en medio de cultivo DMEM/F12 libre de suero. Posteriormente 5×10^6 células resuspendidas en 150 μ l de PBS se inocularon de forma ortotópica en ratones hembras NSG de dos meses de edad, a las cuales una semana previa se les había implantado en el dorso un *pellet* de E₂ de 0.5 mg (Sahores et al. 2013).

Luego de una semana de haber sido llevado a cabo el procedimiento se los controló en forma diaria para palpar el sitio de inoculación. Se midieron los tumores con calibre Vernier (ancho y largo) cada dos o tres días.

Los tratamientos se iniciaron luego de dos o tres semanas de haberse inoculado las células tumorales, cuando los tumores T47D-YA y T47D-YB alcanzaron un tamaño en promedio de 20 y 30 mm² respectivamente.

Tratamientos de quimioterápicos

En lo que respecta a los drogas, tanto la formulación de DOX como la de PEG-DL (Doxopeg), fueron gentilmente aportadas por Laboratorios Raffo (Buenos Aires), mientras que Caelyx (Johnson y Johnson) y Nab-paclitaxel (Abraxane; Abraxis Bioscience) son preparaciones comerciales. Se utilizaron como controles en los experimentos de PEG-DL el vehículo en el cual se resuspenden los liposomas o

liposomas vacíos provistos por Laboratorios Raffo o LKM (Buenos Aires) respectivamente. Como control de Abraxane se utilizó una solución de albúmina humana aportada por el Laboratorio Raffo. Tanto PEG-DL como DOX libre se administraron en forma endovenosa en dosis dentro de un rango de 0.45-18 mg/kg cada siete días. El Nab-paclitaxel se administró también por vía endovenosa en un rango de 15-60 mg/kg cada 4 días sólo 3 veces como máximo.

Tratamiento de antiprogestágenos

El compuesto MFP (RU-486; Sigma) se administró en *pellets* de 0.2 a 6 mg implantados subcutáneamente en el dorso (Sahores et al. 2013) o a través de la inyección subcutánea en dosis de 10 mg/kg/día (Vanzulli et al. 2002). Para las inyecciones subcutáneas de MFP se preparó una solución madre de concentración 16,2 mg/0,4 ml de etanol absoluto mantenida a -20°C, y diariamente se preparó la dilución de trabajo 1/50 en solución fisiológica, inyectándose 0,3 ml/ratón. Esto es debido a que MFP presenta poca solubilidad en soluciones acuosas.

Seguimiento de los animales

El tamaño tumoral se midió con calibre de Vernier (largo x ancho) de donde se obtienen las medidas para las curvas de crecimiento.

Al llegar los tumores del grupo control al tamaño máximo permitido en el IByME, se eutanasiaron los animales para realizar las autopsias correspondientes y las muestras de tumores y órganos (pulmón, ganglio axilar, hígado, bazo) se congelaron a -70°C o se fijaron en formalina 10 % durante 48 hs. Los tumores fijados en formalina 10 % se pasaron luego a etanol al 70% y fueron procesados para ser incluidos en tacos de parafina. Para los análisis histológicos se realizaron cortes de 5 μ M y tinciones de hematoxilina-eosina o Tricrómico de Masson. Esta última coloración nos permite observar más fácilmente los cambios ocurridos en el compartimiento estromal.

Western Blot

Para preparar extractos proteicos totales, los tumores se pesaron y luego se agregó 4 veces su peso de *buffer* Mper (Pierce; Thermo Scientific), junto con inhibidores de proteasas y fosfatasa al 0,1% (*ver Apéndice*). A continuación, los tumores se homogeneizaron con un homogenizador (Polytron; Teckmar), de manera de obtener un homogenato que se dejó reposar en hielo durante 40 minutos. Concluida la incubación, se realizó una centrifugación a 12.000 rpm (Centrifuga 5415 R, Eppendorf), a 4°C durante 15 minutos. Como resultado de la centrifugación se obtuvieron dos fracciones, un *pellet* y un sobrenadante. Este último constituyó el extracto proteico tumoral total. Los extractos fueron inmediatamente congelados a -70°C previa determinación de la concentración proteica por el Método de Lowry (*ver Apéndice*).

Los extractos proteicos se separaron en un gel de poliacrilamida discontinuo utilizando el sistema de *buffers* discontinuos de *Laemmli* (Laemmli et al., 1970). Previo a la separación, las proteínas se diluyeron en solución desnaturizante (*cracking buffer*, *ver Apéndice*) y se incubaron a 100°C durante 5 minutos. En cada gel se sembraron las muestras correspondientes (100 µg de proteína/calle) junto con un marcador de pesos moleculares conocidos. La separación se realizó durante 20 minutos a 20 mA/gel hasta que las muestras pasaran el gel concentrador, y por aproximadamente 120 minutos a 25 mA/gel, en el gel separador.

Concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 100 V. A continuación, las membranas se bloquearon en solución de bloqueo (*ver Apéndice*), toda la noche (ON). Al terminar el bloqueo, las membranas se lavaron con TBST (*ver Apéndice*) y luego se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes, a 4°C, ON, en agitación. Al día siguiente, el anticuerpo primario se lavó con TBST, y se agregó el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa. Las bandas inmunoreactivas se revelaron mediante el agregado de un sustrato que genera una señal quimioluminiscente al ser modificado por la enzima peroxidasa. Para visualizar la señal, las membranas se expusieron a una placa radiográfica. Finalmente, las placas se escanearon utilizando un escáner digital, y las bandas se cuantificaron utilizando el programa *ImageJ*.

Estudios de toxicidad y selección de dosis

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c para el estudio de toxicidad de PEG-LD y ratones *nu/nu* para el estudio de toxicidad de Nab-paclitaxel (n= 6-8/ grupo). Se trataron como se describió anteriormente en la descripción de las drogas y se pesaron semanalmente para los estudios de PEG-DL, o cada 4 días para los estudios de Nab-paclitaxel.

Los ratones tratados con PEG-DL se eutanasiaron luego de un mes y los tratados con Abraxane luego de 10 días del inicio del tratamiento. Para el recuento de leucocitos en ratones tratados con PEG-DL los ratones se sangraron 3 veces por semana durante 20 días (n=8). La cuantificación de leucocitos se llevó a cabo en el analizador (Analyzer AcT diff; Beckman coulter).

Cálculo de la equivalencia de dosis entre ratones y humanos

Los cálculos para convertir dosis equivalentes entre humano y ratón, y viceversa se extrajeron de un trabajo de Reagan-Shaw y col., en el cual se explica el método de normalización basado en el área de superficie corporal. Este método es el aconsejado por la FDA (Reagan-Shaw et al. 2008).

Los cálculos de conversión de dosis se basan en el Km de cada una de las especies, donde el Km es una relación entre el peso corporal promedio de los individuos de la especie y su superficie corporal promedio. Como ejemplo podemos mencionar la del humano de 37, para un peso corporal de 60 kg y una superficie corporal de 1,6 m² y para el ratón 3, con peso corporal de 0.02 kg y 0.007 m² de superficie corporal.

Basados en estos datos:

- ✓ Para la conversión de dosis en ratones en mg/kg a dosis en humanos en mg/kg se utiliza la siguiente fórmula:

- Formula de conversión: dosis en ratón (mg/kg) x Km del ratón (3) / Km humano (37)
- ✓ Para la conversión de dosis en mg/kg a dosis en mg/m² se requiere multiplicar la dosis en mg/kg por el Km respectivo de la especie.
- ✓ Por último para la conversión de dosis en mg/kg de ratón a mg/m² en humanos y viceversa es necesario utilizar simplemente el Km de ratón que es 3.

Ejemplos:

- ✓ 250 mg/m² en humanos es equivalente a una dosis de 83 mg/kg (250/3) en ratones.
- ✓ 9 mg/kg en ratones es equivalente a una dosis de 27 mg/m² (9x3) en humanos.

Estudios de fluorescencia

Cuantificación del estroma

Para preservar la fluorescencia de los ratones BALB/c-GFP fue necesario perfundir los ratones (Fabris et al. 2010). El procedimiento consiste en realizar una incisión en la vena cava superior y la administración intracardíaca de una solución salina (0.9% NaCl) seguida con una solución de paraformaldehído al 4 % en anestesia profunda antes de la extracción de los tumores. Luego los tumores se colocan en una solución de paraformaldehído fría al 4 % (ON) y se transfirieren a una solución de sacarosa al 20 % que les otorga una mayor dureza por 24 hs. adicionales.

Posteriormente se incluyeron en O.C.T. Compound (Tissue-Tek, Sakura), y luego se cortaron utilizando un crióstato, de manera de obtener secciones tumorales de 15 µm de espesor. Estas secciones se montaron en portaobjetos silanizados para aumentar la adhesión y se incubaron con yoduro de propidio (IP), para su contraste

(1/1000 de la solución madre, *ver Apéndice*) durante 10 minutos en cámara húmeda. Luego de varios lavados con el *buffer* salino finalmente se montaron los cortes con Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA) y se sellaron con esmalte.

La cuantificación del estroma se realizó aprovechando la fluorescencia en verde de los ratones GFP que se expresa constitutivamente en todas sus células. Las fotografías se tomaron utilizando el microscopio confocal Nikon Eclipse E800 conjuntamente con el software EZ-C1 2.10.

Para la cuantificación propiamente dicha, se utilizó el software Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Esto nos permitió cuantificar pixel a pixel la presencia y la intensidad de la fluorescencia en verde.

Lectina de tomate (LT)

La lectina ligada a fluoresceína extraída de *Lycopersicum esculentum* (tomate), se une a la cara interna de los vasos sanguíneos y se utiliza como método de cuantificación de vasos funcionales. La solución de LT se administró en forma endovenosa en una cantidad de 70 μ l a una concentración de 20 mg/ml (Vector Labs). Es necesario a los 7 minutos llevar a cabo una perfusión cardíaca de los ratones para fijar la unión de la LT a las células endoteliales. Los tumores se conservaron a una temperatura de -80°C y se montaron como se describió previamente para cortes en congelación. Algunos de los cortes obtenidos inmediatamente se incubaron con IP para su contraste durante 10 minutos en cámara húmeda, luego se lavaron y se montaron, mientras que otros se conservaron en -80°C para futuros estudios.

Inmunofluorescencia (IF)

Como se mencionó anteriormente, también se utilizaron algunos de los cortes de los tumores de los grupos control y tratados con MFP previamente inyectados con LT para realizar IF.

Los cortes se fijaron con formalina al 10 % durante 10 minutos, se transfirieron a etanol 70 % para permeabilizarlos. Luego de una serie de lavados con PBS, se

bloquearon durante 1 hora con SFB 10% en PBS (*ver Apéndice*), en cámara húmeda, a temperatura ambiente. Concluido el bloqueo, las secciones tumorales se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo, ON, a 4° C. A continuación los cortes se lavaron con PBS, e incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, con el anticuerpo secundario ligado a fluorocromos que emitan en el espectro del rojo, en este caso Dylight 633, (diluido en solución de bloqueo) para que no interfieran con la LT fluoresceinada utilizada, luego se lavaron y montaron.

Los preparados se conservaron a -20° C y se observaron con un microscopio de fluorescencia confocal. En todos los casos, al determinar la intensidad a la que se tomaron las imágenes, se restó el *background* ocasionado por el anticuerpo secundario. Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por PBS. Para cada anticuerpo se procesaron las muestras a comparar entre sí, en el mismo momento y en iguales condiciones de procedimiento.

Tabla 2.1. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

Antígeno que reconoce	Características	Dilución	Técnica
α-SMA	Policlonal conejo, Abcam, ab-5694	1/100	IF
CD31	Monoclonal ratón, BD Pharmigen, #550274	1/250	IF
albúmina humana	Policlonal conejo, ab2406; Abcam	1/100	IF
Von Willebrand	Policlonal conejo; Code-Nr. A 0082, Dako	1/100	IF
Ki-67	Policlonal conejo, Abcam	1/500	IHQ
Receptor de Progesterona	Monoclonal murino, Pg1294, Dako	1/200	WB
Receptor de Progesterona	Policlonal de conejo, C-190, Santa Cruz	1/500	WB
Citoqueratina	Monoclonal murino, Clones AE1/AE3, Dako	1/100	IHQ

Inyección de Glóbulos rojos GFP (GR-GFP)

Los glóbulos rojos de ratones GFP (GR-GFP) se obtuvieron a partir de punciones endovenosas. La sangre heparinizada extraída se centrifugó a 300 G por 10 minutos para extraer el plasma que queda ubicado en la parte superior.

Posteriormente se inició el protocolo propiamente dicho para la obtención de una solución enriquecida en hematíes. Se diluyó en MEM Eagle y se centrifugó a 500 G por 10 minutos. Se removió y descartó con cuidado con la ayuda de pipetas Pasteur el sobrenadante con un 10 % de la capa de células que contiene a los glóbulos blancos. Luego se resuspendió en PBS con un 1% de BSA se invirtió el tubo varias veces para resuspender las células evitando la hemólisis. Estos pasos se repitieron unas 5 veces.

Para finalizar se resuspendió en PBS en el volumen deseado para proceder luego con las inyecciones en los ratones.

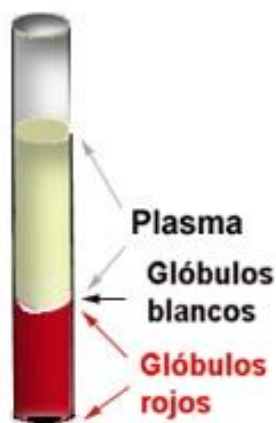


Fig. 2.1. Esquema de un tubo con sangre luego de sedimentación de sus componentes. Se observa cómo se ubican sus componentes principales en función a la densidad luego de la centrifugación a 300 G durante 10 minutos.

Se inyectaron 6×10^6 GR-GFP por vía endovenosa a los ratones portadores de tumores. A las 72 hs de haberse realizado el procedimiento se eutanasiaron los animales para extraer los tumores. Los mismos se disgregaron mecánicamente con portaobjetos esmerilados y bisturí. Luego el disgregado celular se fijó en paraformaldehído al 1 % en PBS.

Por último a través de FAC (Citometría de flujo) se determinó el sector de células vivas en función a los parámetros de morfología y tamaño celular. Posteriormente se abrió un nuevo *gate* para cuantificar la cantidad de eventos

positivos de fluorescencia en GFP con previos parámetros establecidos con el uso de un control positivo.

Determinación intratumoral de drogas

Para determinar las cantidades de DOX y Nab-paclitaxel intratumorales se utilizaron ratones BALB/c o *nu/nu* respectivamente. La necesidad de utilizar ratones inmunosuprimidos para el uso de Nab-paclitaxel se debe a que en esta formulación la droga se encuentra acoplada a albúmina humana. Si se administrara la droga a un ratón inmunocompetente se generaría una respuesta inmune.

Se utilizaron 4 animales por grupo. Los tumores fueron inoculados ortotópicamente con un trócar. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 70 mm² comenzó el tratamiento con MFP. Al quinto día se inyectó PEG-DL (18 mg/kg) o Nab-paclitaxel (30 mg/kg) a todos los ratones, tanto controles como tratados, y se eutanasiaron a las 24 hs.

Luego de extraídos, los tumores se fijaron con solución de formalina al 10 % por 48 hs y luego en una de solución de sacarosa al 20 % por otras 24 hs. Después del paso por estas soluciones los tumores se colocaron en tacos para congelación, se cortaron con el crióstato y se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia. Para la cuantificación de Nab-paclitaxel se realizó la IF utilizando el anticuerpo que reconoce albúmina humana.

Estudios de inmunohistoquímica (IHQ)

Los cortes tumorales se desparafinaron en xileno durante 30 minutos y se rehidrataron por pasajes sucesivos en soluciones de etanol/agua destilada, de concentración decreciente (etanol 100%, 96% y 70%). A continuación, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 10% en metanol /agua destilada al 70%, durante 20 minutos. Luego de una serie de lavados con PBS (*ver Apéndice*) se bloqueó con SFB al 10% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Los cortes histológicos se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en SFB al 10% en PBS, ON, a 4°C en cámara

húmeda. Luego, se realizaron una serie de lavados en PBS y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de varios lavados con PBS se procedió a revelar los anticuerpos. Las reacciones antígeno anticuerpo se detectaron utilizando el Complejo Avidina Biotina (ABC, kit Vectastain; Vector) y revelando con 3-3´diaminobencidina (DAB, Vector). Para contrastar la marca positiva, los núcleos se tiñeron con hematoxilina (Biopur Diagnostics, Santa Fe). Los cortes se deshidrataron pasándolos por alcoholes de graduación creciente, y se incubaron en xileno, para luego montarlos en medio sintético (DPX, Sigma Aldrich). Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario en algunos cortes, reemplazándolo por PBS.

Los cortes histológicos se observaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse E800. Las imágenes se tomaron con una máquina digital Nikon asociada a este microscopio utilizando el *software* ACT-2U. Para cada anticuerpo se procesaron las muestras a comparar entre sí, en el mismo momento y en iguales condiciones de procedimiento.

Se utilizó el anticuerpo anti-citoqueratina (clone AE1/AE3; Dako, Carpinteria, CA) que se utiliza como marcador de estirpe epitelial. Es una mezcla de dos clones con capacidad de identificar a dos epítopes presentes en la mayoría de las citoqueratinas epiteliales humanas.

Evaluación de proliferación celular /apoptosis *in vitro*.

Se utilizaron las líneas celulares T47D WT, T47D-YA y T47D-YB que ya fueron descritas anteriormente. Se mantuvieron en medio de cultivo DMEM F12 con 10% de SFB y cuando se alcanzaron las cantidades necesarias se colocaron en placas de 12 pocillos en una cantidad de 100.000 células por cada uno de ellos. Las curvas de proliferación se realizaron con concentraciones de DOX que oscilaron desde 10^{-10} M a 10^{-5} M

El tratamiento de cada una de estas 3 líneas celulares se llevó a cabo durante 48 hs, tiempo después del cual se levantaron las células con tratamiento enzimático (tripsina/EDTA). Se realizó un lavado con PBS y luego se fijaron con etanol al 70% por lo menos durante 24 hs. El paso de fijación es necesario realizarlo de este modo para permeabilizar a las células y de esta manera facilitar la salida del ADN

fragmentado que caracteriza a las células en apoptosis temprana. Esto permite su identificación ya que se distinguen por poseer cantidades Sub-G1 de ADN.

Luego se lavaron con PBS y el *pellet* se incubó con IP 1 h. a temperatura ambiente u ON a 4 °C. Antes del análisis por FAC se resuspendieron los *pellets* en 100 µl de PBS.

El número de células se determinó con la administración conjunta de una cantidad fija (10 µl) de una suspensión de *Beads* de 8 µM de diámetro para conteo (Spherotech, Lake Forest, IL). El análisis de los datos de FAC y el análisis de las fases del ciclo celular se realizó con el software FlowJo X.

Selección de pacientes

El Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal mantiene una colaboración con el Hospital de Agudos M V de Martínez de General Pacheco de la Provincia de Buenos Aires. Desde Noviembre de 2007 se han procesado más de 300 muestras de carcinomas mamarios provenientes de mujeres de edades comprendidas entre 24 y 96 años, en cualquier estadio de la enfermedad, incluyendo recidivas y pacientes con enfermedad metastásica. El estudio cuenta con la aprobación de los **Comités de Ética del Hospital y del IBYME**. Los especímenes se tomaron durante el tratamiento quirúrgico indicado para cada caso en particular, obteniendo material tanto para parafina como en fresco cuando fue posible. Se priorizó la determinación de isoformas por *western blot*, y en caso que hubiera más material para poner a punto, se realizaría el cultivo primario en una primer etapa y luego el cultivo de tejidos en la segunda etapa. Se guardó también a -70 °C material para estudios de DNA y RNAm .

Cultivo de Tejidos y procesamiento de muestras humanas

Debido a la baja efectividad obtenida con los cultivos celulares se implementó una nueva técnica de incubación de tejido tumoral utilizando un dispositivo que permite cortar el tejido en rodajas denominado *Chopper* (Vibratome VT1200 (Ted

Pella, Inc, USA). El equipo tiene un brazo metálico que sujeta una cuchilla de afeitar que cae sobre la pieza de tejido mecánicamente pudiéndose controlar la velocidad y el grosor de los cortes, además de que nos permite manipular el tejido lo menos posible para evitar cualquier tipo de contaminación. Este dispositivo se coloca en campana de seguridad biológica y se desinfecta antes de su uso con alcohol 70%. Las muestras en medio de cultivo, se colocan sobre papel *Whatman* estéril adherido a la platina del *Chopper* y se cortan en piezas de aproximadamente 100 μm de espesor. Estas piezas de tejido se colocan en una placa de Petri con medio DMEM/F12 donde se separan y luego se trasladan a una placa de 6 hoyos que contiene una cámara con filtro en cada hoyo (PICM3050; Millipore, Millerica, MA). Las cámaras con filtros permiten el contacto de las láminas de tejido con el medio de cultivo y a la vez mantienen la óptima oxigenación de las mismas, impidiendo al mismo tiempo la adherencia de las láminas al pocillo. Se colocan el mismo número de cortes en cada uno de los hoyos. En nuestro caso, el objetivo de estos experimentos estaba diseñado para evaluar el efecto de la MFP en los tumores con distinta expresión de isoformas de RP, por lo tanto, esa fue la prioridad en el diseño experimental. En los casos en los cuales el material fue suficiente para estos fines, se utilizó además para evaluar el efecto de la MFP (10^{-8} M) en combinación con la DOX (10^{-6} M). En todos los casos las incubaciones se realizaron en presencia de 10% de SFB durante 48 hs en estufa gaseada a 37° C. Finalmente las muestras se fijaron en formaldehído 10% para luego ser embebidas en parafina y cortadas en láminas de 3-4 μm de espesor para poder realizar la IHQ. Se evaluó la marca de Ki67 como marcador de proliferación celular contando células marcadas sobre células totales en todos los cortes (mínimo 4 fragmentos por vidrio). Los recuentos celulares se hicieron junto a la patóloga María May, quien participa en el estudio y los resultados correspondientes a la MFP formarán parte de su tesis doctoral.

Se realizaron extractos proteicos (fracción nuclear y citoplasmática) de los especímenes guardados a -70°C según la técnica descrita anteriormente y se realizaron *Western Blots* para evaluar la relación de isoformas de RP en cada muestra de pacientes. Como control positivo se utilizaron extractos de la línea celular T47D.

Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos se usó el software Graph Pad Prism (Versión 6.0).

En experimentos en los cuales los datos siguieron una distribución normal se utilizó ANOVA seguido de un post test de Bonferroni para evaluar las diferencias entre medias de múltiples muestras. Para comparar medias entre dos grupos se utilizó un test de *Student*.

Para el caso de muestras que no tuvieron una distribución normal se usaron test estadísticos no paramétricos como el test de Mann-Whitney y el Kruskal-Wallis para dos y múltiples muestras respectivamente. En todos los gráficos se muestran las medias y los Errores estándar. Todos los experimentos fueron repetidos al menos dos veces. Las curvas de crecimiento tumoral se estudiaron por regresión lineal, seguidas de un test de diferencia entre pendientes.

Resultados

PEG-LD y Nab-paclitaxel en terapias combinadas con MFP en un modelo murino

Evaluación de la toxicidad de PEG-LD vs. DOX en función a la pérdida porcentual de peso en ratones BALB/c

La evaluación de la toxicidad se realizó cuantificando la pérdida de peso de ratones BALB/c tratados como se explicó en *Materiales y Métodos*. Sólo se observaron diferencias significativas en los ratones a los cuales se les administró la dosis de 18 mg/kg de las tres formulaciones (Fig.3.1). Sin embargo, en los animales tratados con ambas formulaciones de PEG-LD (2 marcas diferentes), tanto en los animales tratados con la dosis de 9 mg/kg como en la de 18 mg/kg se observaron algunos casos de eritrodisestesia palmo plantar, con signos más conspicuos obviamente en los animales tratados con la dosis más elevada. La diferencia de peso entre los grupos tratados con la dosis mayor de DOX o PEG-LD, fue significativa entre el grupo Caelyx y DOX, no habiendo diferencias significativas entre las distintas marcas de PEG-LD.

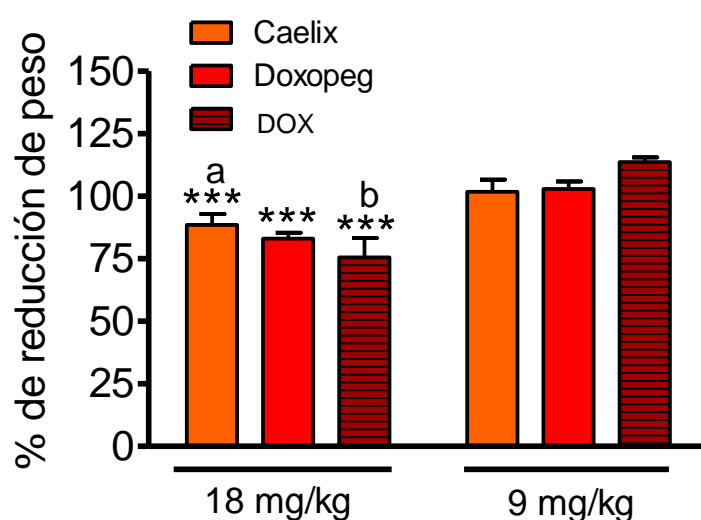


Fig. 3.1. Efecto de PEG-DL (marca Caelyx o Doxopeg) en el peso de los ratones sin tumor luego de un mes de tratamiento. Los animales se trataron semanalmente como se mencionó en *Materiales y Métodos*. El gráfico representa la reducción porcentual en el peso de los animales luego del tratamiento con respecto a su peso original. Se utilizaron 8 ratones por grupo; ***: $p < 0.001$; a vs. b: $p < 0.05$.

Comparación de la eficacia terapéutica de DOX y PEG-DL sobre el crecimiento de tumores del modelo de carcinomas mamarios inducidos por MPA

Se comparó la eficacia terapéutica de DOX en liposomas (PEG-LD) vs. libre en carcinomas mamarios del modelo murino inducido por la administración prolongada de MPA. Como se observa en la Fig. 3.2., PEG-DL a las dosis de 18 y 9 mg/kg induce una regresión tumoral completa en todos los tumores estudiados ($p < 0.001$).

