

Tesis de Posgrado

Estructura y función de genes asociados al cáncer de mama

Nembrot, Mónica

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Nembrot, Mónica. (1991). Estructura y función de genes asociados al cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2450_Nembrot.pdf

Cita tipo Chicago:

Nembrot, Mónica. "Estructura y función de genes asociados al cáncer de mama". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2450_Nembrot.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

*"Estructura y función de genes asociados
al cáncer de mama"*

Mónica Nembrot

Tesis
para optar al título de
Doctora en Ciencias Químicas

Director: Dr. José Mordoh

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"

Año 1991

*Tesis
2450
y 2*

Yo no sé nada
 Tú no sabes nada
 Ud. no sabe nada
 El no sabe nada
 Ellos no saben nada
 Ellas no saben nada
 Uds. no saben nada

Nosotros no sabemos nada.

La desorientación de mi generación tiene su explicación en la dirección de nuestra educación, cuya idealización de la acción, era - ¡sin discusión! - una mistificación, en contradicción con nuestra propensión a la meditación, a la contemplación y a la masturbación, (Gutural, lo más guturalmente que se pueda.) Creo que creo en lo que cero que no creo. Y creo que no creo en lo que creo que creo.

"Cantar de las ranas"
 ;Y ;Y ¿A ¿A ,Y ;Y
 su ba lli llá su ba
 bo jo es es bo jo
 las las tá? tá las las
 es es ;A ;A es es
 ca ca qui ca ca ca
 le le no no le le
 ras ras es es ras ras
 arri aba tá tá arri aba
 ba!... jo!... !... !.... ba!... jo!...

Oliverio Gironde

"Espantapájaros", 1932.

Indice

Introducción

I.- Oncogenes y emerogenes

I.A.- Oncogenes. Su rol en el desarrollo tumoral	4
I.B.- Oncogenes. Una familia de pocos miembros	6
I.C.- Oncogenes. Inducción tumoral en varios pasos	6
I.D.- Oncogenes. Su clasificación	8
I.D.1.- Factores de crecimiento	8
I.D.2.- Receptores de factores de crecimiento	9
I.D.3.- Proteínas asociadas a la cara interna de la membrana citoplasmática	9
I.D.3.1.- Oncogenes con actividad de tirosina kinasa o kinasas asociadas	10
I.D.3.2.- Oncogenes de la familia ras	10
I.D.4.- Oncogenes que codifican para proteínas solubles citoplasmáticas	12
I.D.5.- Oncogenes que codifican para proteínas de localización nuclear	12
I.E.- Oncogenes. Cómo pueden activarse	13
I.E.1.1.- Cambio del entorno génico	13
I.E.1.2.- Translocación	13
I.E.1.3.- Amplificación génica	14
I.E.2.- Producción de una proteína alterada	14
I.F.- Emerogenes	15
I.G.- Oncogenes. Su rol en los tumores sólidos humanos	16

II.- Regulación hormonal	19
II.A.- Hormonas esteroideas	19
II.A.1.- Hormonas esteroideas. Su clasificación	20
II.A.2.- Hormonas esteroideas. Su biosíntesis y estructura	20
II.A.3- Hormonas esteroideas. Descubrimiento de sus receptores	21
II.A.4- Hormonas esteroideas. Descubrimiento de sus secuencias blanco en el ADN	23
II.B.- Receptores hormonales	24
II.B.1.- Receptores hormonales. Análisis de su estructura molecular	24
II.B.2.- Receptores hormonales. Dominios funcionales	26
II.B.2.1.- Dominio de unión al ADN	26
II.B.2.2.- Dominio de unión a la hormona	29
II.B.2.3.- Región amino-terminal	29
II.B.2.4.- Región D	29
II.B.3.- Receptores hormonales. Un gen ancestral común	30
II.B.4.- Cómo funciona el receptor estrogénico?	30
II.B.5.- Receptor de progesterona. Sus características particulares	31
III.- Cancer de mama	34
III.A.- Cancer de mama. Estadísticas	34
III.B.- Glándula mamaria. Su anatomía normal	34
III.C.- Carcinoma mamario	37
III.C.1.- Carcinoma mamario. Definición	37
III.C.2.- Carcinoma mamario. Diagnóstico	37