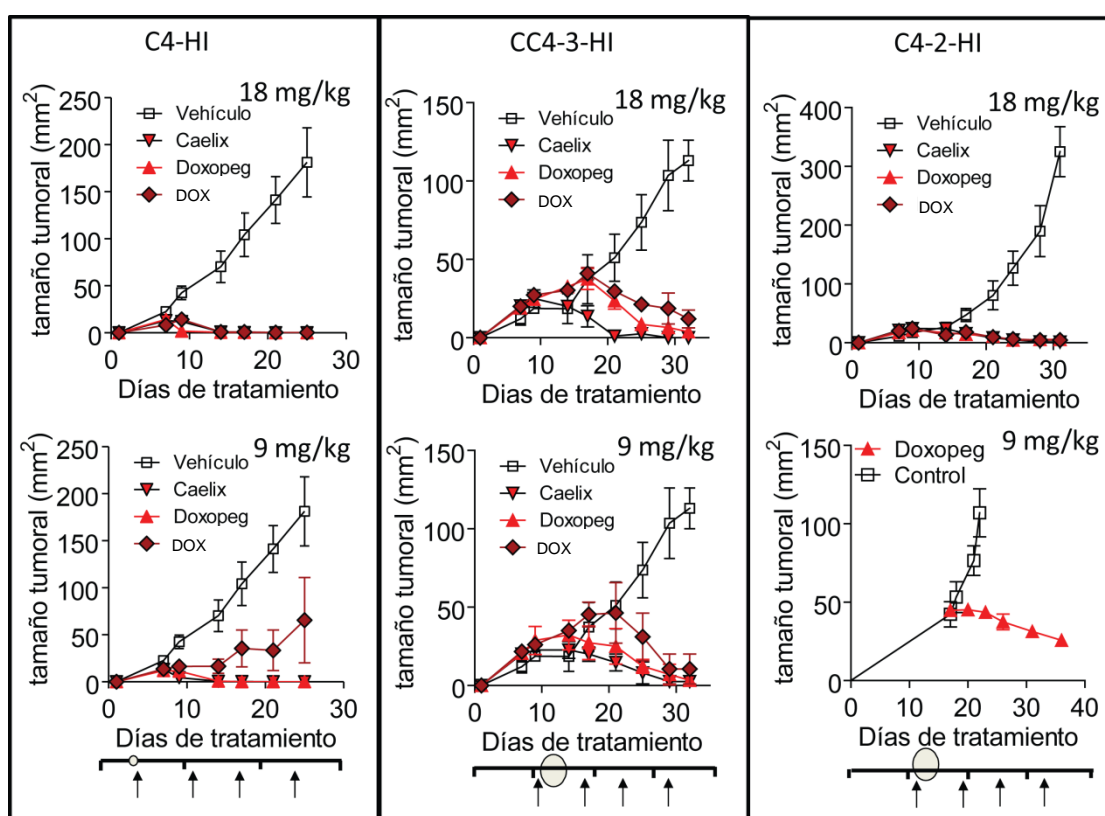


Fig. 3.2. Efecto de doxorubicina liposomada (Caelix and Doxopeg) y de doxorubicina libre en el crecimiento de tumores del modelo murino inducido por MPA. Se utilizaron dos tumores sensibles a antiprogéstágenos (C4-HI y CC4-3-HI) y un tumor resistente a antiprogéstágenos (C4-2-HI). Los tumores C4-HI y CC4-3-HI se transplantaron como se describe en *Materiales y Métodos* y los tratamientos de 9 mg/kg y 18 mg/kg se iniciaron luego de 4 o 11 días luego del trasplante de los tumores, los animales control recibieron vehículo. En las curvas de crecimiento se grafica el tamaño tumoral promedio y el desvío estándar en función al tiempo. Las flechas indican los momentos en los cuales se administraron las inyecciones y los círculos representan los tumores.

En el caso de DOX, si bien con la dosis mayor de 18 mg/kg se obtuvo el mismo efecto (regresión completa) que con las formas liposomadas, se puede observar sobre todo en el tumor C4-HI, que con la dosis de 9 mg/kg, la DOX sólo

disminuyó el crecimiento tumoral, mientras que las formas liposomadas indujeron la regresión completa, observándose una ventaja de PEG-LD comparado con DOX sobre el crecimiento tumoral ($p < 0.05$).

En el caso del tumor C4-2-HI (tumor no respondedor a antiprogéstágenos) las dosis de 9 mg/kg se iniciaron cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 50 mm², mientras que el tratamiento con las dosis de 18 mg/kg se inició luego de once días de haber sido inoculados, cuando los tumores llegaron a los 25 mm² como indica el esquema. Se observó una disminución significativa del tamaño tumoral en todos los casos ($p < 0.001$). Los tumores tratados con vehículo no mostraron diferencias histológicas con respecto a los tumores control. El tumor C4-HI es un carcinoma ductal infiltrante semidiferenciado que se caracteriza por presentar en su mayoría formaciones glandulares de variado tamaño que en ocasiones presentan secreciones proteináceas y otras zonas de nidos sólidos. A nivel citológico las células son homogéneas con moderada atipía, presencia de vacuolas intracitoplasmáticas y regular cantidad de mitosis (Fig.3.3.izq.). Al tratarlos con PEG-LD (18 mg/kg), luego de un mes de tratamiento no se palpa el tumor. A nivel histológico se observaron unas escasas células tumorales remanentes inmersas en una densa matriz fibrótica (Fig. 3.3.,derecha), signos de una respuesta casi completa al tratamiento.

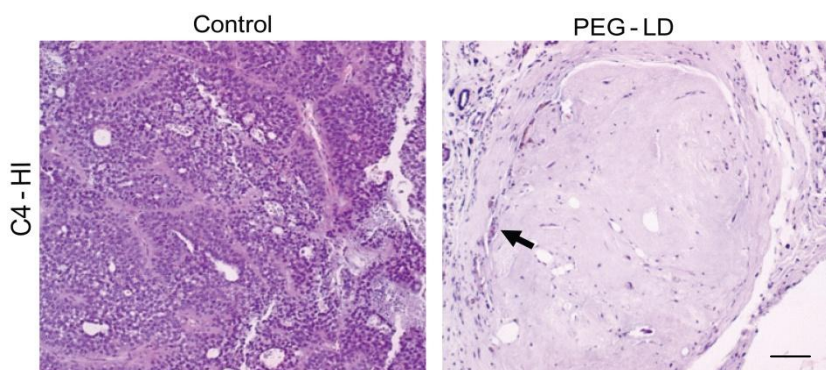


Fig. 3.3. Imágenes histológicas de un tumor C4-HI tratado con PEG-DL (18 mg/kg) durante un mes. Luego del tratamiento, sólo quedaron unas pocas células remanentes (flecha) inmersas en estroma hialino, barra: 100 μ m.

Estos experimentos nos permitieron concluir que los tumores del modelo experimental utilizado son sensibles a las antraciclinas. Por otro lado, sugirieron que las dosis de PEG-DL deberían ser reducidas aun más para llevar a cabo los experimentos de terapias combinadas y poder detectar efectos aditivos en combinación con el antiprogéstágeno MFP. Dada la equivalencia entre PEG-LD Caelyx y Doxopeg, en los experimentos siguientes se utilizó Doxopeg.

PEG-DL en terapias combinadas con MFP en carcinomas mamarios con distinta relación RPA/RPB

Evaluamos el efecto de PEG-DL en concentraciones menores a las utilizadas previamente: 0.9 mg/kg o 0.45 mg/kg. Se eligieron dos tumores sensibles a MFP que expresan mayor cantidad de RPA que RPB y otros dos tumores que muestran resistencia constitutiva a MFP y que tienen una relación inversa de isoformas de RP. Las dosis de PEG-DL y de MFP se eligieron de acuerdo a las características de cada tumor. El racional consiste en inducir una inhibición incompleta con cada agente individual de manera de poder evaluar la efectividad de las terapias combinadas.

Tumores que expresan niveles mayores de RPA que de RPB

Los tratamientos combinados resultaron más eficaces que las monoterapias sólo en los tumores C4-HI y 59-2-HI, ambos tumores respondedores a la MFP y con mayor nivel de expresión de RPA que de RPB (Fig. 3.4.).

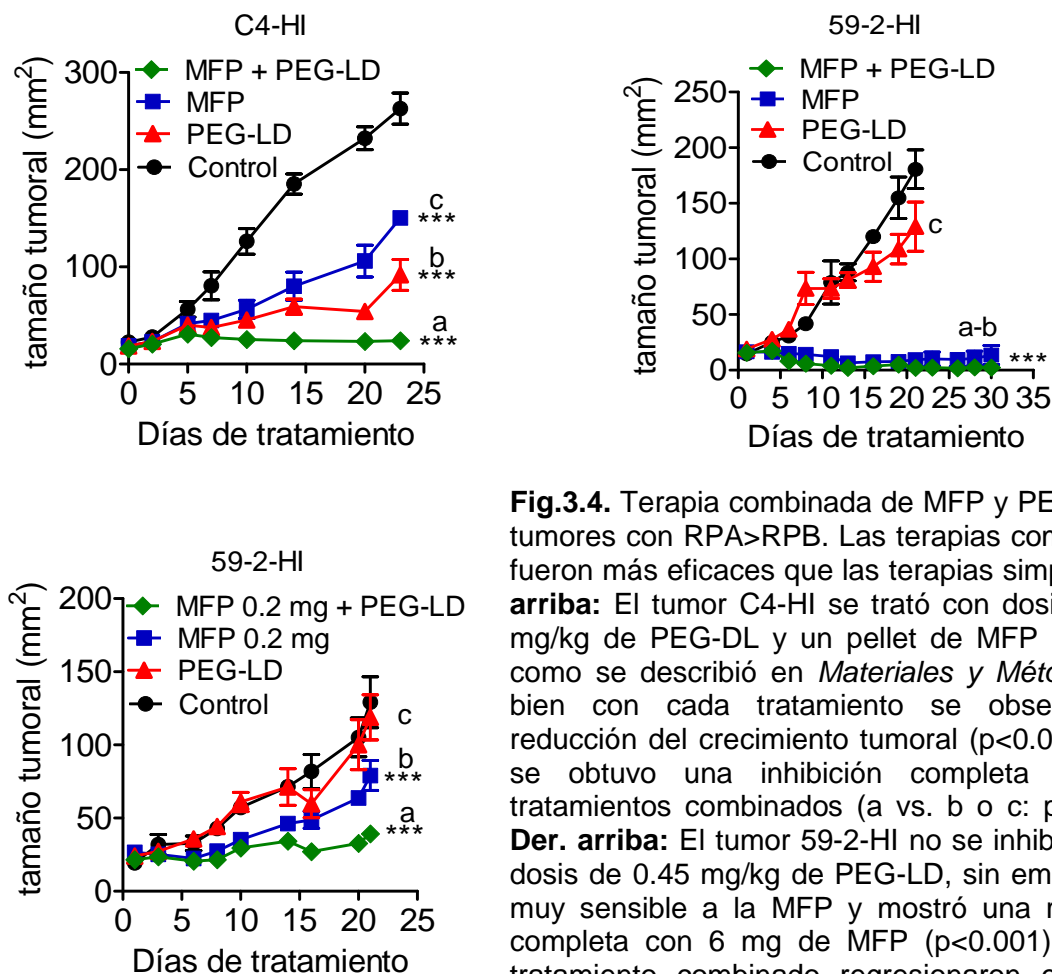


Fig.3.4. Terapia combinada de MFP y PEG-DL en tumores con RPA>RPB. Las terapias combinadas fueron más eficaces que las terapias simples. **Izq. arriba:** El tumor C4-HI se trató con dosis de 0.9 mg/kg de PEG-DL y un pellet de MFP de 6 mg como se describió en *Materiales y Métodos*. Si bien con cada tratamiento se observó una reducción del crecimiento tumoral ($p < 0.001$), sólo se obtuvo una inhibición completa con los tratamientos combinados (a vs. b o c: $p < 0.001$). **Der. arriba:** El tumor 59-2-HI no se inhibió con la dosis de 0.45 mg/kg de PEG-LD, sin embargo es muy sensible a la MFP y mostró una regresión completa con 6 mg de MFP ($p < 0.001$). Con el tratamiento combinado regresionaron en forma completa todos los tumores (a y b vs. c: $p < 0.001$). **izq. abajo:** Experimento similar al anterior utilizando *pellets* de MFP de 0.2 mg para poder visualizar mejor los efectos de la terapia combinada (a vs. b o c: $p < 0.001$).

En las imágenes histológicas de los tumores C4-HI obtenidas al final del experimento, día 20 de tratamiento (Fig. 3.5.), se observó que MFP por sí sola indujo diferenciación con un incremento del estroma tumoral como ya fue informado previamente (Wargon et al. 2009), mientras que PEG-DL indujo principalmente un incremento en la necrosis. En los tumores con tratamientos combinados sólo se observaron pocas células rodeadas por fibras de colágeno.

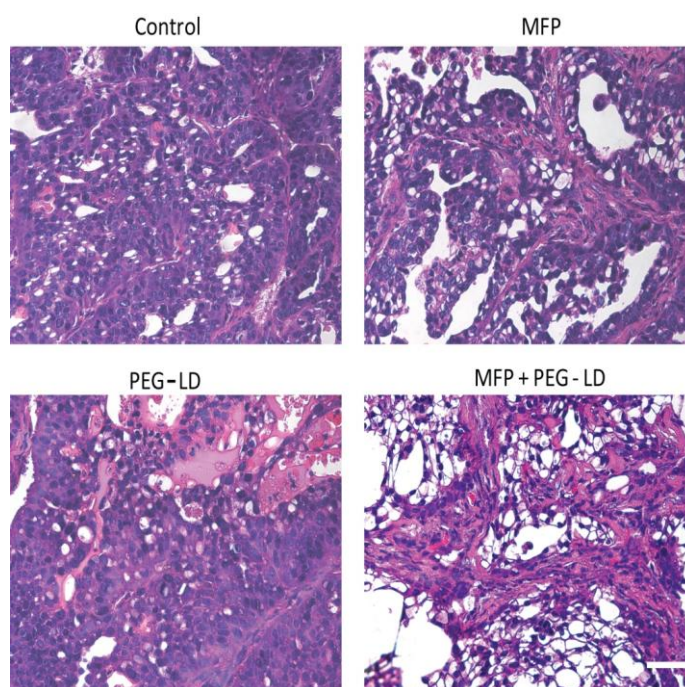


Fig. 3.5. Imágenes histológicas del tumor C4-HI luego de 20 días de tratamiento con MFP y PEG-LD. MFP administrado en *pellets* de 6 mg induce un incremento en la diferenciación del tejido tumoral. PEG-DL en dosis de 0.9 mg/kg incrementa la necrosis central en los nidos tumorales. En el tratamiento de MFP 6 mg + PEG-DL 0.9 mg/kg, sólo quedan pocas células remanentes formando conductos dilatados rodeados de estroma fibroso. Barra: 40 μ m.

En el caso del tumor 59-2-HI el tratamiento con MFP indujo principalmente un incremento en la relación estroma/parénquima acompañado de una disminución de mitosis y un incremento de apoptosis (Vanzulli et al. 2005). Este tumor en particular mostró una sensibilidad muy elevada al antiprogéstágeno MFP, y por esta razón para realizar este tipo de experimentos se redujo 30 veces la cantidad de MFP del *pellet* para obtener una disminución del crecimiento tumoral que nos permitiera visualizar efectos aditivos.

PEG-DL en bajas dosis también indujo un incremento detectable del estroma, incremento que fue acompañado de la aparición de células con núcleos atípicos gigantes en comparación con las restantes células tumorales, mientras que en los tratamientos combinados se observaron imágenes histológicas que resumen las características anteriormente mencionadas por separado con un aumento de áreas necróticas.

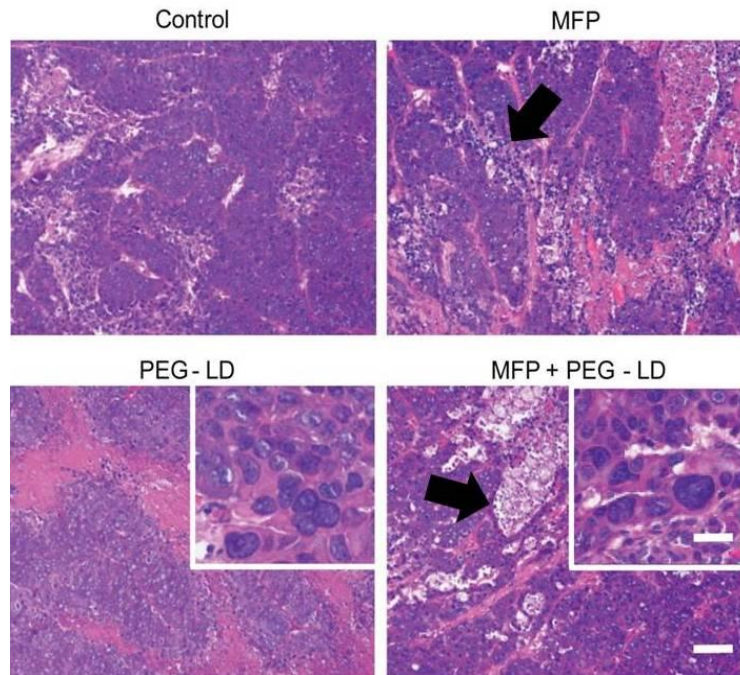


Fig. 3.6. Cambios histológicos en tumores 59-2-HI tratados con bajas dosis de MFP y/o PEG-LD. Los tumores control muestran características histológicas de un carcinoma pobremente diferenciado constituido principalmente por playas sólidas de células. Los tumores tratados con MFP (con *pellets* de 0.2 mg) mostraron un incremento de apoptosis aisladas y focos de necrosis (flechas negras). El tratamiento con PEG-LD induce principalmente un aumento en la necrosis. Los tumores que fueron tratados con las terapias combinadas MFP + PEG-LD mostraron pequeños nidos tumorales con focos de necrosis central y un incremento de estroma fibrótico. El tratamiento con PEG-DL tanto en la mono terapia como en el tratamiento combinado indujo la aparición de células con núcleos anormalmente grandes; barras: 40 μm ; barra del *inset*: 20 μm .

Tumores que expresan niveles mayores de RPB que de RPA

Se estudió el efecto del tratamiento combinado utilizado anteriormente en los tumores C4-2-HI y 59-HI en los cuales los niveles de RPB son superiores a los de RPA. Como se observa en la Fig. 3.7 estos tumores no responden a MFP, pero sí responden a PEG-LD. Sin embargo, no existió una mejora terapéutica detectable en

los tumores que fueron tratados con las terapias combinadas con respecto a las monoterapias. Se ilustran las imágenes histológicas de ambos tumores con los distintos tratamientos en las Figs. 3.8 y 3.9.

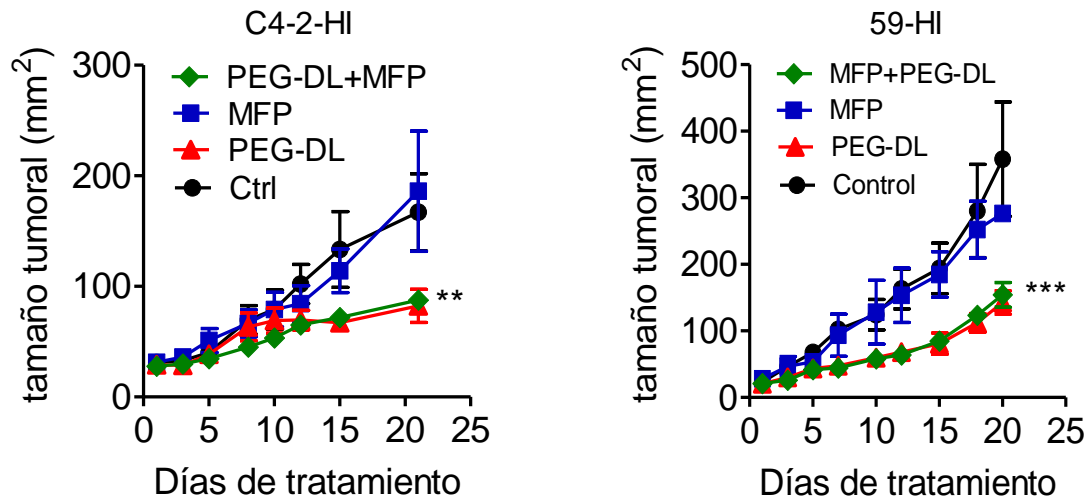


Fig. 3.7. Curvas de crecimiento de tumores resistentes a la MFP tratados con PEG-LD. La combinación del antiprogéstágeno y PEG-DL no modificó la respuesta terapéutica de los tumores. En este caso ambos tipos de tumores se trataron con *pellets* de 6 mg de MFP y dosis de 0.9 mg/kg de PEG-LD.

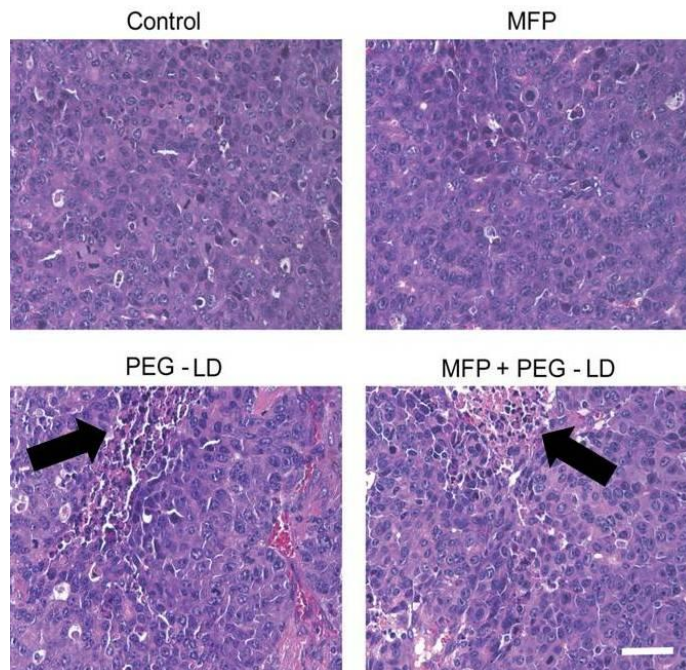


Fig. 3.8. Efecto de las terapias combinadas sobre la histopatología del tumor C4-2-HI. El tumor C4-2-HI es un carcinoma pobremente diferenciado con escaso estroma interpuesto. El tratamiento con MFP no provoca considerables modificaciones a nivel histológico. Tanto los tumores tratados sólo con PEG-DL, como los tratados con las terapias combinadas

(MFP+PEG-DL) presentan pequeños focos de necrosis (flechas negras) posiblemente debido sólo al efecto de PEG-DL (Barra: 40 μ m).

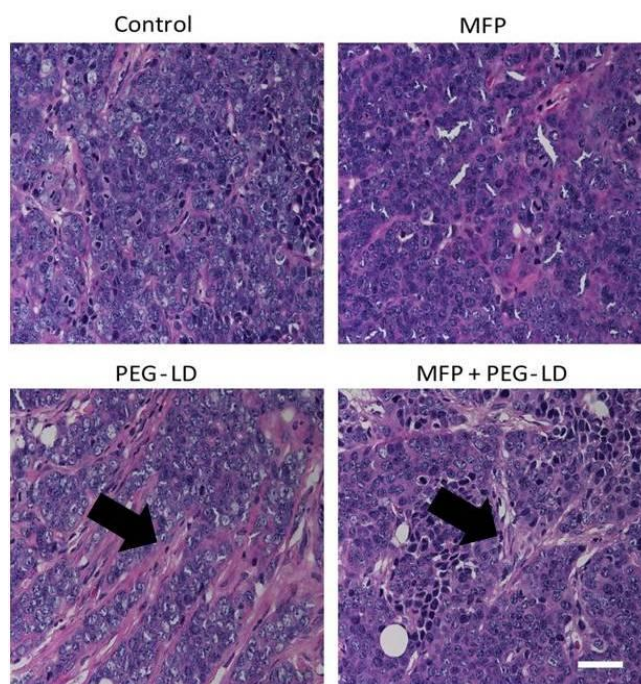


Fig. 3.9. Efecto de las terapias combinadas sobre la histopatología del tumor 59-HI. En este tumor MFP no provocó modificaciones significativas a nivel histológico, a excepción de un incremento leve en la cantidad de pequeñas luces. Tanto los tumores tratados sólo con PEG-DL como los tratados con las terapias combinadas presentaron aumentos moderados de estroma interpuesto dispuesto en filas (Barra: 40 μ m).

Determinación de la toxicidad en función al cambio en los niveles de glóbulos blancos

Teniendo en cuenta que los estudios de toxicidad evaluando el peso corporal se realizaron utilizando dosis 10 veces mayores que las utilizadas en estos experimentos de terapias combinadas, nos propusimos evaluar la posible toxicidad leve de las dosis bajas (0.9 y 0.45 mg/kg de PED-DL) tomando un parámetro de toxicidad más sensible como es la variación en la cantidad de glóbulos blancos.

Como se observa en la Fig. 3.10. las dosis utilizadas en los experimentos precedentes no lograron producir signos de toxicidad alguna al evaluar este parámetro. Los niveles de leucocitos se encontraron dentro de los valores normales con leves variaciones. Sólo con dosis de 1.8 mg/kg se observaron algunos descensos que quedaron por fuera del rango normal.

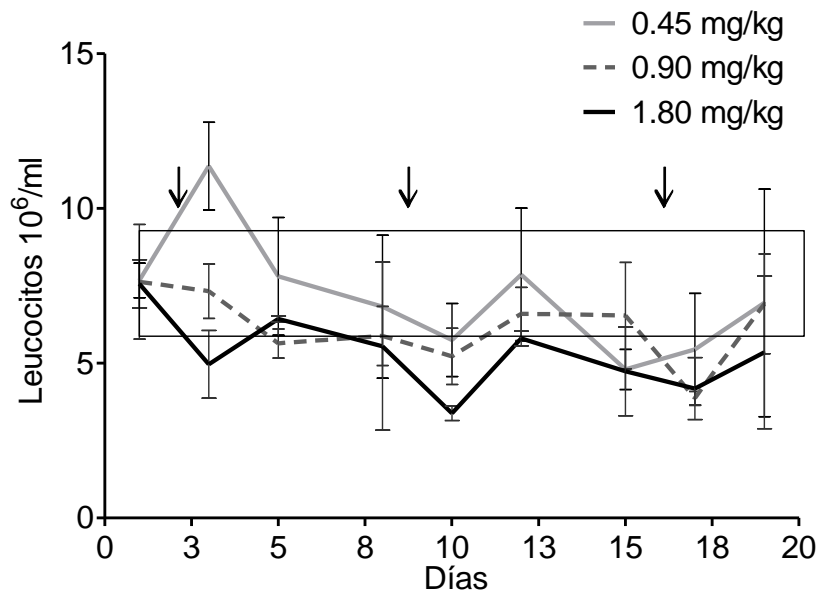


Fig. 3.10. Efecto de las dosis bajas de PEG-DL (Doxopeg) en los niveles de leucocitos totales. PEG-DL fue administrada en ratones sin tumor como se describió en *Materiales y Métodos* en las dosis de 0.45, 0.9 y 1.8 mg/kg. El recuento de leucocitos se llevó a cabo cada 2 o 3 días. Y el resultado final se obtuvo con el analizador Ac T diff of Coulter. El área del rectángulo en el gráfico indica los niveles entre los cuales pueden fluctuar los valores normales.

En resumen, de estos experimentos podemos concluir que si bien el tratamiento con MFP puede inducir regresión completa de los tumores con mayor proporción de isoforma RPA que RPB, el hecho de que la terapia combinada con dosis no tóxicas de PEG-LD tenga un mejor efecto terapéutico con la terapia hormonal sugiere que esta combinación podría ser beneficiosa en aquellos casos en que se recomienda una quimioterapia además de la hormonoterapia

Eficacia terapéutica de Nab-paclitaxel

Con el fin de investigar si los efectos observados eran exclusivos del PEG-LD, nos propusimos evaluar el efecto de PAX, un quimioterápico perteneciente al grupo de los taxanos. En un inicio para encontrar la dosis óptima de Nab-paclitaxel, se inocularon tres veces, dosis de 60 y 30 mg/kg cada 4 días utilizando el tumor C4-2-HI inoculado en el flanco de ratones *nu/nu*. Es importante destacar que el uso de ratones inmunosuprimidos constituye un requisito fundamental ya que de esta forma anulamos la posibilidad de una posible respuesta inmunológica contra la albúmina

humana presente en el Nab-paclitaxel. Ambas dosis utilizadas indujeron un efecto inhibitorio similar en este tumor provocando una regresión casi completa. La única diferencia observada fue que los tumores tratados con la dosis más elevada reiniciaron su crecimiento diez días después que los tumores tratados con la dosis de 30 mg/kg. Sólo los ratones tratados con la dosis de 60 mg/kg vieron reducido su peso corporal de una forma significativa con respecto a los ratones control (Fig. 3.11).

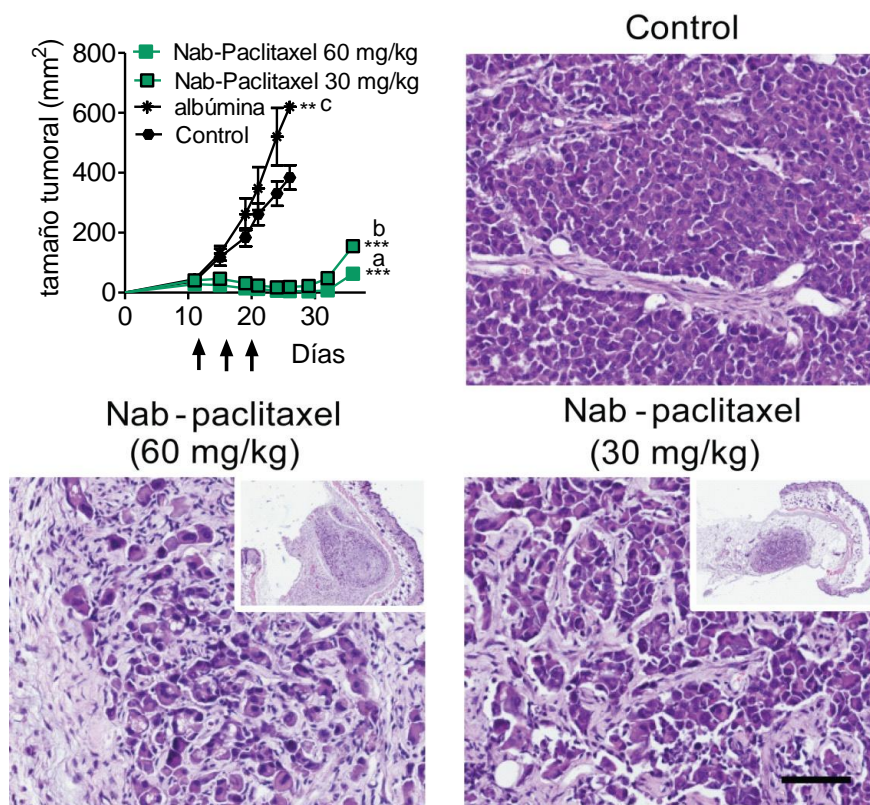


Fig. 3.11. Efecto de Nab-paclitaxel en el tumor C4-2-H1. Arriba izq. Se muestran las curvas de crecimiento de tumores C4-2-H1 transplantados en ratones *nu/nu*, las flechas indican los momentos de la administración de Nab-paclitaxel según se describe en *Materiales y Métodos*. Los tumores fueron sensibles a ambas dosis utilizadas. La administración de albúmina incrementó el tamaño de los tumores con respecto al grupo control. Fotografías: Se muestran las imágenes histológicas de los tumores control compuestos por células dispuestas en placas sólidas. Los tumores tratados muestran nidos de células remanentes que se encuentran rodeados por tejido estromal; barra: 100 µm. Los tumores tratados con la dosis más baja reiniciaron su crecimiento 10 días antes que los tratados con la dosis más alta. ***: $p < 0.001$ grupos experimentales vs. ambos controles; $p < 0.05$ control vs. control con albúmina (a o b vs. c: $p < 0.001$). .

Determinación de la toxicidad de las dosis de Nab-paclitaxel utilizadas

Por otro lado debimos determinar el grado de toxicidad de las dosis utilizadas de Nab-paclitaxel en el experimento anterior. De la misma manera que con PEG-DL, administramos la droga a ratones *nu/nu* sin tumor. La reducción o ganancia porcentual de peso se calculó a los 10 días de comenzados los tratamientos. Sólo los ratones a los cuales se les administró la dosis de 60 mg/kg mostraron una reducción significativa en el peso corporal. Luego de esta prueba de toxicidad elegimos continuar sólo con la dosis de 30 mg/kg.

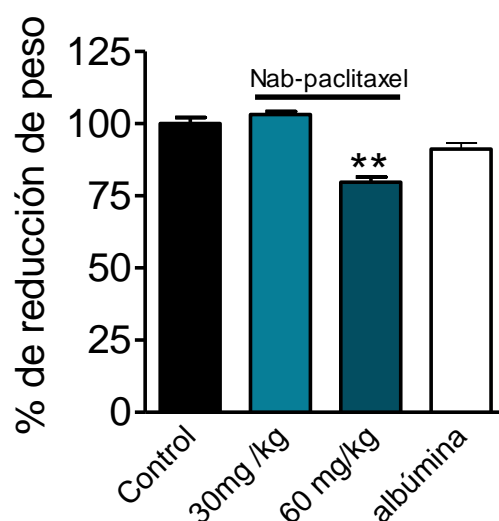


Fig.3.12. Evaluación de la toxicidad de Nab-paclitaxel. Se evaluó la reducción porcentual en el peso de ratones *nu/nu* tratados 3 veces en dosis endovenosas de 30 y 60 mg/kg de Nab-paclitaxel, albúmina o vehículo cada 4 días. Los animales se pesaron al día 10 de haber iniciado los tratamientos (dos días después de la última aplicación). Sólo la dosis de 60 mg/kg produjo reducciones significativas en el peso de los animales (**: $p < 0.01$).

Eficacia de Nab-paclitaxel en terapias combinadas con MFP en carcinomas mamarios con distinta relación RPA/RPB

Tumor que expresa niveles mayores de RPA que de RPB

Se evaluó la eficacia terapéutica de Nab-paclitaxel sobre el crecimiento del tumor C4-HI respondedor a antiprogestágenos, con alta expresión de RPA.

En este tumor la dosis de 30 mg/kg no indujo una reducción significativa del crecimiento. Sin embargo, el tratamiento combinado de MFP con Nab-paclitaxel sí indujo un efecto inhibitorio significativo con respecto al provocado por ambas monoterapias (Fig. 3.13 arriba izq.). En este experimento en particular, al día 10 de tratamiento se eutanasiaron animales seleccionados, con el objetivo de tener imágenes histológicas a tiempos tempranos. Esto nos permitió observar que en este tiempo el Nab-paclitaxel indujo figuras mitóticas aberrantes con núcleos gigantes (Fig. 3.13 arriba derecha), conservándose sin embargo, la histoarquitectura general. Los tumores continuaron creciendo a una velocidad similar a la de los tumores controles. Por su lado la MFP indujo ya muy tempranamente el efecto de diferenciación antes descrito en el laboratorio (Wargon et al. 2009). Los tumores tratados con MFP+Nab-paclitaxel mostraron el patrón típico de diferenciación de los tumores tratados con MFP en combinación con las características citológicas observadas en el grupo tratado con Nab-paclitaxel. Al final del experimento un 90 % de las células tumorales habían desaparecido en este grupo.

Tumor que expresa niveles mayores de RPB que de RPA

En un experimento anterior utilizando el tumor C4-2-HI en el cual se administró Nab-paclitaxel, pudimos observar que una dosis de 30 mg/kg fue capaz de producir una regresión total. Por esta razón, para investigar si una terapia combinada MFP+Nab-paclitaxel podría ser más efectiva que las respectivas monoterapias decidimos reducir la dosis a 15 mg/kg de Nab-paclitaxel manteniendo los 6 mg en el pellet de MFP. La terapia combinada mostró una respuesta comparable a la inducida por el Nab-paclitaxel en monoterapia (Fig. 3.13 abajo).

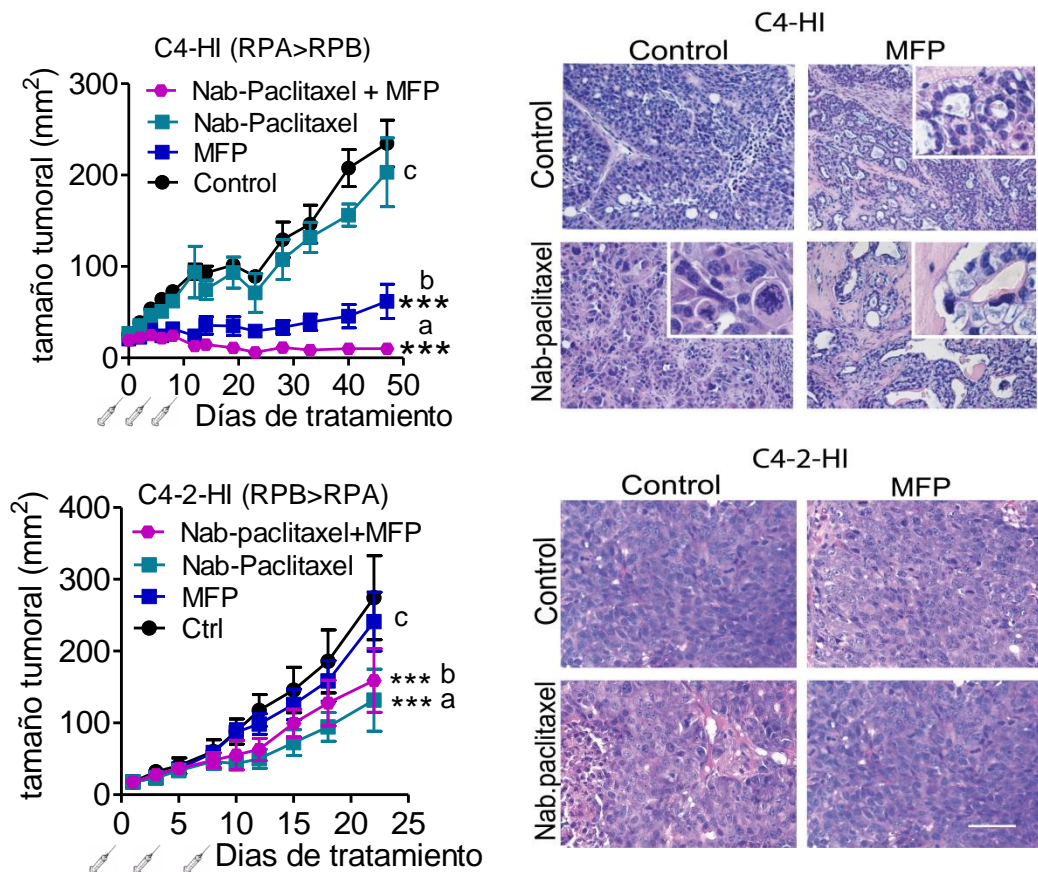


Fig. 3.13. Efecto de terapias combinadas de Nab-paclitaxel y MFP en tumores con distinta proporción de isoformas de RP. Arriba izq. Se muestran las curvas de crecimiento de tumores C4-HI inoculados en ratones *nu/nu* tratados con dosis de 30 mg/kg de Nab-paclitaxel, pellets de 6 mg de MFP y en forma combinada con ambos tratamientos (n=6/grupo). El tratamiento combinado en este tumor indujo una inhibición del crecimiento mayor que cada una de las monoterapias (***: $p < 0.001$ grupos experimentales vs. control; c vs. a o b: $p < 0.001$). Arriba der. Imágenes histológicas representativas de los tumores de los ratones sacrificados a los 10 días de iniciado los tratamientos. Nab-paclitaxel a este tiempo genera células aberrantes con polinucleación y polimorfismo mostrando una condensación parcial de la cromatina. El inset muestra una mitosis aberrante y una célula con los cromosomas dispersos. Se observaron también células de citoplasma eosinófilo y células con una gran cantidad de citoplasma. MFP indujo diferenciación. En el tratamiento combinado la histoarquitectura es muy similar a los tumores tratados con MFP, pero se observa una gran cantidad de células aberrantes en forma de anillo de sello con una gran vacuola intracitoplasmática, además de presentar un abundante estroma esclerohialino y células con características típicas del tratamiento con Nab-paclitaxel. Abajo izq. Se muestran las curvas crecimiento del tumor C4-2-HI tratado con dosis de 15 mg/kg de Nab-paclitaxel, MFP o tratamientos combinados. MFP no aumentó el efecto inhibitorio del Nab-paclitaxel. Abajo der. El PAX induce un aumento de zonas necróticas como se ilustra en la imagen, mientras que no se observan diferencias histológicas entre los tumores C4-2-HI tratados con MFP o con tratamientos combinados (c vs. a o b: $p < 0.001$). Barra: 40 μm ; Barra del *inset*: 20 μm .

En resumen, de estos experimentos podemos concluir que los carcinomas mamarios de este modelo experimental son sensibles al tratamiento con Nab-paclitaxel y que sólo en aquellos tumores con mayor proporción de RPA que RPB las terapias combinadas con MFP mejoran la eficacia de las terapias simples. Los carcinomas que mostraron mejor respuesta a la monodroga Nab-paclitaxel fueron los tumores con mayor proporción de RPB que RPA. En forma similar a los resultados obtenidos con PEG-LD las terapias combinadas de MFP y PAX permitirían utilizar dosis no tóxicas de Nab-paclitaxel en pacientes con mayor proporción de RPA que RPB.

PEG-LD y Nab-paclitaxel en terapias combinadas con MFP en un modelo experimental de células de cáncer de mama humano

Establecimiento de xenotransplantes de células T47D, T47D-YA y T47D-YB

Los resultados anteriores demuestran que carcinomas mamarios murinos que expresan receptores hormonales y que tienen una alta proporción de RPA/RPB son susceptibles de beneficiarse de una terapia combinada con quimioterápicos y MFP.

Para fortalecer el resultado y evaluar su reproducibilidad utilizando células de origen humano se establecieron tumores a partir de la inoculación de células T47D-YA o -YB en ratones inmunosuprimidos. En un comienzo se utilizaron ratones *nu/nu* siguiendo los protocolos publicados (Badtke et al. 2012) y no tuvimos éxito. Se observaba un pequeño crecimiento tumoral incipiente pero los tumores luego regresaron espontáneamente (resultados no mostrados).

Posteriormente, dado que habíamos adquirido los ratones NSG para trabajar con muestras humanas, tratamos de hacer crecer los tumores en estos ratones obteniendo resultados satisfactorios.

Descripción histopatológica de los xenoinjertos de T47D-YA y T47D-YB

Los tumores formados por células T47D-YA a nivel celular muestran un citoplasma poligonal acidófilo con núcleos de cromatina laxa. En el tumor, al igual que en cultivo, las células muestran una cantidad de nucléolos variables con mitosis atípicas como por ejemplo las mitosis tripolares. Existen apoptosis espontáneas que en algunos nidos tumorales se encuentran en forma de células apoptóticas fragmentadas. A nivel histológico se trata de un carcinoma ductal con cribras y conductos, donde un 10 y 15 % de la masa tumoral está involucrada en formar estructuras glandulares. Posee un patrón de crecimiento en nidos sólidos y acordonados y presenta una cápsula fibrosa rodeada por una matriz de colágeno con un estroma moderado que la encapsula parcialmente (Fig. 3.14.).

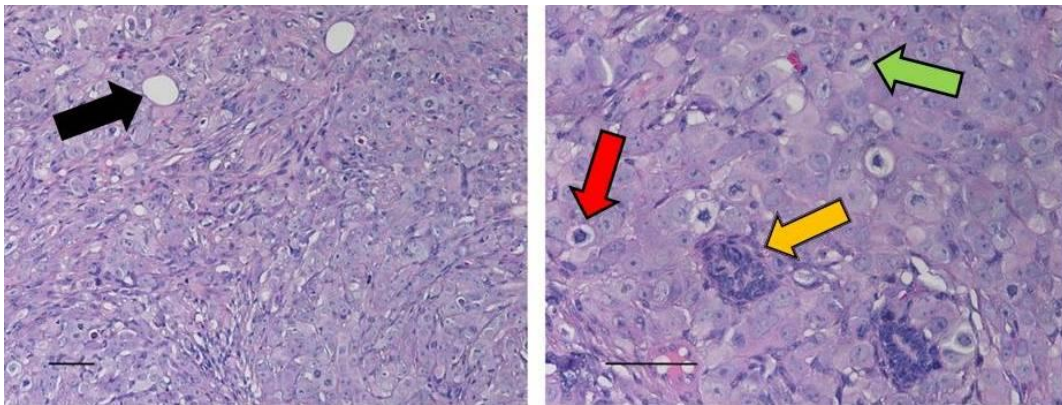


Fig. 3.14. Tumor de la línea celular T47D-YA. Izq. Muestra características histológicas de carcinoma ductal donde se observan conductos o estructuras glandulares en forma de espacios blancos (flecha negra). Der. Muestra la presencia de apoptosis espontáneas (flecha roja) y algunas mitosis (flecha verde), también se pueden observar conductos normales de la glándula del ratón (flecha naranja). Barra: 60 μ m.

Estos xenoinjertos muestran un crecimiento particular similar al crecimiento del comedo carcinoma, donde se observan grupos de células creciendo dentro de los conductos mamarios. Adicionalmente tienden a hacer embolias tanto en vasos como en nervios periféricos rodeando las vainas de mielina e incluso logran invadir localmente las fibras musculares (Figura 3.15).

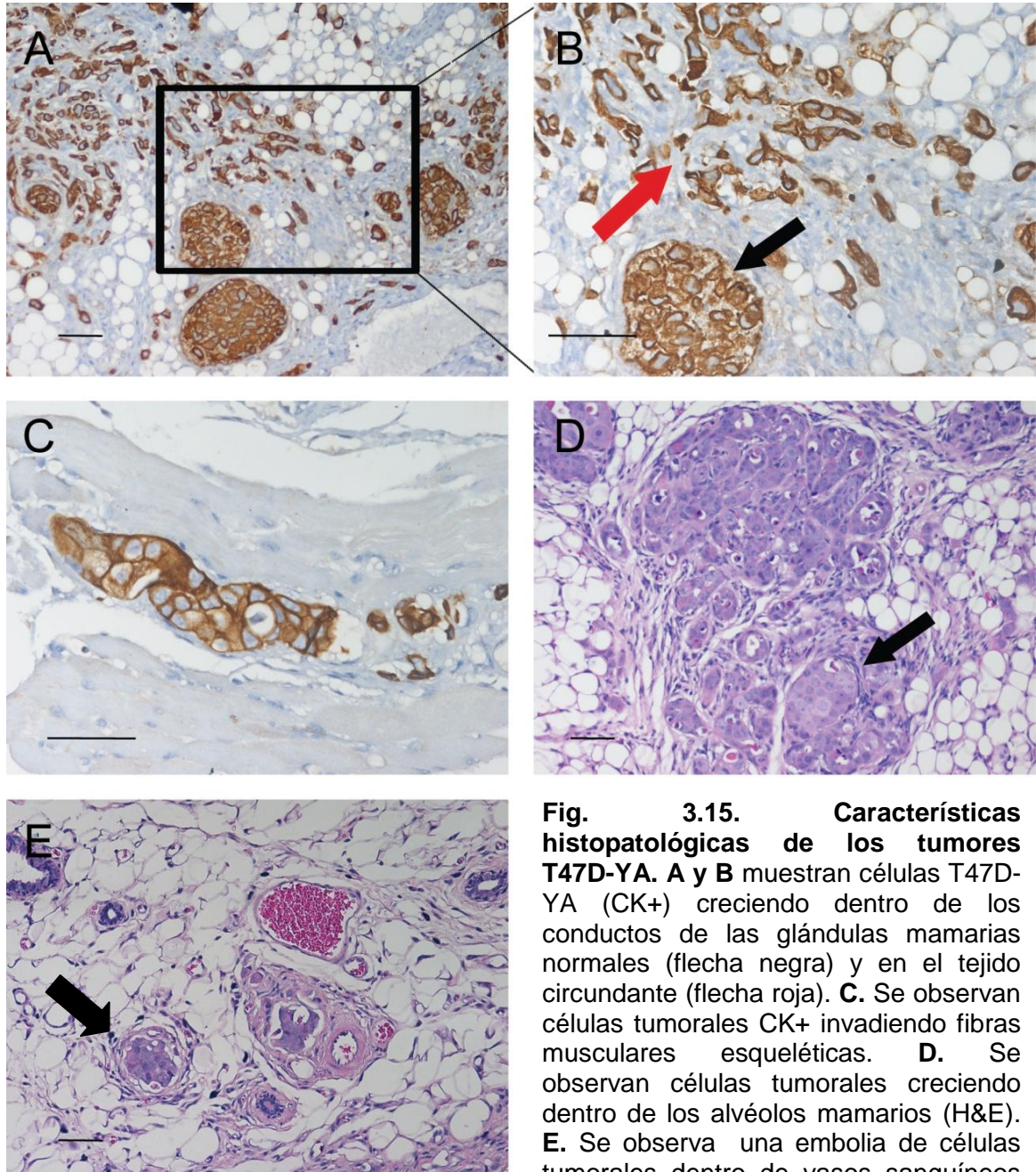


Fig. 3.15. Características histopatológicas de los tumores T47D-YA. A y B muestran células T47D-YA (CK+) creciendo dentro de los conductos de las glándulas mamarias normales (flecha negra) y en el tejido circundante (flecha roja). **C.** Se observan células tumorales CK+ invadiendo fibras musculares esqueléticas. **D.** Se observan células tumorales creciendo dentro de los alvéolos mamarios (H&E). **E.** Se observa una embolia de células tumorales dentro de vasos sanguíneos

La citología de los xenoinjertos T47D-YB es similar a la de los tumores T47D-YA, pero a diferencia de ellos, muestran un escaso estroma interpuesto entre los nidos tumorales, siendo un tumor más sólido y en lámina (playas de células con muy poco estroma interpuesto sin mostrar casi discontinuidad entre célula y célula). Ocasionalmente se observan cribas, y en un grado más reducido que los tumores de T47D-YA (Fig. 3.16).

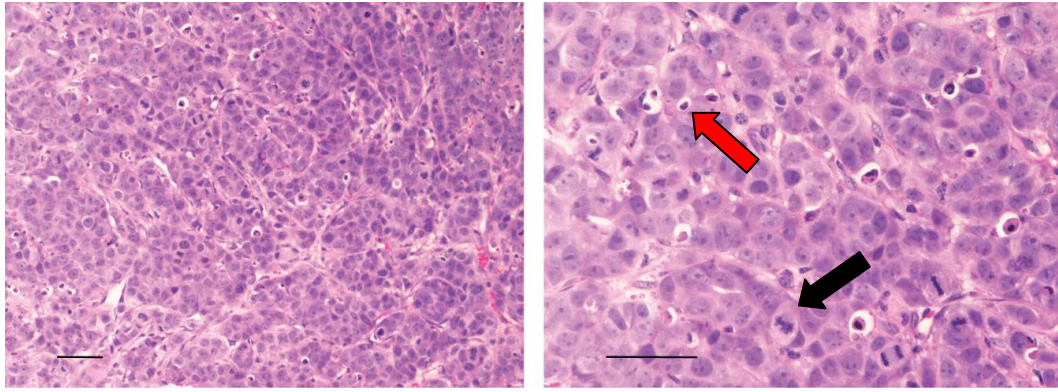


Fig. 3.16. Tumor de la línea celular T47D-YB. Crecimiento en lámina de las T47D-YB donde se observa el escaso estroma. En la imagen de la derecha se observan varias mitosis (flecha negra) y células apoptóticas (flecha roja) Barra: 60 μ m.

Los xenotransplantes de T47D-YB de la misma manera que los tumores de T47D-YA mostraron capacidad invasiva en distintos tejidos circundantes al tumor (Fig. 3.17).

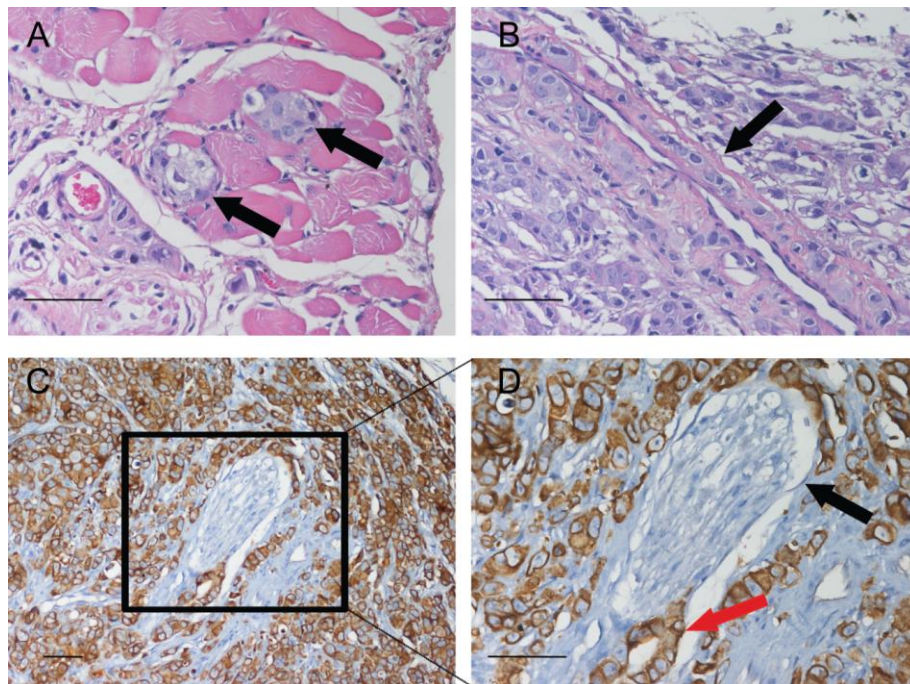


Fig. 3.17. Características histopatológicas de los tumores T47D-YB. **A.** Se observan células T47D-YB invadiendo músculo esquelético (H&E). **B.** Se observan las células tumorales tapizando las paredes de vasos sanguíneos (H&E). **C y D.** Muestra una invasión perineural de las células tumorales (CK+). La flecha negra señala a la vaina del nervio y la flecha roja señala a las células tumorales creciendo en el espacio perineural. Barras: 60 μ m.

La MFP mejoró la eficacia terapéutica de PEG-DL y de Nab-paclitaxel en tumores T47D-YA pero no en los T47D-YB creciendo en ratones NSG

La MFP inhibió el crecimiento de los tumores T47D-YA como se esperaba a partir de trabajos previos realizados en el laboratorio utilizando tumores del modelo de carcinomas mamarios inducidos por MPA, y estudios *in vitro* en células T47D (Cerliani et al., 2011; Lanari et al, 2012) y no indujo una inhibición del crecimiento de los tumores T47D-YB. Es importante mencionar que en nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se realizan estudios *in vivo* sobre el efecto de MFP en xenoinjertos de estas células.

El Nab-paclitaxel indujo la regresión de ambos tipos tumorales, sin embargo, mostró un mayor efecto terapéutico en los tumores T47D-YB en comparación a los T47D-YA. El PEG-DL por otra parte, sólo inhibió el crecimiento tumoral en forma significativa de los tumores T47D-YA.

Solamente en los tumores T47D-YA los tratamientos combinados fueron más eficaces que las monoterapias. Curiosamente, en los tumores T47D-YB la MFP incluso redujo la eficacia terapéutica de Nab-paclitaxel (Fig. 3.18).

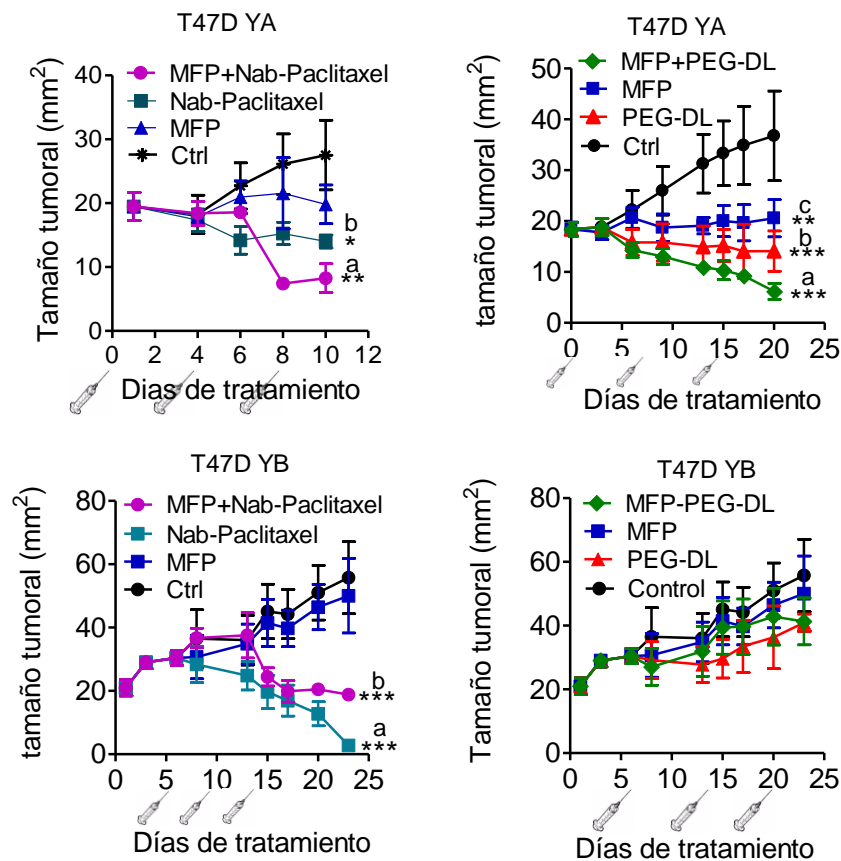


Fig. 3.18. Efecto de los tratamientos combinados en los tumores T47D-YA y T47D-YB. Estos gráficos corresponden a xenoinjertos de T47D-YA o T47D-YB creciendo en ratones NSG con *pellets* de E₂ implantados una semana antes de la inyección de las células tumorales (n=6). Los ratones se trataron con PEG-LD (0.9 mg/kg), Nab-paclitaxel (15 mg/kg) y/o MFP (10 mg/kg/día). MFP sólo inhibió el crecimiento de los xenoinjertos de las células T47D-YA. La mayor eficacia de los tratamientos combinados con respecto a las monoterapias se observó sólo en los tumores T47D-YA. ***: p<0.001; **: p<0.01; y*: p<0.05. T47D-YA PEG-DL: a vs. b: p<0.001; a vs. c: p<0.001; T47D-YA Nab-paclitaxel: a vs. b o vs. c: p<0.05; T47D-YB PEG-DL/Nab-paclitaxel: a vs. b: p<0.05; a vs. c: p<0.001.

Todos los tumores que mostraron una inhibición del crecimiento tumoral, histológicamente mostraron una gran remodelación tisular asociada a un aumento de fibras de colágeno intercaladas entre los nidos de parénquima tumoral como se evidencia en la coloración azul del tricrómico de Masson (Fig. 3.19).

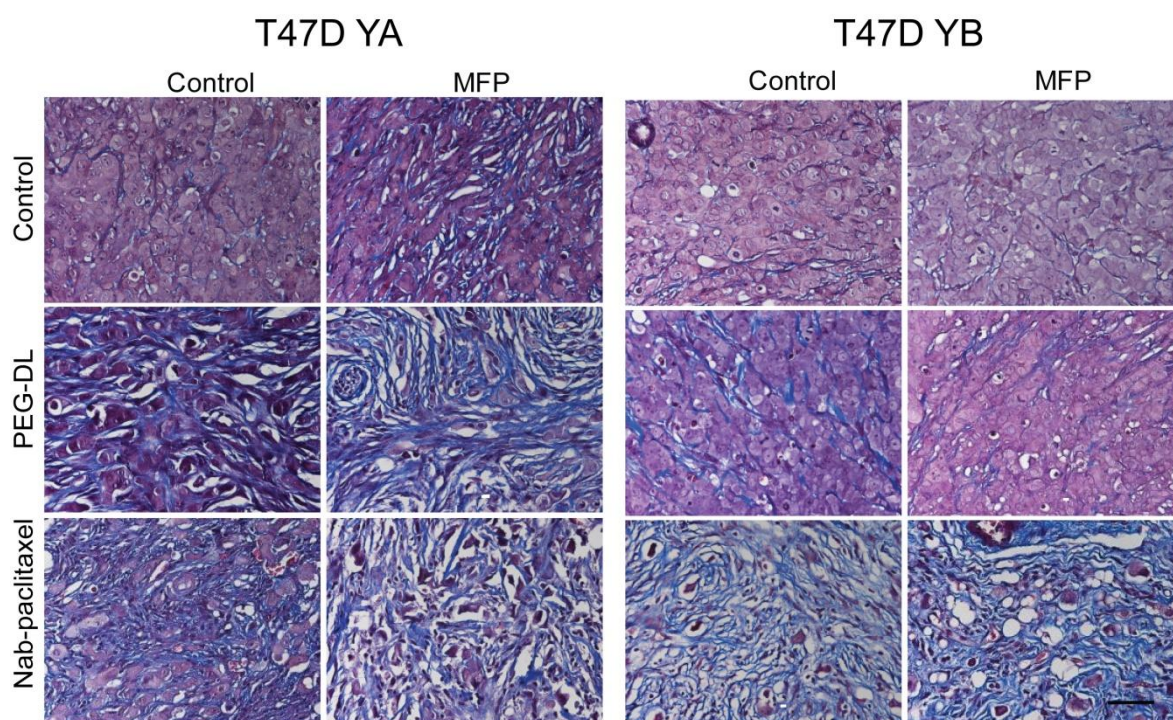


Fig. 3.19. Remodelación estromal inducida por los tratamientos con MFP y/o PEG-LD o Nab-paclitaxel en tumores T47D-YA o -YB. Tinción de Tricrómico de Masson que permite observar las fibras de colágeno en azul. Los tumores en regresión muestran un aumento de fibras de colágeno que son muy notorios en los tratamientos de los tumores T47D-YA con PEG-LD o Nab-paclitaxel o tratamientos combinados, mientras que en los tumores T47D-YB sólo los grupos tratados con Nab-paclitaxel muestran aumento de fibras de colágeno. Barra: 40 µm.

Además se evaluó la expresión de CK, marcador de estirpe epitelial, por IHQ que nos permitió determinar la proporción relativa de células tumorales en relación a toda la masa tumoral (Fig. 3.20), lo cual deja en evidencia que el tratamiento fue más efectivo que lo observado a partir de las mediciones con calibre.

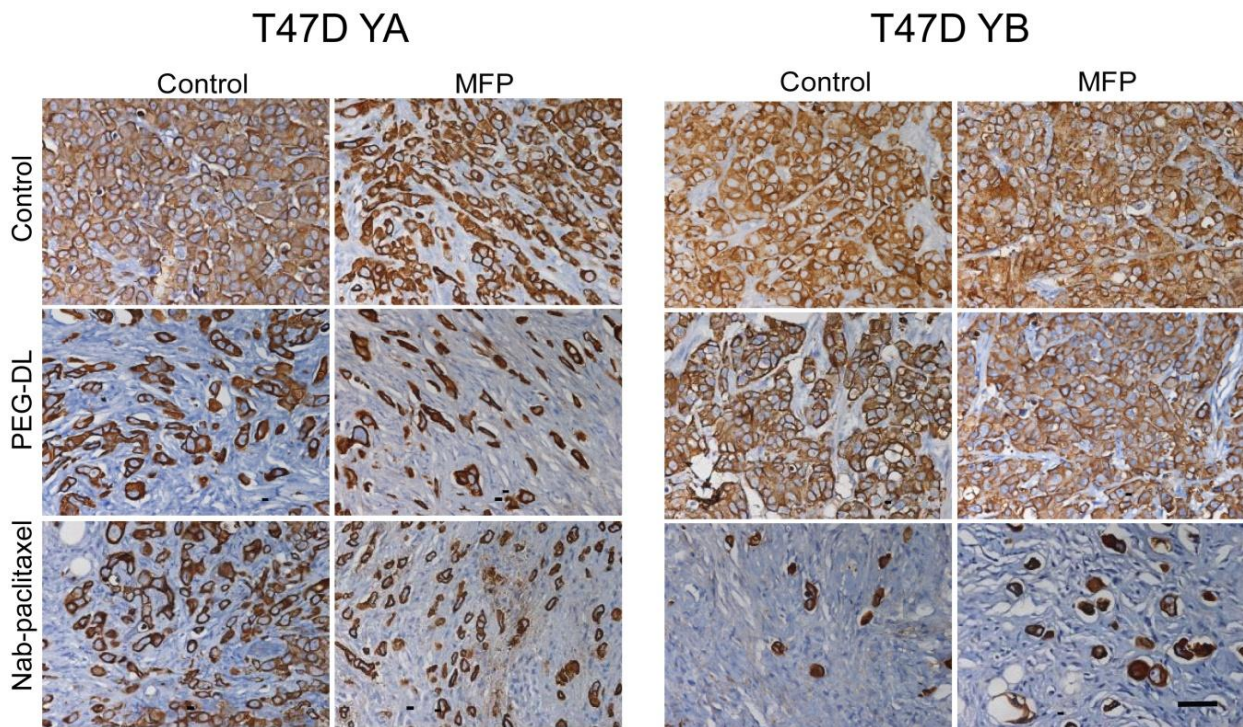


Fig. 3.20. Marcación de CK realizada para evidenciar la remodelación tisular inducida por los tratamientos con MFP y/o PEG-LD o Nab-paclitaxel en tumores T47D-YA o -YB. Pocas células tumorales remanentes (CK+) se observan en los xenoinjertos T47D-YA luego de los tratamientos combinados. Contrariamente, para las células T47D-YB no se observa mayor eficacia de los tratamientos combinados vs las monodroga aunque es destacable el mayor efecto en el tratamiento del Nab-paclitaxel vs PEG-LD en este tumor. Barra: 40 μ m.

Descripción histopatológica de los tumores T47D-YA tratados

La MFP indujo remodelación estromal periférica que constituye un signo característico de regresión. La remodelación afectó a un tercio aproximadamente de la masa tumoral total. En pequeñas zonas existió un incremento de estroma esclerohialino y se observaron pequeños focos necróticos y focos apoptóticos aislados. Las células en algunos casos mostraron finas vacuolas e internamente se vio una red o entramado a nivel citoplasmático. A pesar de esto el tejido tumoral no se encontró totalmente silenciado, ya que se observaron mitosis aisladas. Si bien se observó un aumento de la cantidad de luces con respecto al control, no se lo puede considerar como un tumor diferenciado.

Los tumores tratados con PEG-DL mostraron un estroma fibroblástico y fibroso compuesto principalmente por fibras colágenas. Hubo un aumento en la necrosis

pero también se observaron figuras mitóticas. De forma adyacente a los focos necróticos se observaron pequeñas zonas de esclerohialinosis. En comparación con los tumores de T47D-YB, los tumores T47D-YA presentaron más focos de necrosis.

El Nab-paclitaxel indujo focos de necrosis periféricos y se observaron cambios regresivos con un incremento de estroma con células tumorales dispersas o creciendo en cordones. Es interesante destacar que no se observaron cambios significativos con este tratamiento en las células creciendo en el interior de estructuras como vasos, nervios o conductos mamarios (Fig. 3.15. A y B.).

En el caso de tratamientos combinados de MFP+PEG-DL, adyacente a las pequeñas áreas de necrosis se observaron focos de regresión completa y un estroma fibrocelular con células tumorales aisladas o en pequeños cordones. En resumen se puede decir que el tratamiento combinado indujo una regresión más intensa. En los tumores tratados con MFP+Nab-paclitaxel se observaron cambios regresivos involucrando a un 80 o 90% de la masa tumoral, que presentaron en su mayoría células tumorales aisladas inmersas en el estroma, indicando que si bien la regresión fue mayor a la de los tumores tratados sólo con Nab-paclitaxel, no resultó completa.

Descripción histopatológica de los tumores T47D-YB tratados

En los tumores T47D-YB, el tratamiento con MFP no generó cambios con respecto al control. En algunas imágenes se puede observar un sensible aumento del estroma, en este caso, no asociado a signos de regresión.

PEG-DL de la misma forma que MFP, no fue capaz de modificar en forma notoria la histología, se observan láminas sólidas de tejido aunque en algunos preparados existieron pequeñas zonas de esclerohialinosis rodeados de pequeños focos de apoptosis/necrosis.

Los tumores tratados con Nab-paclitaxel mostraron importantes signos de regresión. Se observaron sólo células residuales aisladas con un citoplasma microvacuolizado y algunas células incluso binucleadas. La regresión fue casi completa, de un 90 % aproximadamente. No se observó la histoarquitectura típica de los controles debido a que los cambios regresivos fueron severos.

Los tumores tratados con MFP+PEG-DL no mostraron mayores diferencias con respecto al tratamiento con la monodroga PEG-DL de la misma manera que MFP+Nab-paclitaxel con respecto a Nab-paclitaxel. Básicamente se conservaron los mismos escenarios.

En resumen, podemos concluir que los resultados obtenidos en el modelo experimental humano son similares a los obtenidos en el modelo murino. Sólo los tratamientos quimioterápicos combinados con MFP aumentaron la eficacia de las monodrogas en el caso de las células con alta expresión de RP-A. Asimismo estos últimos fueron más sensibles al PEG-LD y los tumores con alta expresión de RP-B fueron más sensibles al Nab-paclitaxel.

Estudio de los mecanismos implicados en el aumento de eficacia de MFP en combinación con PEG-LD o Nab-paclitaxel

Remodelación tisular y cambios en los niveles intratumorales de nanopartículas

Como se mencionó anteriormente, la regresión de los carcinomas mamarios del modelo experimental utilizado inducida por MFP va acompañada de un incremento en la proporción de estroma con respecto al compartimiento epitelial, y dentro de los tumores sensibles existen ciertas diferencias intrínsecas de cada tumor. Por ejemplo, el tumor C4-HI regresa ante la presencia de antiprogéstágenos con un incremento en la diferenciación además del aumento en la cantidad de estroma (Fig. 3.13. arriba derecha). Por otro lado, el tumor 59-2-HI, también sensible, regresa sin inducir diferenciación del compartimiento epitelial, simplemente existe una reducción del tamaño de los nidos tumorales debido a un aumento de citostasis y apoptosis (Fig. 3.6). El aumento de estroma debido a este tipo de tratamiento hormonal se puede apreciar muy claramente en tumores transplantados en ratones BALB/c-GFP en los cuales todas las células excepto las tumorales inoculadas son GFP+ (Figura 3.21).

Para los experimentos posteriores de regresión tumoral y medición de los niveles intratumorales de droga se decidió usar el tumor 59-2-HI.

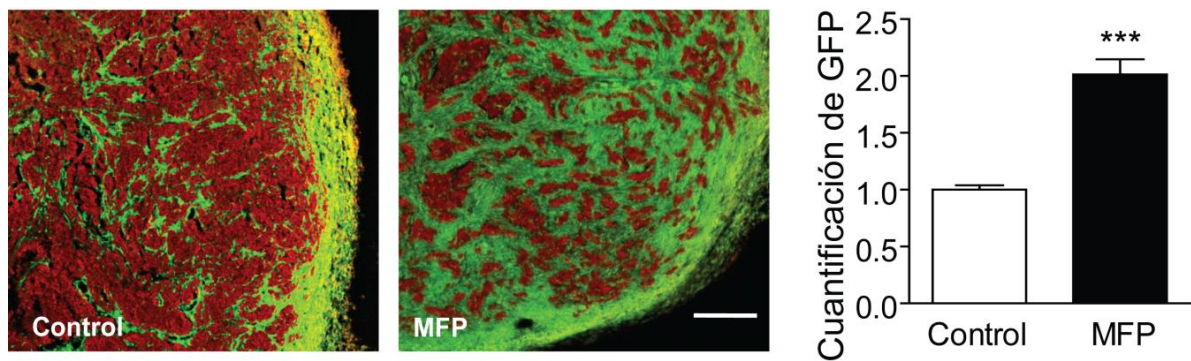


Fig. 3.21. Aumento del estroma en el tumor 59-2-HI (RPA/RPB>1) tratado con MFP. Estas imágenes corresponden a tumores 59-2-HI creciendo en ratones BALB/c-GFP que se trataron o no con MFP (10 mg/kg/día) durante 5 días. Se observa un aumento de células estromales (células verdes, GFP+) en los tumores tratados con MFP. Los núcleos fueron contra teñidos con IP (rojo), barra: 300 μ m.

Estudios sobre la vasculatura

Hipotetizamos que este tipo de remodelación tisular semejante a un proceso de cicatrización, podría estar acompañado de una remodelación a nivel vascular que podría llegar a explicar, al menos en parte, los resultados observados en las terapias combinadas. Por lo tanto decidimos estudiar el efecto de MFP sobre la vasculatura durante el proceso de regresión. Se observó un incremento en el número de células positivas para CD-31 (marcador de células endoteliales) en aquellos tumores tratados con MFP con respecto a los tumores control (Fig. 3.22) sugiriendo que el tratamiento con MFP estaría asociado a un aumento de la vasculatura.

Este fue un resultado que pareció contra intuitivo, ya que en un primer momento se pensaba que MFP podría inhibir la formación de vasos. El fenómeno de antiangiogénesis se encuentra frecuentemente asociado a la regresión tumoral y los trabajos del grupo de Salman Hyder sugerían que MFP actuando en forma opuesta al MPA podría inhibir la angiogénesis (Liang & Hyder 2005).

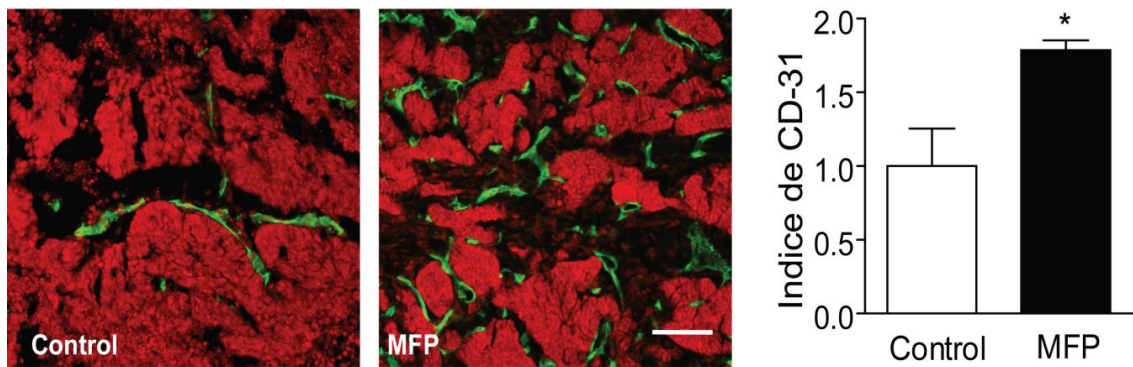


Fig. 3.22. Expresión de CD-31 en tumores tratados con MFP. Tumores 59-2-HI creciendo en ratones BALB/c tratados o no con MFP (10 mg/kg) por 5 días se procesaron para estudios de IF. Se utilizó un anticuerpo anti CD-31, marcador de células endoteliales, y un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde). Se observa un aumento en la marca de CD-31 en los tumores tratados con MFP. Los núcleos se marcaron con IP; barra: 300 μ m.

Para corroborar estos resultados y confirmar la funcionalidad de los vasos sanguíneos se inyectó una lectina unida a fluoresceína que tiene la capacidad de unirse a las células endoteliales. Como se observa en la Fig. 3.23, los tumores tratados con MFP mostraron un aumento de marca correspondiente a la lectina ($p < 0.05$).

Asimismo se realizó la colocalización entre CD-31 y LT confirmando así que los tumores tratados con MFP no sólo tienen más vasos que los tumores controles, sino que también una mayor proporción de ellos son funcionales (Fig. 3.23.B). Lo cual fue corroborado con otro marcador de vasos como lo es Von Willebrand (Fig. 3.24.izq).

Usando los mismos tumores que fueron marcados con LT se determinó la presencia de vasos maduros, los cuales usualmente están rodeados de pericitos (células positivas para SMA). Sólo se encontraron vasos de este tipo en la periferia del tumor (Fig. 3.24.der.).

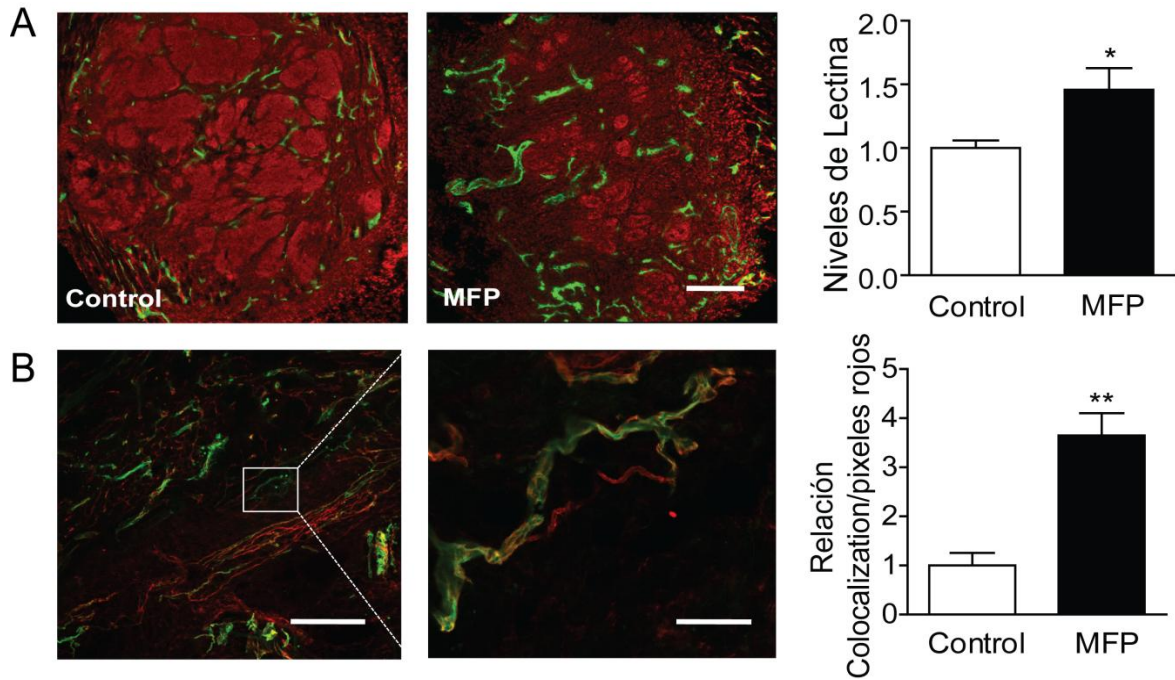


Fig. 3.23. Evaluación de funcionalidad de vasos en tumores tratados con MFP. Se inyectó LT en forma endovenosa a ratones BALB/c portadores de tumores, tratados o no con MFP (10 mg/kg) durante 5 días. Los ratones se eutanasiaron a los 7 minutos y los tumores se procesaron para estudios de IF. Los núcleos se marcaron con IP (rojo). Se observó un incremento de LT fluorescente (verde) en los tumores tratados con MFP; barra: 300 μ m (A). También se observó un mayor grado de colocalización (amarillo) entre la marca de LT (verde) y CD-31 (rojo; anticuerpo secundario acoplado a *Dylight*) en los tumores tratados con MFP en comparación a los tumores control. Barra izq: 300 μ m; barra der: 50 μ m (B).

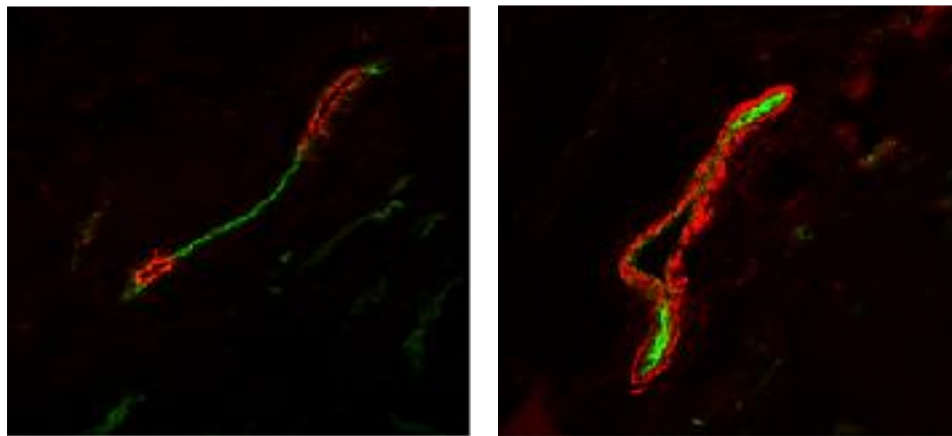


Fig. 3.24. Expresión de Von Willebrand y SMA en tumores tratados con MFP. Izq. Se realizó una marcación de von Willebrand (marcador de células endoteliales) utilizando un anticuerpo secundario acoplado a *Dylight* (rojo) en las muestras del experimento anterior en los cuales los ratones se inyectaron con LT (verde). Estos resultados corroboraron los experimentos de colocalización obtenidos con CD-31. Der. Se realizó la IF utilizando un anticuerpo anti α SMA (marcador de pericitos), en cortes del mismo tejido. En este caso sólo se observó marca de α SMA en los vasos de la periferia de los tumores.

En resumen este conjunto de experimentos nos permite observar que MFP durante el proceso de regresión en los tumores de tipo RPA>RPB induce un incremento de vasos sanguíneos inmaduros con un buen grado de funcionalidad que potencialmente pueden facilitar el ingreso de una segunda droga de efecto quimioterápico.

Cuantificación del influjo de sangre dentro de los tumores tratados con MFP

Para determinar si el incremento de vasos sanguíneos observado podía estar asociado a un incremento en la concentración intratumoral de las nanopartículas y acumulación de la droga, se midió el nivel de influjo en los tumores tratados o no con MFP utilizando distintos abordajes.

Teniendo en cuenta que disponemos de ratones BALB/c-GFP postulamos que los GR fluorescentes de estos ratones podrían utilizarse para evaluar si la concentración de los mismos aumentaba en los tumores tratados con MFP al inocularse a ratones portadores de tumor. Los GR-GFP se inyectaron en forma endovenosa a ratones portadores de tumores 59-2-HI, que previamente ya habían sido tratados o no con MFP. Posteriormente con citometría de flujo se evaluó la presencia de los GR-GFP dentro de los tumores (Fig. 3.25.A) y se observó que existía también un incremento en la cantidad de GR-GFP con respecto a los tumores control (Fig. 3.25.B), indicando este resultado que es mayor el influjo de sangre dentro de los tumores tratados con MFP que en los tumores control.

En este caso el bazo fue el órgano que sirvió como control negativo, no mostró diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 3.21.C).

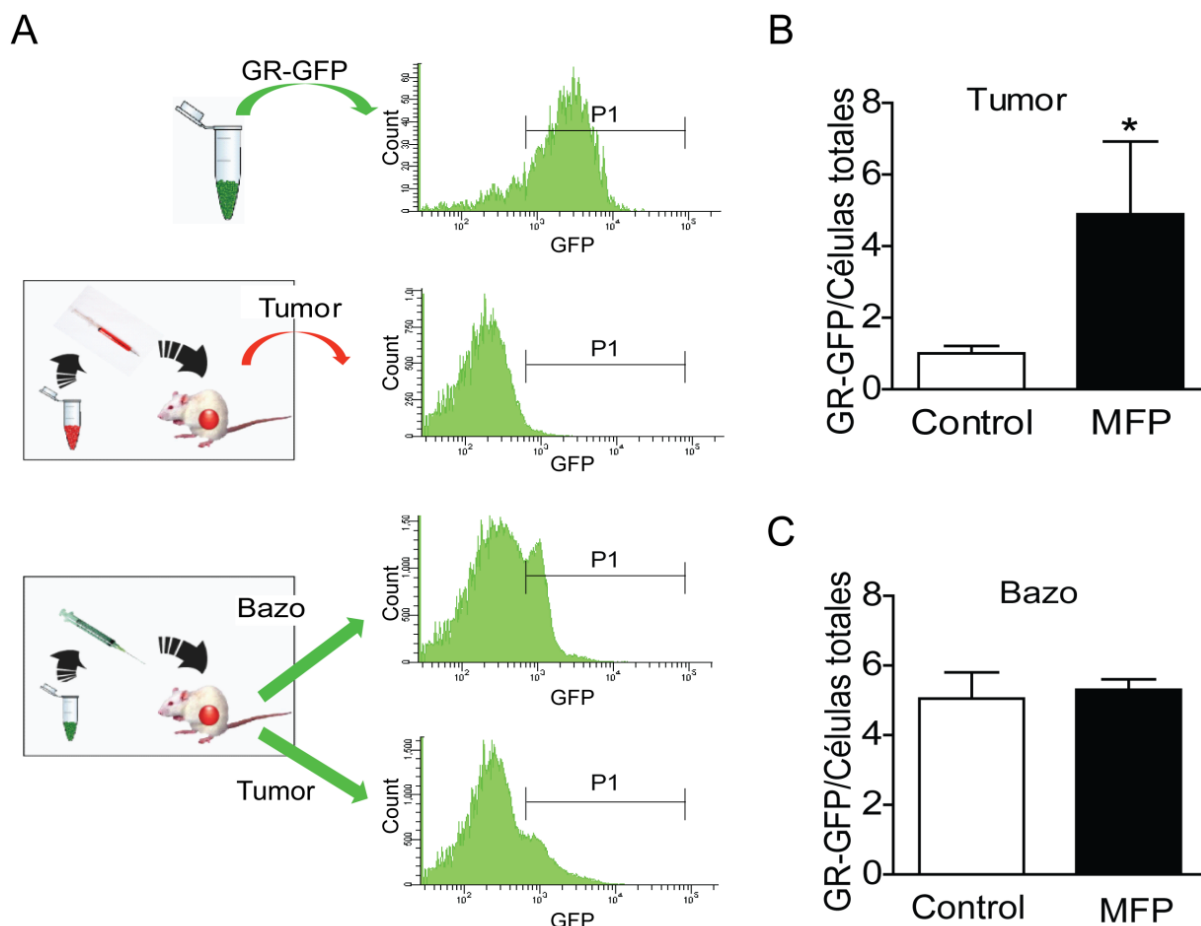


Fig. 3.25. Análisis de citometría de flujo de GR-GFP. A. Los GR-GFP se aislaron como se describió en *Materiales y Métodos* y se inocularon en forma endovenosa en ratones portadores de tumores 59-2-HI tratados o no con MFP. Los animales se eutanasiaron a las 72 hs. Se muestran los histogramas de distribución de células en función de la intensidad de fluorescencia de GFP de una suspensión enriquecida en eritrocitos extraída de ratones BALB/c-GFP (control positivo), de una suspensión de eritrocitos extraída de un ratón BALB/c (control negativo) y de las suspensiones celulares de tumor y bazo de ratones BALB/c inyectados previamente con eritrocitos GFP+. Se observa el rango (*gate P1*) de positividad para considerar a un evento como GFP+. **B.** Cuantificación de GR-GFP+/células totales de suspensiones celulares de tumores o bazos de ratones controles o tratados con MFP. Se observa una diferencia significativa en cuanto a la acumulación de GR-GFP en los tumores tratados previamente con MFP con respecto a los controles. No se observaron diferencias en los bazos de ratones tratados o no con MFP. *: $p < 0.05$. Las frecuencias cuantificadas corresponden al número de eventos GR-GFP dentro del *gate* de eritrocitos del dot plot de FAC-A vs. el SSC-A.

Cuantificación de los niveles intratumorales de quimioterápicos

Por último se realizaron estudios para evaluar la acumulación de las drogas en el ambiente tumoral.

PEG-DL

Aprovechando la capacidad de emitir autofluorescencia en rojo de la DOX y la posibilidad de usar ratones BALB/c-GFP para visualizar los tejidos del huésped, se evaluó la intensidad de la fluorescencia como medida indirecta de la concentración de DOX intratumoral. Se transplantaron tumores 59-2-HI en ratones BALB/c-GFP y se trataron como se describió en *Materiales y Métodos*. Como se muestra en la Fig. 3.26.A, se observó una tinción de color rojo en el núcleo de las células estromales (células verdes) y en las células tumorales adyacentes a éstas. La cantidad de DOX fue mayor en los tumores que previamente habían recibido un tratamiento con MFP. No se observó el mismo efecto en los tumores C4-2-HI tratados de la misma manera (Fig. 3.26.B).

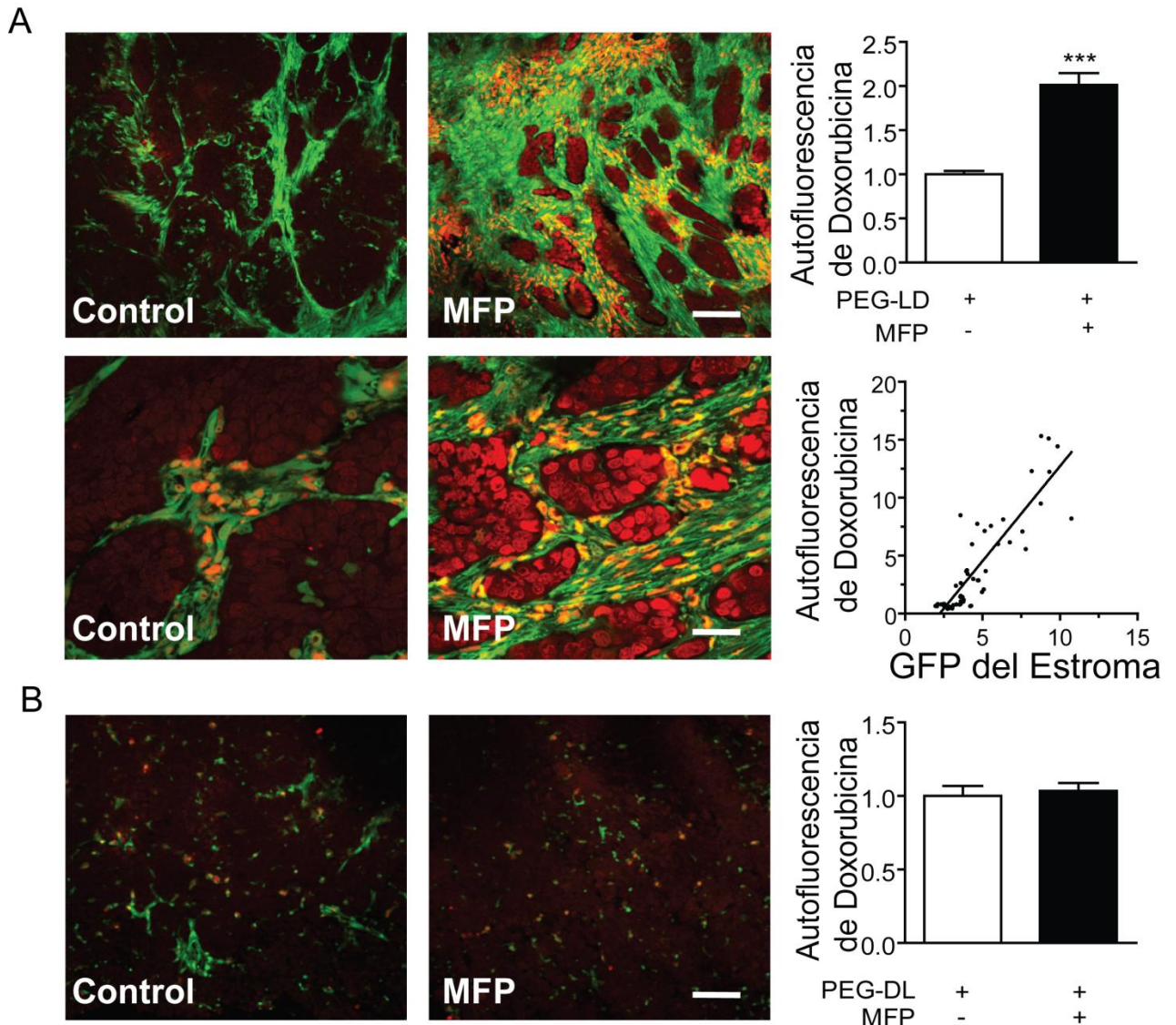


Fig. 3.26. MFP incrementa la acumulación de PEG-DL en los tumores con niveles de RPA>RPB. **A.** Tumores 59-2-HI creciendo en ratones BALB/c-GFP se trataron o no con MFP (10 mg/kg). A los 5 días se inyectó una dosis única de PEG-DL (18 mg/kg). A las 24 hs se eutanasiaron los ratones y los tumores se procesaron para ser observados con microscopía confocal. El rojo y el anaranjado que se observan en las fotografías corresponden a la autofluorescencia de la DOX acumulada tanto en el núcleo de las células estromales (naranja) como en el de las células tumorales que se encuentran en la vecindad de las células estromales. Barra superior: 120 μ m, barra inferior: 30 μ m. **B.** Tumor C4-2-HI procesado de la misma manera que los tumores 59-2-HI, sin embargo no se observaron diferencias en las cantidades de DOX entre tumores tratados o no con MFP; barra: 120 μ m.

Nab-paclitaxel

Utilizando el mismo protocolo de administración de MFP pero en este caso en ratones inmunosuprimidos, evaluamos la acumulación de PAX en los tumores de una forma indirecta, haciendo uso de un anticuerpo policlonal anti-albúmina humana que nos permite visualizar la albúmina que está unida al PAX.

Un incremento en la marca de albúmina humana se observó en los tumores que previamente habían sido tratados con MFP con respecto a los controles (Fig. 3.27). No se observó marca en los controles negativos incubados sin anticuerpo primario.

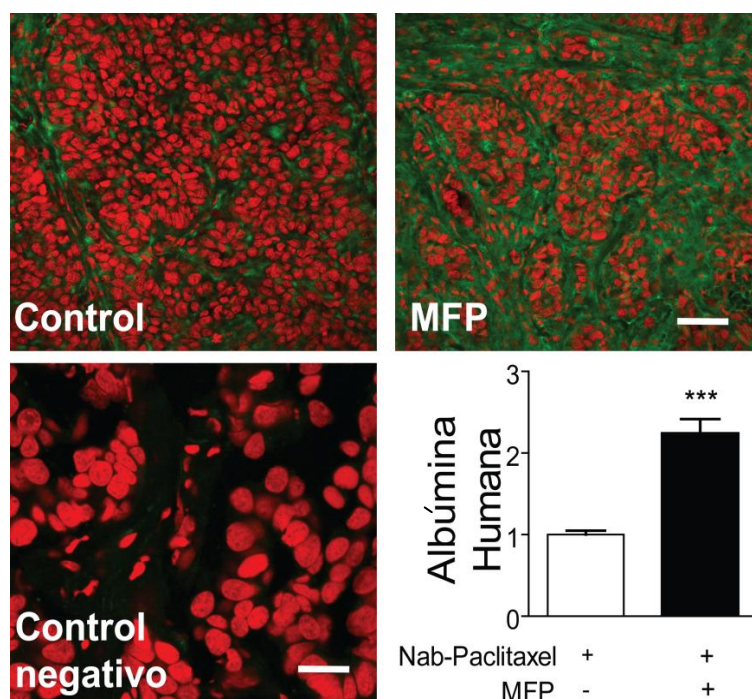


Fig. 3.27. Cuantificación de Nab-paclitaxel por IF. Se inocularon tumores 59-2-HI en ratones *nu/nu* y se trataron o no con MFP (10 mg/kg). A los 5 días se inyectó Nab-paclitaxel

(60 mg/Kg). A las 24 hs. los ratones se eutanasiaron y los tumores se procesaron para IF. Se utilizó un Ac. Anti-albúmina humana que se reveló con un Ac. secundario acoplado a FITC (verde). Los núcleos se contratiñeron con IP. No se observó marca en el control negativo (en el cual no se uso el Ac. primario o no se inyectó Nab-paclitaxel); barra superior: 120 μ m; barra inferior: 40 μ m. ***: $p < 0.001$.

En resumen estos resultados demuestran claramente el aumento de concentración de nanoquimioterápicos en los tumores con niveles de RPA > RPB tratados con MFP explicando así la mayor eficacia terapéutica observada de los tratamientos combinados en estos tumores.

El efecto inducido por MFP puede ser producido por otras drogas que aumenten la remodelación tisular

El efecto de MFP, de aumentar la eficacia terapéutica de PEG-LD y Nab-paclitaxel se reproduce con el tratamiento con E₂

Con el fin de evaluar si el efecto observado previamente era un efecto específico inducido por la MFP, o podría ser causado por otros agentes capaces de inducir la regresión tumoral, nos planteamos evaluar si el tratamiento con E₂ era capaz de aumentar la eficacia del PEG-LD. En experimentos previos del laboratorio se había demostrado que los estrógenos tienen un efecto similar a los antiprogestágenos en los tumores con niveles de RPA mayor que RPB (Kordon et al. 1991; Soldati et al. 2010; Vanzulli et al. 2005). Se realizaron experimentos *in vivo* de tratamientos combinados con E₂ y PEG-DL. Las terapias combinadas mostraron una mayor eficacia que las monoterapias sólo en los tumores con mayores niveles de RPA que de RPB (Fig. 3.28).

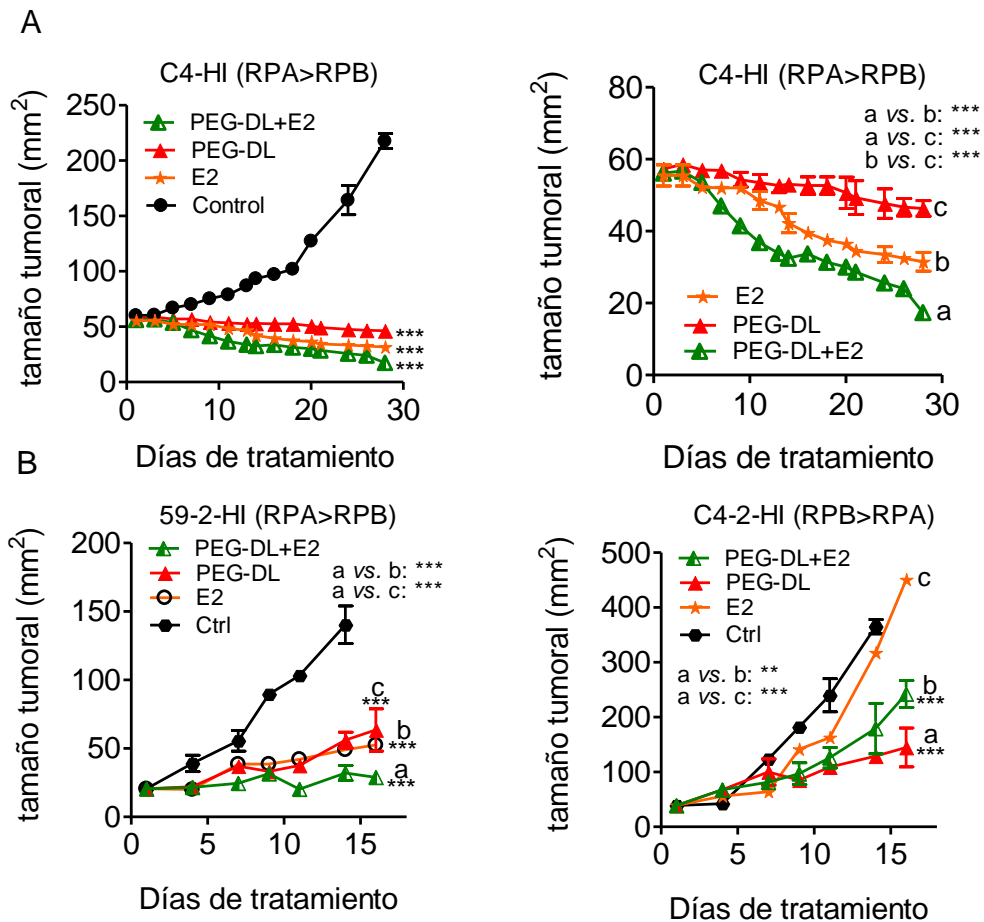


Fig. 3.28. E₂ también aumenta la eficacia terapéutica de PEG-DL. A. Curvas del tumor C4-HI tratados con 9 mg/kg de PEG-DL y pellets de E₂ de 0,5 mg. **B.** Curvas de crecimiento de tumores tratados con pellet de 0,5 mg E₂ y/o 0,9 mg/kg de PEG-LD. Los tumores C4-HI y 59-2-HI con niveles de RPA>RPB mostraron una mayor efectividad de los tratamientos combinados con respecto a las monoterapias. En el tumor C4-2-HI con expresión de RPB>RPA la terapia combinada no mostró mayor eficacia que las monoterapias. *: p<0.05; **: p<0.01 y ***: p<0.001.

Estos resultados apoyan la hipótesis que sostiene que la remodelación tisular que provoca un aumento de vasculatura es responsable de aumentar la acumulación de la droga en el tumor y sugiere que en cada tumor habría que diseñar la estrategia terapéutica teniendo en cuenta estos conceptos.

Efecto de DOX *in vitro* sobre células T47D, T47D-YA O -YB

Efecto de DOX en la proliferación y la apoptosis de las células T47D WT, T47D-YA y T47D-YB

Teniendo en cuenta los resultados anteriores que sugieren un efecto diferencial de DOX y PAX sobre células murinas con mayor expresión de RPA o RPB se abordó el estudio de DOX sobre las células humanas T47D y sus variantes. Se sembraron células T47D WT, T47D-YA y T47D-YB como se describe en *Materiales y Métodos* y se trataron durante 48 hs con concentraciones crecientes de DOX. Posteriormente se cosecharon y prepararon para el recuento por citometría de flujo.

En la Fig. 3.29. se observan las curvas ajustadas para cada línea celular graficando en el eje de la ordenada un porcentaje de inhibición. Las células T47D mostraron ser extremadamente sensibles a la DOX. La línea T47D-YA requirió mayor concentración de DOX para inducir una respuesta similar, pero ambas líneas alcanzaron su nivel máximo de respuesta inhibitoria observándose en el recuento de células un 75% menos que en los controles. En el caso de las T47-YB fue de un 50%, lo que nos indica que esta línea celular resulta menos sensible a esta droga.

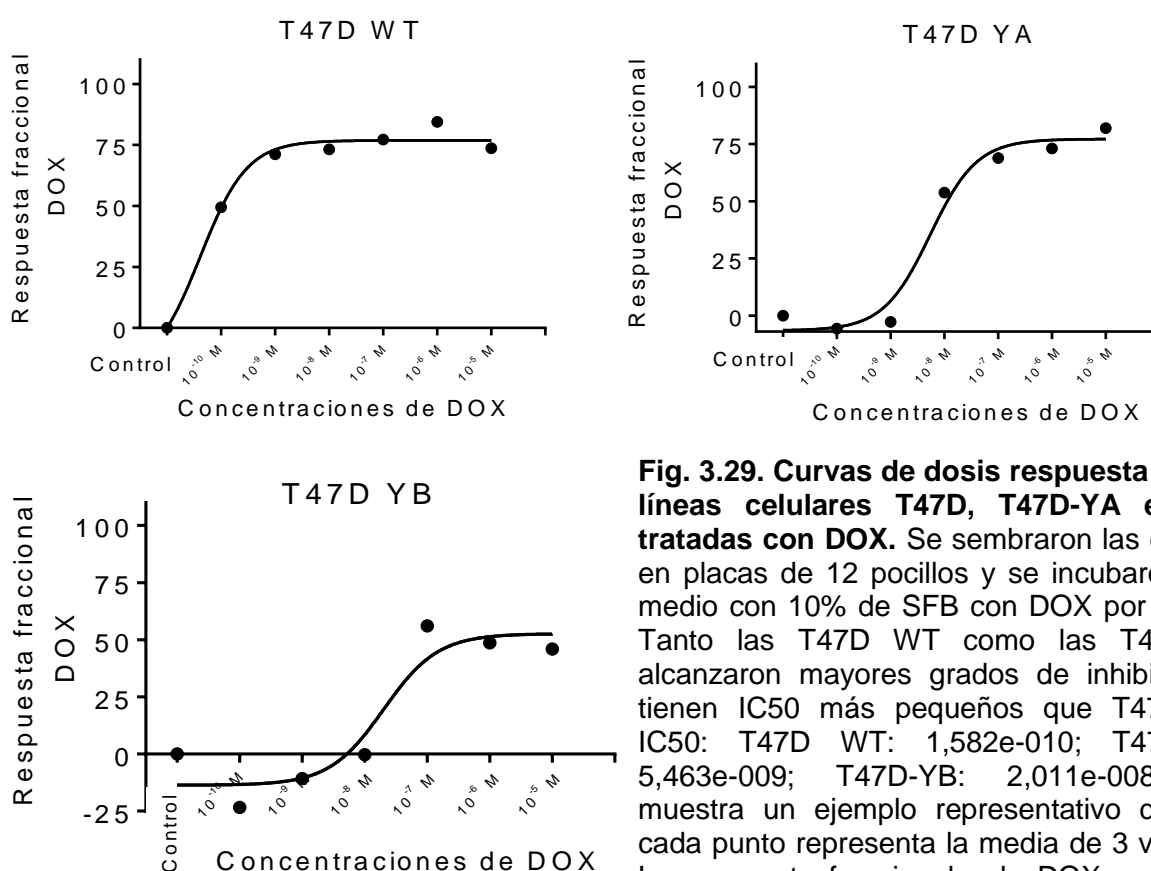


Fig. 3.29. Curvas de dosis respuesta en las líneas celulares T47D, T47D-YA e -YB tratadas con DOX. Se sembraron las células en placas de 12 pocillos y se incubaron con medio con 10% de SFB con DOX por 48 hs. Tanto las T47D WT como las T47D-YA alcanzaron mayores grados de inhibición y tienen IC50 más pequeños que T47D-YB. IC50: T47D WT: 1,582e-010; T47D-YA: 5,463e-009; T47D-YB: 2,011e-008. Se muestra un ejemplo representativo de 2 y cada punto representa la media de 3 valores. La respuesta fraccional a la DOX se define como la reducción porcentual de las células en cada tratamiento con respecto al control.

Los resultados de recuentos celulares realizados por citometría se confirmaron mediante recuentos en cámara de Neubauer obteniéndose resultados similares (no mostrados).

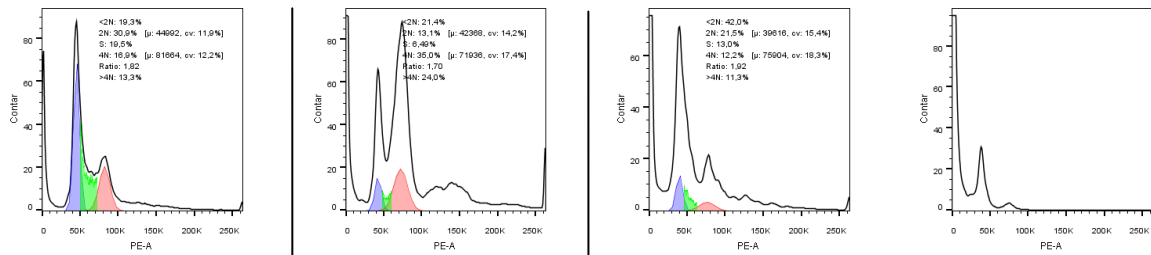
Estudios del efecto de DOX en el ciclo celular de las células T47D WT, T47D-YA y T47D-YB

De forma paralela al recuento de células por citometría se realizó la determinación de la distribución de las células en cada una de las fases del ciclo celular en las distintas concentraciones de DOX utilizadas anteriormente.

La delimitación entre cada una de las fases se realizó de forma automática como se describió en *Materiales y Métodos*, y se distinguieron 4 sub-poblaciones: Sub-G1 con cantidades de ADN menores a las diploides (apoptosis), G1, S, G2/M (células en G2 y mitosis) y supra-G1 (células poliploides).

Las tres líneas celulares mostraron un comportamiento distinto cuando se incubaron con DOX. T47D WT se caracterizó por presentar un arresto en G2/M en las concentraciones que oscilan entre 10^{-7} y 10^{-9} M de DOX. T47D-YA presentó un arresto moderado de G2/M a las concentraciones de 10^{-7} a 10^{-8} M, aunque lo más destacable es la gran proporción de células en Sub-G1. T47D-YB, además de presentar los niveles de Sub-G1 crecientes hacia las concentraciones de 10^{-5} y 10^{-6} M, muestran una proporción incrementada de células poliploides en las concentraciones que oscilan entre 10^{-6} M y 10^{-8} M. En la Fig. 3.30 se muestra un ejemplo de los resultados de citometría y como el software realiza el reconocimiento de cada una de las fases del ciclo celular. En la Figura 3.31 se muestran las cuantificaciones de las mismas.

T47D-YA



T47D-YB

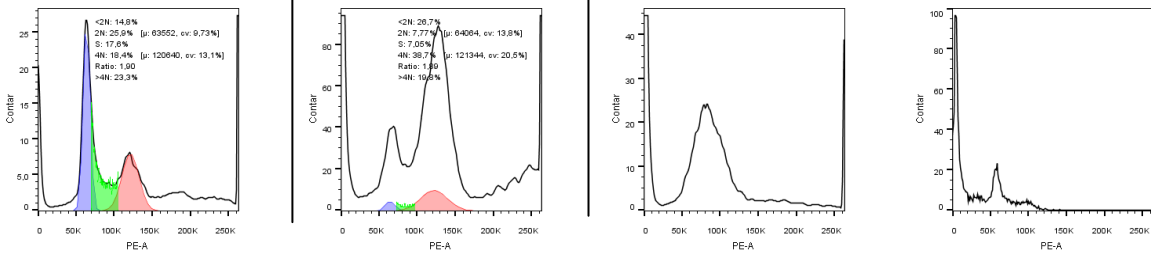


Fig.3.30. Gráficos de ciclo celular de las líneas T47D-YA e -YB a distintas concentraciones de doxorubicina. Ejemplos de cómo doxorubicina es capaz de afectar la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular. El primero de los recuadros corresponde al control de cada una de las líneas celulares. Cuando las concentraciones se van incrementando existen modificaciones como la que se observa en la segunda fila de recuadros en donde existe un claro arresto en G2/M. A concentraciones aun mayores las fases del ciclo celular pueden volverse irreconocibles gráficos de la derecha.

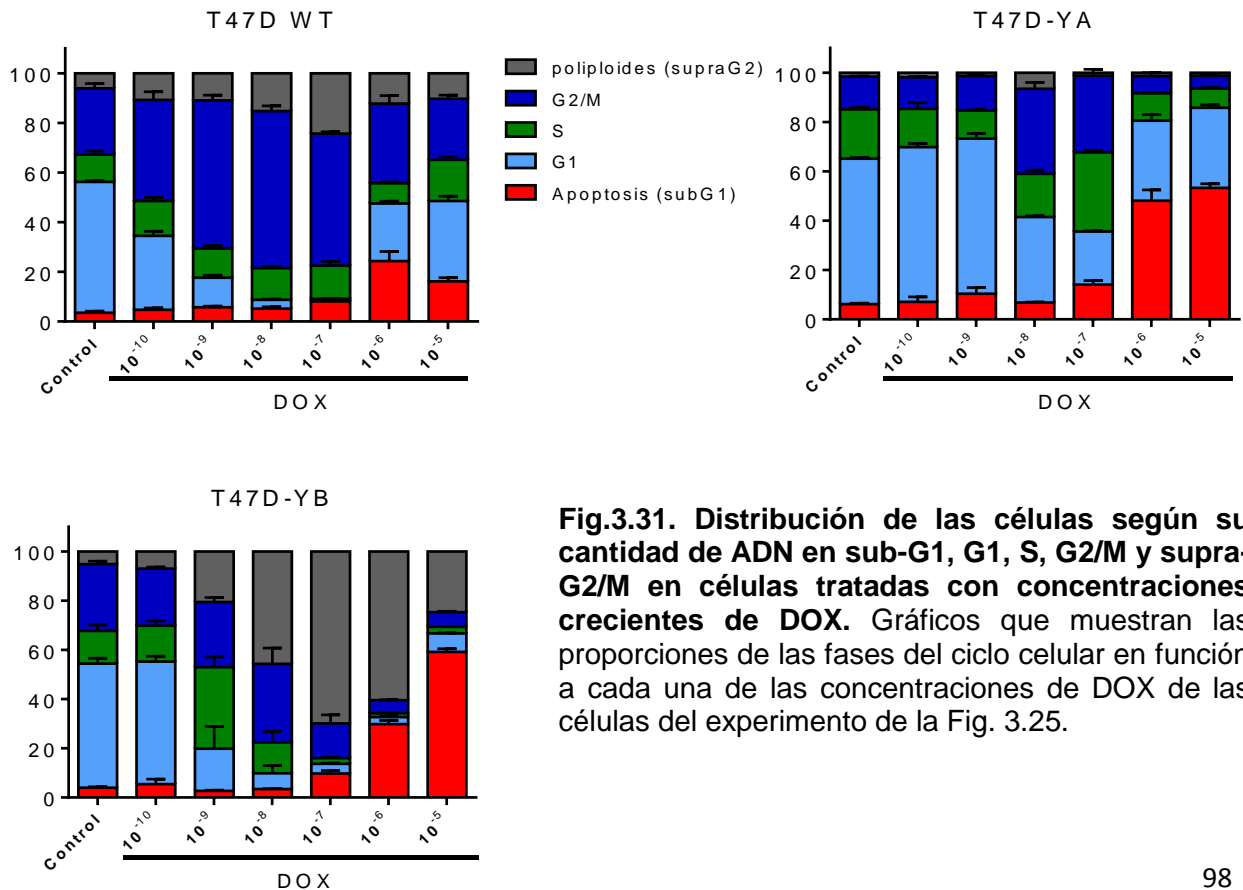


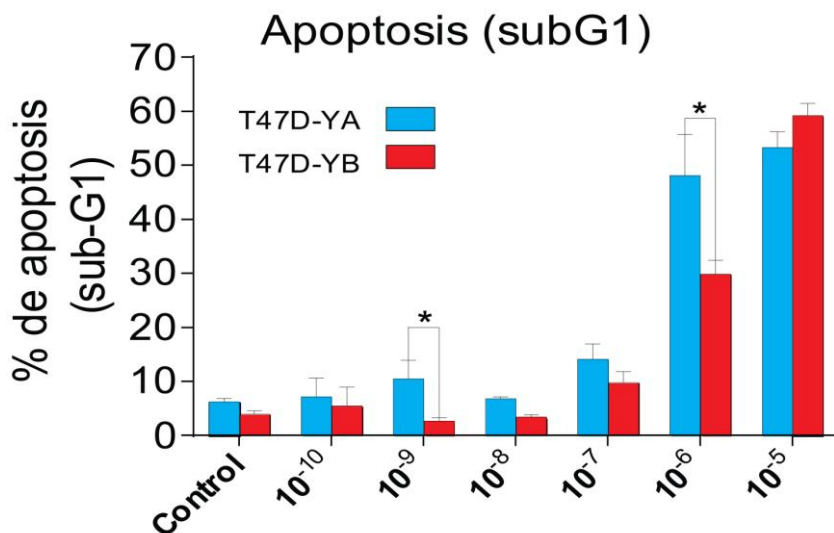
Fig.3.31. Distribución de las células según su cantidad de ADN en sub-G1, G1, S, G2/M y supra-G2/M en células tratadas con concentraciones crecientes de DOX. Gráficos que muestran las proporciones de las fases del ciclo celular en función a cada una de las concentraciones de DOX de las células del experimento de la Fig. 3.25.

Si consideramos sólo la comparación entre la línea T47D-YA e -YB a nivel de apoptosis y de poliploidía podemos notar más claramente las diferencias entre ambas líneas.

Así como en la Fig. 3.29 se observó que la línea celular T47D-YA es más sensible a la DOX que la T47D-YB, si observamos el número de células en apoptosis graficadas en la Fig. 3.32, se observa que a la concentraciones de 10^{-9} y 10^{-6} M, las células T47D-YA mostraron mayor número de células apoptóticas que las células T47D-YB ($p < 0.05$)

Por otro lado, si consideramos el gráfico de porcentajes de células poliploides podemos notar que T47D-YB presenta significativamente mayores niveles de células poliploides que T47D-YA con el tratamiento de distintas concentraciones de DOX.

A



B

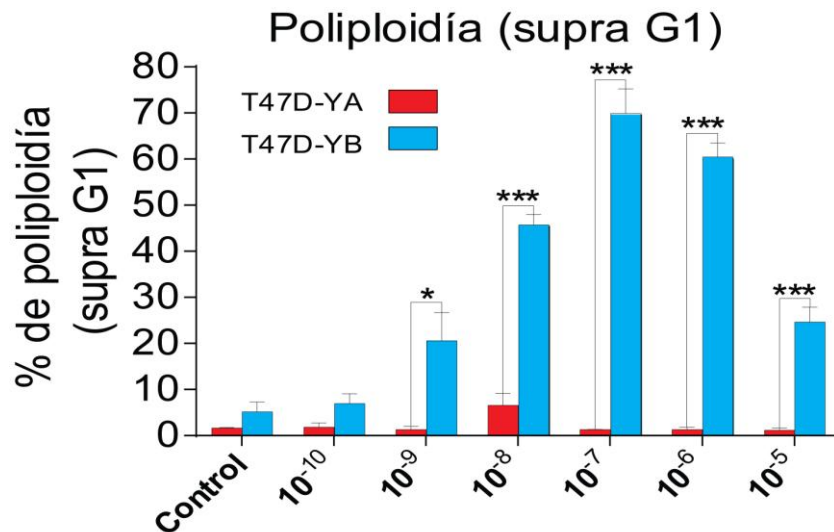


Fig. 3.32. Porcentajes de apoptosis y de poliploidía en células T47D-YA e -YB tratadas con DOX. Estos gráficos muestran de forma comparativa los porcentajes de apoptosis y de poliploidía entre las líneas T47D-YA y T47D-YB. Se construyeron con los datos de la Fig. 3.25; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$.

Estos resultados muestran que la línea T47D es altamente sensible a la DOX y que la línea T47D-YA muestra una mayor sensibilidad que la T47D-YB en concordancia a los resultados observados in vivo.

Efecto de DOX y MFP *in vitro* sobre cultivos tisulares de cáncer de mama humano

Estudios preliminares realizados en cultivos tisulares de carcinomas mamarios con expresión diferencial de isoformas de RP

Como se mencionó anteriormente estamos realizando un estudio con muestras de cáncer de mama humano en las cuales evaluamos la proporción de isoformas de RP por un lado, y la respuesta a la MFP por otro. En los casos en que fue posible porque las muestras tenían un tamaño suficiente, se añadieron los grupos experimentales DOX y DOX+MFP a los grupos Control y MFP de los cultivos tisulares. El objetivo era por un lado, poner a punto los ensayos para diseñar un posterior estudio preclínico cuyo objetivo es determinar si los pacientes con mayores niveles de RPA que RPB son más sensibles a PEG-LD que a Nab-paclitaxel e inversamente determinar si los pacientes con mayores niveles de RPB que RPA son más sensibles al Nab-paclitaxel que a PEG-LD (tema de la beca postdoctoral).

Las muestras se procesan como se describió en *Materiales y Métodos* y luego del cálculo del índice de Ki-67 evaluado por IHQ se los correlaciona con su relación de isoformas de RP determinada por WB (estudio en curso no finalizado).

Si bien ya se ha evaluado la respuesta a MFP en más de 40 muestras, hasta el momento se ha evaluado la respuesta a DOX o DOX + MFP sólo en 4 muestras, 2

con una relación RPA>RPB y 2 con una relación RPB>RPA. Se observó que en las muestras con mayor proporción de RPA que de RPB determinada por *Western blot*, MFP y DOXO ejercieron un efecto inhibitorio similar. Los tratamientos combinados no mostraron mayor eficacia que las monodrogas (Fig. 3.33). Las significancia estadísticas que se muestran en estos casos particulares son de control vs. tratamiento, ya que al realizar el estudio para muestras múltiples la variancia global opaca el efecto inhibitorio observado con DOX dado que el número de recuentos en este grupo es menor que en el grupo de MFP.

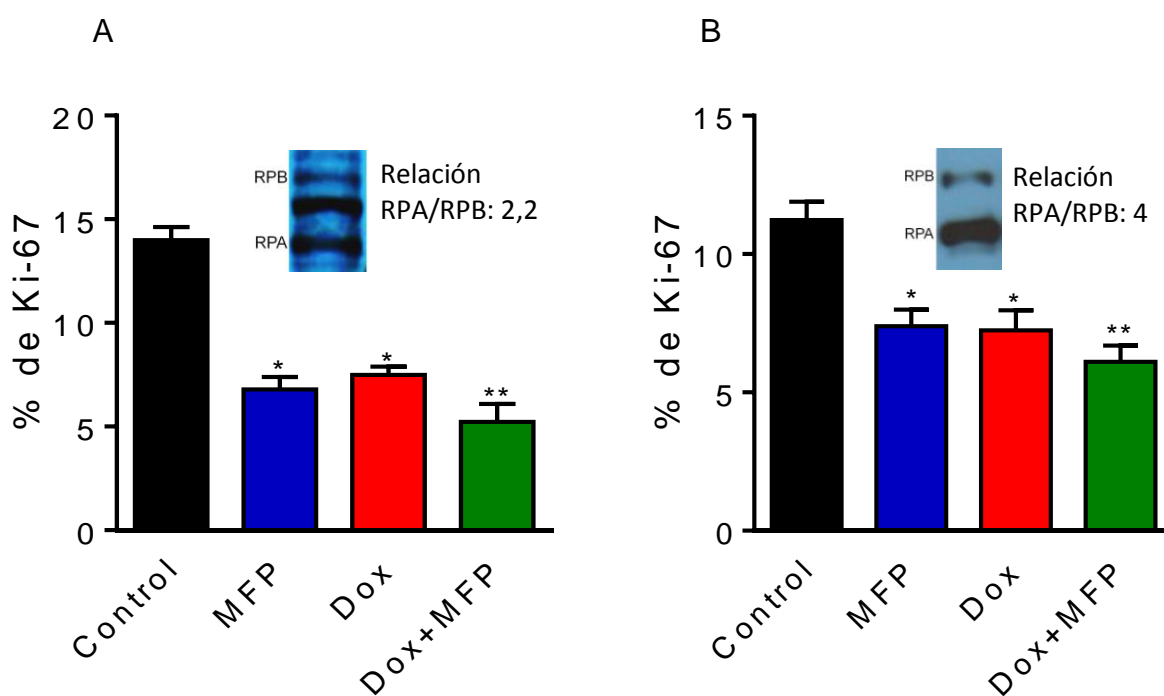


Fig. 3.33. Índice de proliferación expresado como porcentaje de células Ki67+ en función de las células viables totales en los cultivos tisulares de biopsias humanas con altos niveles de RP-A. Cortes de 100 μ m de tejido fresco de muestras de cáncer de mama de pacientes (al menos 4 cortes por grupo) se incubaron a 37°C por 48 hs en medio de cultivo con 10% de SFB en presencia de MFP (10 nM) y/o DOX (1 μ M). Luego se fijaron y procesaron para evaluar por IHQ la expresión de Ki-67. Se contaron las células Ki-67 + y las células viables totales de cada corte. En ambas muestras (A; 323 y B: 328) se observó una disminución de la fracción proliferativa luego de incubar con MFP (10 nM) *: $p < 0.05$; o DOX (1 μ M) **: $p < 0.01$. Si bien el valor obtenido de Ki-67 es menor en los tratamientos combinados, no hay diferencias significativas con cada una de las monodrogas.

En el caso de las biopsias con mayor proporción de RPB que RPA, se observa claramente que el tratamiento con MFP (10 nM) no modificó el porcentaje de células proliferativas, más aun en una de ellas, la 319, se observó un aumento significativo

de la expresión de este marcador en los cortes tratados con MFP (Fig. 3.34). Una de ellas fue resistente al tratamiento con DOX (307) mientras que la otra (319) se inhibió, sin embargo, el tratamiento combinado no mejoró la eficacia de las monodrogas como era esperable.

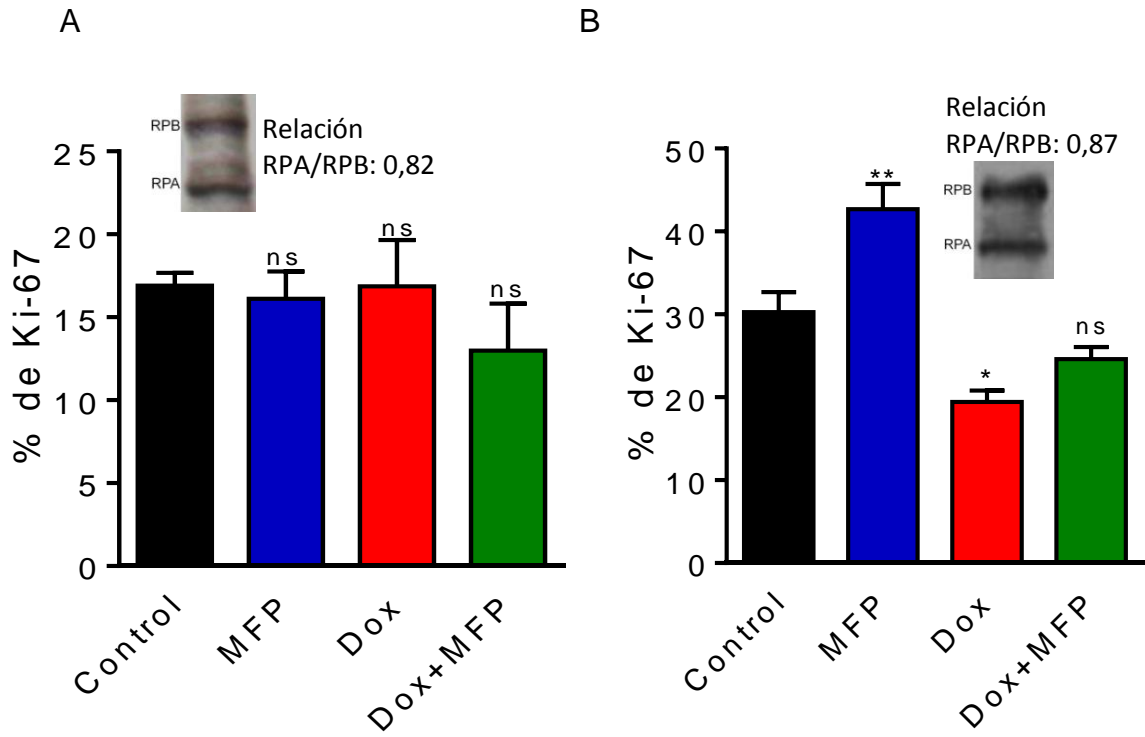


Fig. 3.34. Índice de proliferación evaluado por expresión de Ki-67 en las biopsias humanas con niveles de RPB>RPA tratadas con MFP y/o DOX. Cortes de 100 μ m de tejido fresco de muestras de cáncer de mama de pacientes (al menos 4 cortes por grupo) se incubaron a 37° C por 48 hs en medio de cultivo con 10% de SFB en presencia de MFP (10 nM) y/o DOX (1 μ M). Luego se fijaron y procesaron para evaluar por IHQ la expresión de Ki-67. Se contaron las células Ki-67 + y las células viables totales de cada corte. En la muestra 307 (A) no se observaron cambios significativos con los tratamientos mientras que en la 319 (B) se observó un aumento del índice de proliferación en los cortes tratados con MFP, y una disminución en el grupo tratados con DOX, no así en el grupo de tratamientos combinados. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$. Se muestran los Western blots ilustrando la expresión de isoformas de RP en las dos muestras evaluadas.

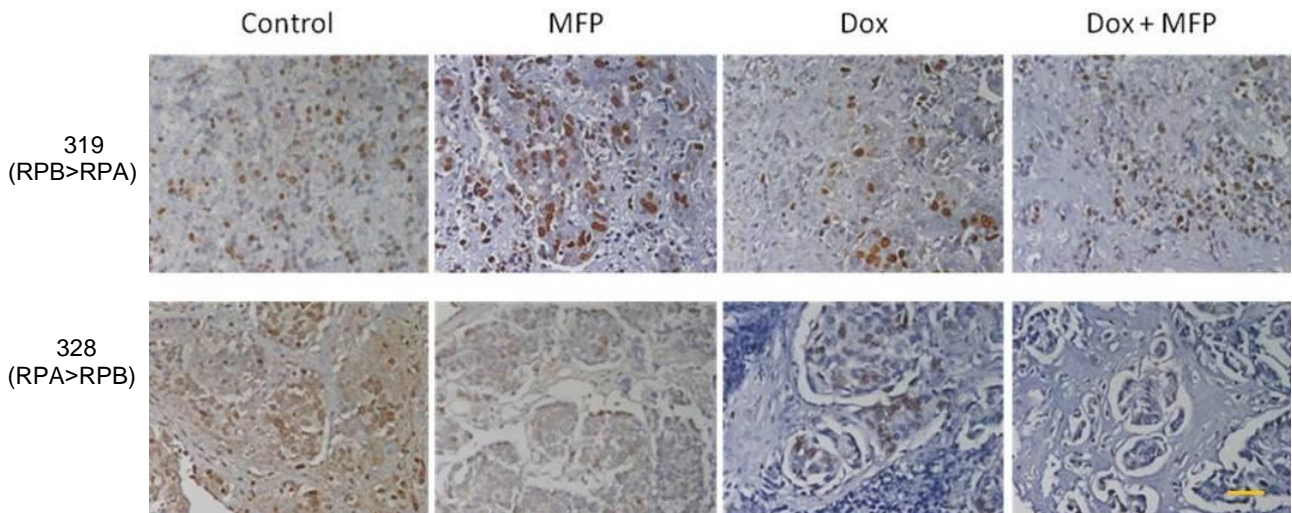


Fig. 3.35. Expresión de Ki-67 en cultivos tisulares de biopsias humanas con proporciones de RPA/RPB opuestas. IHQ de Ki-67. Se observan numerosos núcleos marcados en la muestra 319 control o tratados con MFP, mientras que en la muestra 323, sólo se ven numerosos núcleos marcados en la muestra control. En ambos casos los tratamientos con MFP + DOX son similares al tratamiento con DOX solo. Barra: 80 μ m

Un hecho interesante fue que la muestra 319 (RPB>RPA) tratada con DOX mostró cambios citológicos (macro núcleos) similares a los observados previamente en uno de los experimentos con tumores mamarios murinos, (ver Fig. 3.6). Estas imágenes sólo se vieron en los grupos tratados o con DOX o DOX + MFP (Fig. 3.36).

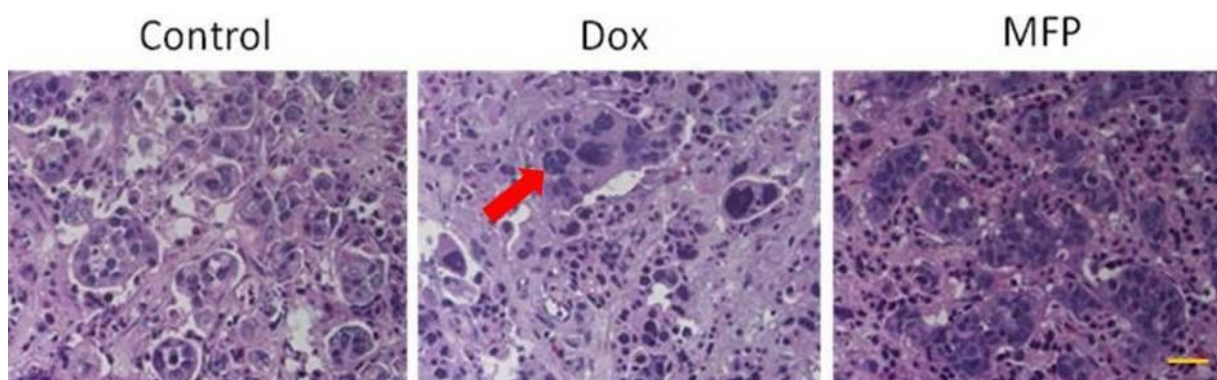


Fig. 3.36. Imágenes histológicas de cultivos tisulares de la muestra 319 incubada con DOX o MFP. Se observa la presencia de macro núcleos (flecha roja) sólo en los cortes incubados con DOX. Barra: 80 μ m.

La técnica de cultivo tisular puesta a punto en nuestro laboratorio no solo mostró ser efectiva para evaluar la respuesta proliferativa al antiprogestágeno, sino que también permite evaluar el efecto de quimioterápicos. Si bien el número de muestras es muy bajo para sacar conclusiones, es muy alentador observar por un lado, que las muestras RPA respondieron ambas a la DOX, no así las RPB. Por otra parte, el hecho de que no se observe en las muestras RPA un efecto aditivo in vitro con las terapias combinadas, refuerza los resultados de esta tesis que han demostrado en los modelos experimentales que los efectos aditivos observados se deben al aumento de concentración intratumoral de la droga debido al mayor acceso de la misma.

Discusión

En este trabajo demostramos que los tumores RP+ con distintas relaciones entre las isoformas A y B, tanto los del modelo de carcinomas inducidos con MPA (Lanari et al. 2009), como en los xenoinjertos generados a partir de las células T47D-YA e -YB, se comportaron como tumores sensibles a PEG-DL así como también a Nab-paclitaxel *in vivo*. Por otro lado, demostramos que la MFP aumenta la eficacia terapéutica de ambas drogas sólo en aquellos tumores con mayor expresión de RPA. Además los tumores que son antiprogestágeno resistentes (C4-2-HI, 59-HI y T47D-YB) se mostraron más sensibles a Nab-paclitaxel que a PEG-DL, mientras que los tumores respondedores a antiprogestágenos (C4-HI, 59-2-HI y T47D YA), resultaron ser en algunos casos más sensibles a PEG-DL, tal como se observó cuando se compararon las curvas de crecimiento tumoral y las imágenes histológicas a las mismas dosis utilizadas.

Las drogas quimioterapéuticas siguen siendo, a pesar de sus efectos secundarios, las elegidas en el tratamiento de diversos tumores, ya que su eficacia en comparación con otras drogas hace que el análisis costo-beneficio siga inclinándose hacia su uso. Por esta razón, cualquier mecanismo que aporte una mejora a la distribución específica hacia las células tumorales reduciendo su distribución a los tejidos normales es de gran valor. El Nab-paclitaxel se distribuye principalmente en las células tumorales por su gran capacidad para captar albúmina (Kratz 2008), mientras que PEG-DL aprovecha su mayor tiempo de circulación con respecto a la DOX libre y la mayor permeabilidad (fenestraciones) de los vasos tumorales anómalos (Anders et al. 2013). En este trabajo consideramos que MFP podría incrementar aún más el *delivery* específico de estas drogas quimioterapéuticas hacia el tejido tumoral en un subgrupo de pacientes, aquellos que expresan una mayor cantidad de RPA.

Para determinar el posible mecanismo involucrado en este fenómeno, analizamos algunas posibilidades. Se ha descrito que tanto MFP como la progesterona son capaces de unir las proteínas MDR y de esta forma facilitar el ingreso de las drogas quimioterapéuticas actuando como quimio sensibilizadores (Choi 2005; Dean et al. 2001). Aunque esta posibilidad resulta muy atractiva, se han observado regresiones completas con las monoterapias de ambas drogas quimioterapéuticas, lo cual estaría indicando que en estos casos la resistencia a multidrogas no parece ser el mecanismo prevalente (Fig. 2A), ya que el hecho de encontrar regresiones completas, aun utilizando concentraciones de droga que no

inducen toxicidad aparente, no es compatible con la presencia de MDRs activas. Por otra parte las concentraciones de MFP que utilizamos *in vitro* para inhibir la proliferación celular (10^{-8} M), son compatibles con mecanismos mediados por receptores hormonales (Lanari et al. 2012) mientras que para inhibir a las MDRs se requieren concentraciones mucho más altas del orden de 10^{-5} M (D. J. Gruol et al. 1994).

Por esta razón es que nos enfocamos en el estudio de la remodelación estromal como actor principal en este fenómeno de acumulación de drogas quimioterapéuticas.

Es interesante destacar que en este modelo experimental los estrógenos inducen un efecto similar a la MFP (Kordon et al. 1991). Este efecto no es exclusivo del modelo ya que se ha observado previamente que carcinomas mamarios humanos respondían favorablemente al tratamiento con dietilstilbestrol. Este tratamiento fue reemplazado por TX por los menores efectos colaterales en comparación con los estrógenos. También se han logrado modelos experimentales con sobreexpresión de PKC α en los cuales los estrógenos son inhibitorios del crecimiento tumoral (Jordan 2014a; Jordan 2014b). Los tumores que regresionan con estrógenos también experimentan una gran remodelación tisular con la administración de E₂ (Soldati et al. 2010). Los experimentos en los cuales también se observa un aumento de la eficacia terapéutica con la administración de PEG-DL y E₂ fueron claves para demostrar que los efectos observados apuntan a mecanismos más generales que a una interacción específica a nivel de vías de señalización.

En la tesis doctoral de la Dra. ML. Polo presentada en 2014 (trabajo enviado para su publicación) se demostró que el efecto de MFP se inicia tempranamente en las células tumorales y que la reacción estromal sería una consecuencia de la muerte del parénquima tumoral. Podemos especular entonces, que factores secretados por el epitelio en regresión conducirían a la expansión y al reemplazo del tejido tumoral por tejido estromal. Se postuló que la progresión de dicho fenómeno presentaría muchas similitudes con el proceso de cicatrización de cierre de heridas, o *wound healing*. En la cicatrización que se puede iniciar cuando células epiteliales o endoteliales son dañadas, se liberan mediadores inflamatorios que inician la cascada de coagulación que culmina con la formación de una matriz extracelular provisional (Wynn 2008). Paralelamente ocurre una liberación de metaloproteasas (MMPs) por parte del epitelio y del endotelio dañado que degrada la matriz

extracelular, permitiendo el acceso de las células del sistema inmune a la zona de la herida. Se ha demostrado que en este modelo experimental durante la regresión tumoral aumenta la expresión y actividad de MMP-2 y 9 (Simian et al. 2006), así como también se ha observado en un *array* molecular realizado recientemente en el marco de la tesis doctoral de la Dra. Polo, un aumento de expresión de las MMP-8, 11 y 14.

Utilizando marcadores endoteliales encontramos un incremento en la cantidad de vasos en los tumores sensibles a antiprogéstágenos tratados con MFP. En un principio este resultado nos pareció contra intuitivo debido a que esperábamos encontrar una reducción en el número de vasos asociada la regresión tumoral. Sin embargo, en base a esto, hipotetizamos que de esta manera podría favorecerse la acumulación de quimioterápicos. Este aumento en la vasculatura podía ser debido a la analogía del proceso de regresión tumoral con el ya mencionado de cicatrización de heridas, donde es necesaria una nueva red de vasos sanguíneos para la concurrencia de distintos tipos celulares que reparan la injuria histológica. También podría ocurrir que la marcación de CD-31 observada correspondiera a esbozos de vasos sanguíneos, por lo cual decidimos evaluar la funcionalidad de estos vasos tumorales valiéndonos de distintas técnicas. Optamos por usar LT que requiere ser transportada por el interior de los vasos tiñendo solamente aquellos que son funcionales (Morikawa et al. 2002). Luego, la comarcación entre CD-31 que marca todos los vasos, incluyendo los funcionales y no funcionales, con la tinción de LT, nos permitió evaluar qué proporción de los vasos totales eran funcionales (LT/CD-31). Determinamos que la relación LT/CD-31 fue mayor en los tumores tratados con MFP, sugiriendo que los vasos intratumorales probablemente estén interrumpidos o desconectados del sistema principal de la red vascular del tumor, mientras que los tumores tratados con MFP presentarían vasos nuevos con una mayor capacidad de transporte.

Posteriormente para corroborar si es que este tipo de cambios lograba generar distintos niveles de influjo dentro de los tumores utilizamos GR-GFP. Se eligieron GR porque nos pareció el tipo celular más adecuado para esta medición ya que no presentan movimientos activos a diferencia de los leucocitos, y por lo tanto la mayor acumulación en un tumor que en otro, sería consecuencia sólo del sistema vascular propio del tumor. La ventaja de que estuvieran marcados con GFP en forma endógena evitaba el uso de técnicas adicionales con anticuerpos marcados. En

resumen esta técnica nos permitió corroborar los estudios anteriores y ratificar que MFP induce un aumento de vasos funcionales que pueden ser utilizados para incrementar la acumulación de una segunda droga.

Existen en la literatura ejemplos de drogas que fueron propuestas como modificadores del microambiente tumoral y que facilitan el ingreso de otras, como por ejemplo la hialuronidasa que incrementa el acceso de doxorubicina en xenotransplantes de osteosarcomas (Eikenes et al. 2005) o el Losartan, que es un inhibidor del receptor de angiotensina que inhibe la síntesis de colágeno tipo I en tumores desmoplásicos (Diop-Frimpong et al. 2011). El Losartan fue probado con dosis de PEG-DL de 4 mg/kg que son dosis sub-óptimas para el tratamiento de este osteosarcoma y son aproximadamente 4 veces más elevadas que las dosis usadas en nuestros ensayos.

Los estudios preliminares utilizando los cultivos tisulares de muestras derivadas de biopsias humanas de tipo RPA<RPB mostraron que estos tumores no se inhibieron con MFP y no mostraron una diferencia significativa entre los tratamientos con monodroga (MFP o DOX) y los tratamientos combinados. De acuerdo a los resultados obtenidos en los modelos experimentales no esperábamos encontrar estas diferencias, al menos al incubar con DOX. Teníamos presente que incluso podríamos encontrarnos con un tumor resistente a las antraciclinas. Y que un efecto de inhibición de las bombas MDRs no habría podido tener lugar a las concentraciones de 10^{-8} M a la cual se utilizó MFP (D. Gruol et al. 1994). Se tuvo el cuidado de utilizar sólo concentraciones de MFP compatibles con un efecto mediado por receptores hormonales.

Los tumores humanos RPA>RPB no sólo se inhibieron con el tratamiento con MFP, lo cual ya lo comprobamos en trabajos previos realizados en el laboratorio, sino que también se mostraron sensibles al tratamiento con DOX. En estos casos el tratamiento combinado tampoco superó al tratamiento con monodrogas en forma significativa corroborando los resultados obtenidos en el modelo murino y en los xenoinjertos de T47D-YA.

Creemos que la sensibilidad alternativa a los tratamientos con antraciclinas o taxanos podrían ser analizados en sistemas *in vitro* con cultivos tisulares, ya que depende de características definidas por el RP a nivel celular (Moore et al. 2000; Badtke et al. 2012; Collie-Duguid et al. 2012). Si bien no realizamos todavía los experimentos con PAX, el escenario con esta droga podría ser diferente ya que

existen datos en la bibliografía que muestran una acción diferente de PAX en células aisladas RPA o RPB asociado a una capacidad intrínseca del RPA de unirse a microtúbulos (Badtke et al. 2012).

Las dosis de PEG-DL utilizadas en nuestros estudios oscilan desde los 18 mg/Kg equivalente a una dosis 54 mg/m^2 en humanos, a los 0.45 mg/kg que es equivalente a una dosis de 1.85 mg/m^2 en humanos. Para el tratamiento con PEG-DL en cáncer de mama la dosis de 50 mg/m^2 es la recomendada y es administrada mensualmente. En el caso de Nab-paclitaxel las dosis que se utilizaron en nuestras experiencias estuvieron en el rango entre 60 mg/kg y 15 mg/kg en los ratones lo cual es equivalente a 180 mg/m^2 y 45 mg/m^2 en humanos respectivamente. La máxima dosis que es posible alcanzar en la clínica con esta formulación es de 250 mg/m^2 (Gradishar et al. 2005), lo cual es equivalente a una dosis de 83 mg/kg en ratones (Reagan-Shaw et al. 2008). Resulta claro que las dosis utilizadas en los ratones fueron relativamente bajas y aun así obtuvimos regresiones completas con la administración conjunta de MFP, mostrando la alta sensibilidad de los modelos utilizados.

La mayor sensibilidad de T47D-YA a la DOX observada en los experimentos *in vivo*, se pudo corroborar *in vitro*. Llamó la atención la alta sensibilidad de la línea T47D-WT comparado con las otras modificadas genéticamente. Sin embargo está dentro del rango de los datos publicados en bibliografía y son acordes al tiempo de incubación con DOX (Nugroho et al. 2013; Aghaee et al. 2013; Rezaei et al. 2011). Las líneas T47D-YA e -YB se construyeron a partir de un clon de la línea T47D que era negativo para RP al cual se le transfectó de forma alternativa una u otra de las isoformas (Sartorius et al. 1994). Por esto, la línea celular T47D WT comparte menos trasfondo genético que las líneas que expresan una u otra isoforma, que se utilizan sólo en pasajes tempranos. Será interesante utilizar también en experimentos futuros la línea parental T47D-Y.

Nosotros hipotetizamos que la menor sensibilidad de las células T47D-YB a DOX puede ser debida a la alta expresión de una proteína denominada SERPINB3 (inhibidor de serin proteasas) que ha sido asociado a una menor respuesta terapéutica en los pacientes tratados con DOX (Collie-Duguid et al. 2012). En estudios de secuenciación de RNA (RNA seq) realizados a partir de biopsias de pacientes con distinta expresión de isoformas de RP, realizados en una colaboración con el laboratorio del Dr. Charles Perou (Universidad de North Carolina) se vio que

es uno de los genes que se encuentran sobre expresados en los pacientes RPB (resultados no publicados).

El gran porcentaje de células **poliploides** encontradas en los tratamientos con DOX en las células T47D-YB, podría sugerir que se trataría de células con algún daño que les impide completar la cariocinesis por efecto de la droga y sin embargo, encuentran la forma de ingresar en un ciclo celular nuevamente. Hay que tener en cuenta que las curvas de dosis-respuesta y los niveles de apoptosis (sub-G1) en T47D-YB no reflejaron tanto efecto de DOX como en las T47D-YA con bajos niveles poliploidización. Aunque a nivel histopatológico los macronúcleos podrían ser considerados como células poliploides con mitosis anómalas que llevarían a la muerte celular, también existen evidencias sugiriendo que estas células pueden sobrevivir y adquirir modificaciones que les confieren resistencia al tratamiento (Badtke et al. 2012; Gascoigne & Taylor 2008; Rowinsky 1990; Panvichian et al. 1998; Sharma et al. 2013; Zucker et al. 1991).

Los experimentos mostrados sugieren que las antraciclinas podrían ser una mejor opción que los taxanos para el tratamiento de los tumores que tienen mayor expresión de RPA que RPB, mientras que los taxanos serían la mejor opción para el tratamiento de los tumores con la proporción inversa. Estos datos deben ser corroborados en un número mayor de muestras humanas y los mecanismos involucrados deben ser estudiados en distintos modelos. Sin embargo, de trabajos anteriores se sabe que tanto BCL-XL como BCL-2 están involucrados en la resistencia a taxanos (Flores et al. 2012) y que RPA y no así RPB, es capaz de regular la expresión de BCL-XL en ausencia de ligando induciendo su expresión (J. Richer et al. 2002). Por esta razón hipotetizamos que estas proteínas antiapoptóticas y en particular BCL-XL, podrían ser claves para justificar esta diferencia de respuesta. Asimismo, el aumento de expresión de proteínas involucradas en la regulación del ensamble de los microtúbulos podrían también participar de este mecanismo (Badtke et al. 2012).

Estas observaciones pueden tener implicancias clínicas importantes si consideramos que existe la posibilidad que las dosis de Nab-paclitaxel puedan resultar insuficientes para destruir a las células de los tumores con alta expresión de RPA. Eso podría dar origen a la selección de células con anomalías cromosómicas y mayor poliploidía que se podrían seleccionar en forma positiva, dando lugar a variantes resistentes. Recientemente ha sido informado que PAX incrementa la

ploidía así como la amplificación de HER2 en muestras de cáncer de mama (Valent et al. 2013). Este antecedente podría explicar la presencia de células gigantes con macro núcleos, que constituyen posibles células poliploides, que se observaron en tumores C4-HI tratados con PAX que prácticamente no se inhibieron con el tratamiento con el taxano.

El uso de quimioterapia en conjunto con hormonoterapia es controvertido. Se ha sugerido que el antagonismo podría explicarse en el caso específico del TX, porque al reducir la tasa de proliferación, las células se volverían menos susceptibles a la acción de los agentes quimioterápicos (DeCensi et al. 2011). Los resultados mostrados en esta tesis sugieren que las terapias combinadas podrían funcionar en pacientes seleccionados, en este caso por el su relación de isoformas de RP.

Es importante destacar el trabajo de Skor y col. donde se muestra que MFP incrementa la eficacia de PAX en xenotransplantes de tumores triple-negativos (Skor et al. 2013). En este caso MFP estaría contrarrestando el efecto protector de la actividad del RG. Por esta razón no podríamos descartar que el RG también pueda estar involucrado en nuestros experimentos ya que los tumores y células utilizados en estos experimentos mantienen la expresión de RG. Sin embargo, el hecho de que las células T47D-YA e -YB sólo difieren en la isoforma de RP que fue introducida (Sartorius et al. 1994) y que la MFP ejerce efectos opuestos en ambas, sugiere que el RP es el que tiene el papel preponderante de inducir los efectos observados.

Si bien la MFP tiene un efecto antigluco corticoide conocido, las dosis que hemos utilizado *in vitro*, de 10 nM son las apropiadas para estudiar los efectos sobre el RP. Será interesante estudiar el efecto de otros antiprogéstágenos con menor actividad antigluco corticoide como el Proellex.

Resumiendo, en este trabajo de tesis mostramos evidencias que apoyarían el uso de terapias combinadas entre quimioterápicos y antiprogéstágenos en pacientes con carcinomas mamarios con mayor proporción de isoforma A que de isoforma B del RP. Estas combinaciones permitirían el uso de dosis más bajas de quimioterápicos con menos efectos colaterales. A su vez, los datos sugieren que es importante confirmar la posible mejor respuesta con una quimioterapia basada en antraciclinas en los pacientes RPA y con una terapia basada en taxanos en los pacientes RPB.

Resumen de Resultados y Conclusiones

Aportes metodológicos

Para contestar los interrogantes de esta tesis se realizaron dos desarrollos metodológicos que podrían utilizarse más allá del alcance de esta tesis:

- Para comparar el influjo y la funcionalidad de la red vascular de distintos tumores se inocularon GR de ratones GFP (fluorescentes) y luego por citometría se evaluó el porcentaje de partículas GFP+ en los distintos tumores.
- Para evaluar el efecto de hormonas o drogas sobre la proliferación de células tumorales humanas se ha puesto a punto la técnica de cultivos tisulares evaluando la proliferación celular por IHQ. La técnica requiere el conocimiento de un patólogo (aporte de la Dra. M.May) pero la eficiencia en la obtención de resultados depende del tamaño de la muestra y de la cantidad de células de la misma. Esta técnica podría utilizarse para realizar un “antibiograma” con distintos quimioterápicos.

Con respecto al modelo experimental murino utilizado se demostró que

- Los carcinomas mamarios son muy sensibles a quimioterápicos de las familias de antraciclinas y taxanos.
- Las terapias combinadas de PEG-LD o Nab-paclitaxel y antiprogéstágenos sólo tienen una mayor eficacia que las monoterapias en los carcinomas mamarios con mayor expresión de la isoforma A del RP.
- Los carcinomas mamarios con mayor proporción de RPB que RPA serían más sensibles al PAX que los de proporción opuesta de RP.
- El mecanismo que explica la mayor eficacia de las terapias combinadas sugiere que la MFP, al inducir remodelación tisular, provoca un aumento de la vasculatura que conlleva a un incremento de la concentración intratumoral de nanopartículas acrecentando así la eficiencia de la quimioterapia.

- El fenómeno observado es reproducido por el E₂ otro compuesto sin acción antiprogestacional, avalando las observaciones anteriores que sugieren que el efecto no estaría relacionado con las propiedades intrínsecas de la MFP, sino con su capacidad de remodelar el tejido tumoral.

En las líneas celulares humanas se demostró que

- Es posible hacer crecer xenotransplantes T47D-YA y T47D-YB en ratones NSG en los cuales la MFP inhibe (T47D-YA) o no (T47D-YB) el crecimiento tumoral reproduciendo los resultados observados en el modelo murino.
- El modelo T47D-YA/-YB *in vivo* es altamente sensible al tratamiento con antraciclinas o taxanos, siendo la línea-YA más sensible a la DOX y la -YB al PAX.
- Se observó una mayor sensibilidad de las células T47D-YA a la DOX en comparación a las -YB en estudios *in vitro*.
- Se demostró en el modelo de xenoinjertos que el tratamiento con MFP aumentó la eficacia de las quimioterapias (PEG-LD o Nab-paclitaxel) sólo en el tumor derivado de la línea celular con alta expresión de RPA, corroborando los resultados observados en el modelo murino.

En cultivos tisulares de muestras de cáncer de mama

- Se observó que las muestras con mayores niveles de RPA que RPB respondieron a MFP y a DOX sin mostrar diferencias significativas con el tratamiento combinado, apoyando la hipótesis de la remodelación tisular.
- En las muestras con mayores niveles de RPB que RPA la MFP no inhibió la proliferación celular y la respuesta a DOX fue variable.

Conclusión general y perspectivas

En este trabajo demostramos la importancia que tiene la determinación de las isoformas del RP en cáncer de mama. Los resultados reafirman que la respuesta a MFP está asociada a un aumento de expresión de RPA sobre RPB, sugiriendo que los antiprogéstágenos podrían ser una opción terapéutica para un grupo de pacientes RP+. Los resultados también sugieren que podría haber una ventaja de antraciclinas sobre taxanos para los tumores con mayores niveles de RPA que RPB y viceversa, una ventaja de taxanos sobre antraciclinas en los de proporción opuesta. Esta hipótesis será estudiada en el laboratorio en el marco de mi beca postdoctoral.

Por otro lado, demostramos que los tumores con mayor expresión de RPA que RPB podrían ser tratados con MFP y nanoquimioterápicos de forma conjunta para obtener mayores beneficios. En este tipo de tumores la MFP genera una remodelación tisular con aumento de la vasculatura permitiendo la concentración y acumulación de las nanopartículas a mayores niveles dentro del tumor. De este modo se lograría un mejor efecto terapéutico. Por otro lado, también se podría optar por utilizar menores concentraciones de droga reduciendo los efectos colaterales. Hemos observado que en este caso es la MFP la que induce estos efectos tisulares, sería útil evaluar en otros tumores insensibles a MFP que tipo de drogas son capaces de inducir esta remodelación tisular para la posterior administración de un quimioterápico.

Apéndice

CULTIVO CELULAR: MEDIOS Y SOLUCIONES

MEDIO DE CULTIVO

Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua bidestilada y se esterilizó por filtración.

DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium:

Ham's F12, 1:1) (Sigma Aldrich) sin rojo fenol.....15,6 g/l

Bicarbonato de sodio (SigmaAldrich).....1,2 g/l

Sulfato de gentamicina (Calbiochem) 50 mg/l

SUERO FETAL BOVINO (SFB) DECOMPLEMENTADO

SFB (Natocor) calentado en baño térmico a 56°C durante treinta minutos.

MEDIO DE LAVADO

El medio con el que se realizaron las decantaciones para separar las células tumorales epiteliales de los fibroblastos se preparó en base a la siguiente proporción:

98% DMEM/F12

2% SFB de complementado

SFB CHARCOLIZADO

Se incubó el SFB de complementado con carbón activado (5%; Mallinckrodt) durante 1 hora a 4°C con agitación permanente. Luego de la adsorción, el suero se centrifugó dos veces a 12000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se volvió a incubar con 5% de carbón activado pero esta vez durante toda la noche y, finalmente, el suero se centrifugó 6 o 7 veces hasta eliminar completamente el carbón y se esterilizó por filtración.

MEDIO DE CULTIVO PARA CÉLULAS EPITELIALES El medio de cultivo en el que se crecieron las células epiteliales se preparó en base a la siguiente proporción:

90% DMEM/F12

10% SFB de complementado

SOLUCIÓN ENZIMÁTICA

La solución utilizada para disgregar enzimáticamente los tumores, en el procedimiento de cultivo primario se preparó disolviendo en PBS 1X, los siguientes componentes:

Tripsina (Gibco, 1:250).....0,25% p/v

Colagenasa Tipo II (Gibco)..... 0,25% p/v

Albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich).....0,5% p/v

INMUNOHISTOQUIMICA/INMUNOFLUORESCENCIA

PBS 10X

El buffer utilizado en el protocolo de inmunohistoquímica (para la solución de trabajo se diluyó 1:10) se preparó de la siguiente manera, utilizando agua bidestilada:

Na₂HPO₄.12H₂O (Anedra).....30,06 g/l

NaH₂PO₄.H₂O (Anedra) 2,56 g/l

NaCl (Gibco)..... 87,6 g/l

SOLUCIÓN PARA FIJAR TUMORES PARA IHQ

La solución se preparó en el momento disolviendo Formaldehido (Merck) al 10% en PBS 1X.

IODURO DE PROPIDIO (SOLUCIÓN MADRE)

El colorante utilizado para teñir los núcleos celulares durante el procedimiento de inmunofluorescencia se realizó diluyendo 1 mg de IP (Sigma Aldrich) en 1 ml de agua destilada.

SOLUCIÓN DE BLOQUEO

La solución utilizada durante el bloqueo de las inmunofluorescencias o las inmunohistoquímicas se preparó realizando una solución de SFB al 10% en PBS 1X.

WESTERN BLOT

BUFFER DE EXTRACCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Buffer RIPA:

NP-40.....	1 %
EDTA (Sigma Aldrich).....	1 mM
SDS (Sigma Aldrich)	0,1%
Tris-HCl ph 7.4	50 mM
NaCl	150 mM
Deoxicolato de Sodio	0,5%

Buffer A

Vol _f	100 ml
Tris 20Mm pH7.4.....	0,27 g
EDTA 1,5 mM.....	55,8 mg
Na ₂ MoO ₄	0,491 g

Glicerol 10%.....10 ml

DDT 0,25 mM.....0.0038g

Buffer A nuclear

Buffer A5ml

CINa 0,4 M.....0.116 g

Sacarosa

0,25M.....0,428 g

INHIBIDORES DE PROTEASAS

Los inhibidores de proteasas utilizados en la preparación de los extractos proteicos totales tumorales fueron:

PMSF (Sigma Aldrich)0.5 mM

ZPCK (Sigma Aldrich).....0,025 mM

TLC (Sigma Aldrich).....0, 025 mM

TPCK (Sigma Adrich)0,025 mM

TAME (Sigma Aldrich).....0, 025 mM

MÉTODO DE LOWRY

Curva standard de albúmina (Sigma Aldrich) con valores en un rango desde 0-80 ug (por duplicado).

Sc1: CuSO₄ 1%, tartrato de Na₂K 1% en *buffer* Na₂CO₃ 2% NaOH 0,1N Se diluyen 3ul (muestra de tumor) o 5ul (muestra de cultivo celular) en 100 ul de agua destilada (por duplicado), y se le agregan 0,9 ml de Sc1. Se agitan las muestras en un vortex y luego de 10 min se agregan 100 ul del reactivo de Folin (Folin-Ciocalteu) diluido 1:2. Se esperan 30 minutos y se mide la absorbancia a

750 nm en un lector de ELISA. A partir de la curva de calibración obtenida se averigua la concentración proteica de las muestras incógnitas.

TBS 10X

Para la técnica de *western blot* se prepara disolviendo las sales en 1L de agua destilada (Llevar a pH 7,2 con HCl).

NaCl..... 87,66 g

Tris..... 24,22 g

TBST 0,1%

Para preparar TBST 0,1% se disuelve 1 ml de Tween 20, en 1L de TBS 1X.

ACRILAMIDA 30%

Se filtra y se conserva a 4° C protegida de la luz.

Acrilamida (Gibco)..... 29 g

Bisacrilamida (Gibco)..... 1 g

Agua destilada c.s.p..... 100 ml

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8. (Llevar a pH con HCl)

Tris..... 90,85 g

Agua destilada c.s.p..... 500 ml

Tris-HCl 1,0 M pH 6,8. (Llevar a pH con HCl)

Tris..... 60,57g

Agua destilada c.s.p..... 500 ml

SDS 10%

SDS (Gibco).....	10 g
Agua destilada c.s.p.....	100ml

PERSULFATO 10% (APS)

APS (Gibco).....	1 g
Agua destilada c.s.p.....	10 ml

BUFFER DE SIEMBRA (LOADING BUFFER) 4X

El buffer utilizado para craquear y sembrar las muestras en el gel se preparó de la siguiente manera:

SDS.....	6 %
b-mercaptoetanol.....	15 % V/V
Glicerol.....	60 %
Tris 0,18 M pH 6,8	0,18 M
Azul de Bromofenol	0,006 % p/v

MARCADORES DE PESO MOLECULAR

Rainbow prestained molecular weight markers (Amersham).

BUFFER DE CORRIDA 10X

Para transferir la corrida electroforética se utilizó una dilución 1:10 en agua destilada de la siguiente preparación:

Tris.....	30 g/l
Glicina.....	144 g/l

SDS.....10 g/l

BUFFER DE TRANSFERENCIA

Para transferir las proteínas a las membranas de nitrocelulosa se utilizó la siguiente preparación, en 1L de agua destilada:

Buffer de corrida 10X100 ml

Metanol.....200 ml

MEMBRANA DE NITROCELULOSA

Hybond C (0,45 μ m; Amersham).

SOLUCIÓN DE BLOQUEO

Para bloquear las membranas de nitrocelulosa se utilizó, según lo indicaran los distintos anticuerpos utilizados:

Leche descremada en polvo al 5% en PBS 1X/tween 0.1%

BSA (Sigma Aldrich) al 5% en TBS 1X/tween 0,1%

SOLUCIÓN DE REVELADO

Se mezclan las soluciones A y B y se coloca la resultante sobre la/s membrana/s de nitrocelulosa durante 2 min aproximadamente antes de exponer las películas fotográficas.

A) 4,6 ml agua destilada + 333ul Tris pH 8.8 + 50 ul luminol (Sigma) + 22ul ácido cumárico (Sigma Aldrich).

B) 4,6 ml agua destilada + 333ul Tris pH 8.8 + 3.2 ul H₂O₂ (Merck).

Luminol: 22 mg de luminol en 500 μ l de DMSO.

Cumárico: 7,5 mg de ácido cumárico en 500ul de DMSO.

Bibliografía

Aghaee, F. et al., 2013. Enhancing the effects of low dose doxorubicin treatment by the radiation in T47D and SKBR3 breast cancer cells. *Journal of Breast Cancer*, 16(2), pp.164–170.

Alba, E. et al., 2012. Chemotherapy (CT) and hormonotherapy (HT) as neoadjuvant treatment in luminal breast cancer patients: results from the GEICAM/2006-03, a multicenter, randomized, phase-II study. *Annals of Oncology*, 23(12), pp.3069–74.

Anders, C.K. et al., 2013. Pharmacokinetics and efficacy of PEGylated liposomal doxorubicin in an intracranial model of breast cancer. *PloS One*, 8(5), p.e61359.

Van Asten, K. et al., 2014. Aromatase inhibitors in the breast cancer clinic: focus on exemestane. *Endocrine-Related Cancer*, 21(1), pp.R31–49.

Aupperlee, M.D. et al., 2005. Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development. *Endocrinology*, 146(8), pp.3577–88.

Bachelot, T. et al., 2014. Sunitinib in combination with trastuzumab for the treatment of advanced breast cancer: activity and safety results from a phase II study. *BMC Cancer*, 14(1), p.166.

Badtke, M.M. et al., 2012. Unliganded progesterone receptors attenuate taxane-induced breast cancer cell death by modulating the spindle assembly checkpoint. *Breast Cancer Research and Treatment*, 131(1), pp.75–87.

Barcellos-Hoff, M.H. & Medina, D., 2005. New highlights on stroma-epithelial interactions in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 7(1), pp.33–6.

Bardon, S. et al., 1987. Steroid receptor-mediated cytotoxicity of an antiestrogen and an antiprogestin in breast cancer cells. *Cancer Research*, pp.1441–1448.

Barrett-Lee, P.J., 2005. Growth factor signalling in clinical breast cancer and its impact on response to conventional therapies: a review of chemotherapy. *Endocrine-Related Cancer*, 12 Suppl 1, pp.S125–33.

Barrios, C. et al., 2012. The sequential use of endocrine treatment for advanced breast cancer: where are we? *Annals of Oncology*, 23(6), pp.1378–86.

Batist, G., 2007. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Cardiovascular Toxicology*, 7(2), pp.72–4.

Baulieu, E., 1986. Fertility control in women: Results with RU 486 by the end of 1985. *Journal of Steroid Biochemistry*, 25(5), pp.847–851.

Beal, M. & Simmonds, K., 2002. Clinical uses of mifepristone: an update for women's health practitioners. *Journal of Midwifery & Women's*, 47(6), pp.451–460.

Bellance, C. et al., 2013. Progesterone receptor isoforms PRA and PRB differentially contribute to breast cancer cell migration through interaction with focal adhesion kinase complexes. *Molecular Biology of the Cell*, 24(9), pp.1363–74.

- Bergh, J. et al., 2012. First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(9), pp.921–9.
- Bottino, M.C. et al., 2011. Classical membrane progesterone receptors in murine mammary carcinomas: agonistic effects of progestins and RU-486 mediating rapid non-genomic effects. *Breast Cancer Research and Treatment*, 126(3), pp.621–36.
- Breast, E., et al., 2005. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 365(9472), pp.1687–717.
- Breast, I. et al., 1997. Effectiveness of adjuvant chemotherapy in combination with tamoxifen for node-positive postmenopausal breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 15(4), pp.1385–94.
- Bria, E. et al., 2006. Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer: pooled analysis of 15,500 patients. *Cancer*, 106(11), pp.2337–44.
- Burdall, S. & Hanby, A., 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Research*, pp.89–95.
- Cerliani, J.P. et al., 2011. Interaction between FGFR-2, STAT5, and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer Research*, 71(10), pp.3720–31.
- Chan, S. et al., 2012. STAT1-deficient mice spontaneously develop estrogen receptor α -positive luminal mammary carcinomas. *Breast Cancer Research*, 14(1), p.R16.
- Cheang, M.C.U. et al., 2009. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101, pp.736–750.
- Check, J.H. et al., 2010. Efficacy of the progesterone receptor antagonist mifepristone for palliative therapy of patients with a variety of advanced cancer types. *Anticancer Research*, 30(2), pp.623–8.
- Choi, C.-H., 2005. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International*, 5, p.30.
- Clark, G.M. & McGuire, W.L., 1983. Progesterone receptors and human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 3, pp.157–163.
- Coleman, R.E., 2005. Bisphosphonates in breast cancer. *Annals of oncology*, 16(5), pp.687–95.
- Collie-Duguid, E.S.R. et al., 2012. SerpinB3, a new prognostic tool in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(3), pp.807–18.

- Cordon-Cardo, C. et al., 1990. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 38(9), pp.1277–1287.
- Davies, C. et al., 2013. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*, 381(9869), pp.805–16.
- Dean, M., et al., 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 11(7), pp.1156–66.
- DeCensi, a et al., 2011. Prognostic significance of Ki-67 labeling index after short-term presurgical tamoxifen in women with ER-positive breast cancer. *Annals of Oncology*, 22(3), pp.582–7.
- Diop-Frimpong, B. et al., 2011. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), pp.2909–14.
- Easton, D.F. et al., 2007. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*, 447(7148), pp.1087–93.
- Eikenes, L. et al., 2005. Hyaluronidase induces a transcapillary pressure gradient and improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (Caelyx) in human osteosarcoma xenografts. *British Journal of Cancer*, 93(1), pp.81–8.
- Esserman, L.J. et al., 2012. Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(3), pp.1049–62.
- Fabbri, F. et al., 2006. Sequential events of apoptosis involving docetaxel, a microtubule-interfering agent: a cytometric study. *BMC Cell Biology*, 7, p.6.
- Fabian, C.J., 2007. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *International Journal of Clinical Practice*, 61(12), pp.2051–63.
- Fabris, V.T. et al., 2010. Inoculated mammary carcinoma-associated fibroblasts: contribution to hormone independent tumor growth. *BMC Cancer*, 10, p.293.
- Ferlay, J. et al., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. , 386.
- Ferlini, C. et al., 2009. Paclitaxel directly binds to Bcl-2 and functionally mimics activity of Nur77. *Cancer Research*, 69(17), pp.6906–14.
- Flores, M.L. et al., 2012. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133(3), pp.917–28.

Gascoigne, K.E. & Taylor, S.S., 2008. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell*, 14(2), pp.111–22.

Gattelli, A. et al., 2006. Selection of early-occurring mutations dictates hormone-independent progression in mouse mammary tumor lines. *Journal of Virology*, 80(22), pp.11409–15.

Ghatge, R.P. et al., 2005. The progestational and androgenic properties of medroxyprogesterone acetate: gene regulatory overlap with dihydrotestosterone in breast cancer cells. *Breast Cancer Research : BCR*, 7(6), pp.R1036–50.

Gonder, J.C. & Laber, K., 2007. A renewed look at laboratory rodent housing and management. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 48(1), pp.29–36.

Gradishar, W.J. et al., 2005. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31), pp.7794–803.

Graham, J., et al., 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Research*, pp.5063–5068.

Gruol, D. et al., 1994. Reversal of multidrug resistance by RU 486. *Cancer Research*, pp.3088–3091.

GT, B., 1896. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*, 2, pp.104–107.

Guarneri, V., et al., 2012. Enhancing intracellular taxane delivery: current role and perspectives of nanoparticle albumin-bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 13(3), pp.395–406.

Helguero, L. a et al., 2003. Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Research and Treatment*, 79(3), pp.379–90.

Hollern, D.P. & Andrechek, E.R., 2014. A genomic analysis of mouse models of breast cancer reveals molecular features of mouse models and relationships to human breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 16(3), p.R59.

Hopp, T. a et al., 2004. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clinical Cancer Research*, 10(8), pp.2751–60.

Horsman, M.R. & Siemann, D.W., 2006. Pathophysiologic effects of vascular-targeting agents and the implications for combination with conventional therapies. *Cancer Research*, 66(24), pp.11520–39.

Hortobagyi, G.N., 2000. Developments in chemotherapy of breast cancer. *Cancer*, 88(12 Suppl), pp.3073–9.

Horwitz, K.B., 1992. The Molecular Biology of RU486 . Is There a Role for antiprogestin in the treatment of breast cancer., *Endocrine Reviews*. 13(2), pp.146–163.

Howell, A. et al., 2005. Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma: a prospectively planned combined survival analysis of two multicenter trials. *Cancer*, 104(2), pp.236–9.

Ibrahim, N., Desai, N. & Legha, S., 2002. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clinical Cancer Research*, pp.1038–1044.

Ikeda, H. et al., 2011. Combination treatment with fulvestrant and various cytotoxic agents (doxorubicin, paclitaxel, docetaxel, vinorelbine, and 5-fluorouracil) has a synergistic effect in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Science*, 102(11), pp.2038–42.

Ikeda, H. et al., 2010. The estrogen receptor influences microtubule-associated protein tau (MAPT) expression and the selective estrogen receptor inhibitor fulvestrant downregulates MAPT and increases the sensitivity to taxane in breast cancer cells. *Breast Cancer Research : BCR*, 12, p.R43.

Ingle, J.N. et al., 1986. Randomized trial of bilateral oophorectomy versus tamoxifen in premenopausal women with metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 4(2), pp.178–85.

Jackson, T.A. et al., 1997. The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Molecular Endocrinology*, 11, pp.693–705.

Jacobsen, B.M. et al., 2002a. New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(31), pp.27793–800.

Järvinen, T. a. H. et al., 2000. Amplification and Deletion of Topoisomerase II α Associate with ErbB-2 Amplification and Affect Sensitivity to Topoisomerase II Inhibitor Doxorubicin in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 156(3), pp.839–847.

Joensuu, H. & Gligorov, J., 2012. Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Annals of oncology*, 23 Suppl 6(Supplement 6), pp.vi40–5.

Jonat, W. et al., 2013. Randomized phase II study of lonaprisan as second-line therapy for progesterone receptor-positive breast cancer. *Annals of Oncology*, 24(10), pp.2543–8.

Jordan, V.C., 2014a. Linking Estrogen-Induced Apoptosis With Decreases in Mortality Following Long-term Adjuvant Tamoxifen Therapy. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 106(11), pp.dju296–dju296.

Jordan, V.C., 2014b. The new biology of estrogen-induced apoptosis applied to treat and prevent breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, 22, pp.R1–R31.

Kao, J. et al., 2009. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS One*, 4(7), p.e6146.

Kastner, P. et al., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO*, 9(5), pp.1603–1614.

Keydar, I. et al., 1979. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *European Journal of Cancer (1965)*, 15(5), pp.659–670.

Klijn, J., et al., 1989. Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer. *Cancer Research*, pp.2851–2856.

Knoop, A.S. et al., 2005. retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danis. *Journal of Clinical Oncology*, 23(30), pp.7483–90.

Kordon, E. et al., 1991. Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *International Journal of Cancer*, 49, pp.900–905.

Kratz, F., 2008. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3), pp.171–83.

Labriola, L. et al., 2003. Heregulin Induces Transcriptional Activation of the Progesterone Receptor by a Mechanism That Requires Functional ErbB-2 and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 23(3), pp.1095–1111.

Lagos-Jaramillo, V.I. et al., 2011. Pathological characteristics of BRCA-associated breast cancers in Hispanics. *Breast Cancer Research and Treatment*, 130(1), pp.281–9.

Lamb, C. et al., 1999. Regulation of cell growth of a progestin-dependent murine mammary carcinoma in vitro: progesterone receptor involvement in serum or growth factor-induced cell proliferation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 70(4-6), pp.133–42.

Lanari, C. et al., 2012. Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? *Endocrine-Related Cancer*, 19(3), pp.R35–50.

- Lanari, C. et al., 2009. The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 16(2), pp.333–50.
- Lange, C. a et al., 1998. Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(47), pp.31308–31316.
- Lange, C. a., 2008. Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108(612), pp.203–212.
- Liang, Y. et al., 2007. Progestin-dependent progression of human breast tumor xenografts: a novel model for evaluating antitumor therapeutics. *Cancer Research*, 67(20), pp.9929–36.
- Liang, Y. & Hyder, S.M., 2005. Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: Paracrine and autocrine effects. *Endocrinology*, 146(February), pp.3632–3641.
- Matos, E.L. et al., 1991. Cancer in migrants to Argentina. *International journal of cancer. Journal International du Cancer*, 49(6), pp.805–11.
- McGrogan, B.T. et al., 2008. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1785(2), pp.96–132.
- Montecchia, M.F. et al., 1999. Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 68(1-2), pp.11–21.
- Moore, M.R., et al., 2000. Progestin effects on long-term growth, death, and Bcl-xL in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(3), pp.650–4.
- Morikawa, S. et al., 2002. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *The American Journal of Pathology*, 160(3), pp.985–1000.
- Mote, P. a et al., 2002. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 72(2), pp.163–72.
- Moulder, S. & Hortobagyi, G.N., 2008. Advances in the treatment of breast cancer. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83(1), pp.26–36.
- Muller, W.J. et al., 1988. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell*, 54(1), pp.105–115.
- Murray, S. et al., 2012. Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treatment Reviews*, 38(7), pp.890–903.

- Nugroho, A.E. et al., 2013. Combinational effects of hexane insoluble fraction of *Ficus septica* Burm. F. and doxorubicin chemotherapy on T47D breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(4), pp.297–302.
- Osborne, C.K., et al., 2004. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *British Journal of Cancer*, 90 Suppl 1, pp.S2–6.
- Ostergaard, L. et al., 2013. The Relationship between Tumor Blood Flow, Angiogenesis, Tumor Hypoxia, and Aerobic Glycolysis. *Cancer Research*, 73(18), pp.5618–24.
- Pampaloni, F., et al., 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews. Molecular Cell biology*, 8(10), pp.839–45.
- Panvichian, R. et al., 1998. Paclitaxel-associated multiminucleation is permitted by the inhibition of caspase activation: a potential early step in drug resistance. *Cancer research*, pp.4667–4672.
- Pathiraja, T.N. et al., 2011. Progesterone receptor isoform-specific promoter methylation: association of PRA promoter methylation with worse outcome in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 17(12), pp.4177–86.
- Perou, C.M. & Børresen-Dale, A.-L., 2011. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), pp.1–17.
- Polo, M.L. et al., 2010. Responsiveness to PI3K and MEK inhibitors in breast cancer. Use of a 3D culture system to study pathways related to hormone independence in mice. *PloS One*, 5(5), p.e10786.
- Poole, A. et al., 2006. Prevention of Brca1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist. *Science*, 66(March 2004), pp.2004–2007.
- Prat, A. et al., 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 12(5), p.R68.
- Reagan-Shaw, S., et al, 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal*, 22(3), pp.659–61.
- Rezaei, P.F. et al., 2011. Comparative cellular and molecular analysis of cytotoxicity and apoptosis induction by doxorubicin and Baneh in human breast cancer T47D cells. *Cytotechnology*, 63, pp.503–512.
- Richer, J.K. et al., 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp.5209–18.
- Robertson, J. et al., 1999. Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer. *European Journal of Cancer*, 35(2), pp.214–218.

- Rouzier, R. et al., 2005. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical cancer research*, 11(16), pp.5678–85.
- Rowinsky, E., 1990. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *Journal of the National Cancer Institute*.
- Sahores, A. et al., 2013. Novel, low cost, highly effective, handmade steroid pellets for experimental studies. *PloS One*, 8(5), p.e64049.
- Sartorius, C. a et al., 1994. New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogestin-occupied B-receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer Research*, 54(14), pp.3868–77.
- Sestak, I., 2014. Preventative therapies for healthy women at high risk of breast cancer. *Cancer Management and Research*, 6, pp.423–30.
- Sharma, S. et al., 2013. Small-Molecule Inhibitor BMS-777607 Induces Breast Cancer Cell Polyploidy with Increased Resistance to Cytotoxic Chemotherapy Agents. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12, pp.725–736.
- Siegel, R., et al. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 62(5), pp.283–98.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A., 2015. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 65(1), pp.5–29.
- Simian, M., et al., 2006. Involvement of matrix metalloproteinase activity in hormone-induced mammary tumor regression. *The American Journal of Pathology*, 168(1), pp.270–9.
- Skor, M.N. et al., 2013. Glucocorticoid receptor antagonism as a novel therapy for triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 19:6163-6172
- Smith, D.F. & Toft, D.O., 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 7(1), pp.4–11.
- Soldati, R. et al., 2010. Inhibition of mammary tumor growth by estrogens: is there a specific role for estrogen receptors alpha and beta? *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(3), pp.709–24.
- Susan J. Mackenzie, et al., 1997. Pregnancy interruption using mifepristone (RU-486) A new choice for women in the USA. *Journal of Nurse-Midwifery*, 42(2), pp.86–90.
- Tieszen, C.R. et al., 2011. Antiprogestin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BMC Cancer*, 11(1), p.207.

- Timmins, N.E. et al., 2005. Method for the generation and cultivation of functional three-dimensional mammary constructs without exogenous extracellular matrix. *Cell and Tissue Research*, 320(1), pp.207–10.
- Tinoco, G. et al., 2013. Treating breast cancer in the 21st century: emerging biological therapies. *Journal of Cancer*, 4(2), pp.117–32.
- Tominaga, T. et al., 1994. Comparison of chemotherapy with or without medroxyprogesterone acetate for advanced or recurrent breast cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 30A(7), pp.959–64.
- Valent, A. et al., 2013. Change in HER2 (ERBB2) gene status after taxane-based chemotherapy for breast cancer: polyploidization can lead to diagnostic pitfalls with potential impact for clinical management. *Cancer Genetics*, 206(1-2), pp.37–41.
- Vanzulli, S., Efeyan, A. & Benavides, F., 2002. p21, p27 and p53 in estrogen and antiprogesterin-induced tumor regression of experimental mouse mammary ductal carcinomas. *Carcinogenesis*, 23(5), pp.749–757.
- Vanzulli, S., Soldati, R. & Meiss, R., 2005. Estrogen or antiprogesterin treatment induces complete regression of pulmonary and axillary metastases in an experimental model of breast cancer progression. *Carcinogenesis*. 26(6), pp.1055–63.
- Venkitaraman, A.R., 2002. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), pp.171–182.
- Villeneuve, D.J. et al., 2006. cDNA microarray analysis of isogenic paclitaxel- and doxorubicin-resistant breast tumor cell lines reveals distinct drug-specific genetic signatures of resistance. *Breast Cancer Research and Treatment*, 96(1), pp.17–39.
- Vuong, D. et al., 2014. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv : an International Journal of Pathology*, 465(1), pp.1–14.
- Walker, J. V & Nitiss, J.L., 2002. DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Investigation*, 20(4), pp.570–89.
- Wargon, V. et al., 2011. Hypermethylation of the progesterone receptor A in constitutive antiprogesterin-resistant mouse mammary carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment*, 126(2), pp.319–32.
- Wargon, V. et al., 2014. Progesterin and antiprogesterin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoter. *International Journal of Cancer*.
- Wargon, V. et al., 2009. Reversal of antiprogesterin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment*, 116(3), pp.449–60.
- Wynn, T., 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, 214(2), pp.199–210.

Yin, Y. et al., 2005. Characterization of medroxyprogesterone and DMBA-induced multilineage mammary tumors by gene expression profiling. *Molecular Carcinogenesis*, 44(1), pp.42–50.

Zhang, M. et al., 2008. Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Research*, 68(12), pp.4674–82.

Zucker, R.M. et al., 1991. Polyploidy induction as a consequence of topoisomerase inhibition. A flow cytometric assessment. *Biochemical Pharmacology*, 42(11), pp.2199–2208.