III.C.3.- Carcinoma mamario. Hormono-	
dependencia	38
III.C.4.- Carcinoma mamario. Tratamiento	40
IV.- Cáncer. Modelos de estudio en el laboratorio	42
IV.A.- Análisis de biopsias	42
IV.B.- Análisis de líneas celulares	42
IV.B.1.- Establecimiento de líneas celulares.	
Su historia	43
IV.B.2.- Líneas celulares de cáncer de mama	45
Materiales y Métodos	
Materiales	48
1.- Pacientes	48
2.- Tejidos	48
3.- Células	48
4.- Medios de cultivo	49
5.- Plásmidos recombinantes	50
6.- Soluciones	51
Métodos	
1.- Obtención de tipos celulares puros	53
1.A.- Purificación de células tumorales de	
mama	53
1.B.- Purificación de linfocitos	53
2.- Obtención de ácidos nucleicos	54
2.A.- Purificación de ADN	54
2.B.- Purificación de ARN	56

3.- Corrida electroforética y transferencia	56
3.A.- Para ADN	56
3.B.- Para ARN	57
4.- Condiciones de hibridización	58
4.A.- Para ADN	58
4.B.- Para ARN	59
5.- Producción de sondas	59
5.A.- Transformación bacteriana	60
5.B.- Crecimiento bacteriano y amplificación de plásmidos	61
5.C.- Lisis por álcali	61
5.D.- Purificación de ADN plasmídico por centrifugación a equilibrio en gradiente de CsCl en presencia de bromuro de etidio	61
5.E.- Purificación de inserto por freeze-squeeze	62
5.F.- Purificación de inserto por electroelución	63
5.G.- Marcación de inserto por nick translation	63
6.- Determinación de receptores hormonales	64
6.A.- Por inmunohistoquímica	64
6.B.- Determinación de RE y RPg por el método bioquímico	66
6.B.1.- Preparación de citosoles a partir de tumores	66
6.B.2.- Ensayo DCC ("Dextran Coated Charcol")	66
7.- Determinación de proteína 52K	67
8.- Curvas de crecimiento	68
9.- Biopsia de tumores de mama	69
9.A.- Biopsia de tumores de mama.	69
Clasificación	69

9.B.- Biopsia de tumores de mama.	
Agrupación por estadios	71
Resultados	
I.- Estudio de oncogenes en el cáncer de mama	72
IA.- Análisis genómico del oncogen myc	73
IB.- Análisis genómico de los oncogenes de la familia ras	75
I.B.1.- Estructura del oncogen N-ras	75
I.B.2.- Estructura del oncogen Ki-ras	76
I.B.3.- Estructura del oncogen Ha-ras	76
I.C.- Análisis genómico del oncogen neu	80
II.- Estudio génico de receptores de hormonas esteroideas en cáncer de mama	82
II.A.- Estudio del gen del receptor estrogénico (RE)	82
II.A.1.- Estructura del gen RE normal.	82
II.A.2.- Estructura del gen RE en tumores primarios de mama	85
II.A.3- Determinación del contenido de REn en los tumores que presentaron amplificación	90
II.A.4.- Análisis de metilación del gen del RE	94
II.B.- Análisis del gen del receptor de progesterona (RPg)	
II.B.1.- Estudio de la estructura del gen del RPg humano	98
II.B.2.- Estructura del gen Rpg en tumores primarios de mama	101

III.-Análisis de la expresión de proteínas E2- dependientes en la línea celular MCF-7 en medio definido	105
III.A.- Caracterización del crecimiento celular	106
III.B.- Análisis de la expresión de diversas proteínas	111
III.B.1.- Expresión de RE, pS2 y DHFR en medio ID	111
III.B.2.- Efecto del E2 y del tamoxifeno en la expresión de pS2 en medio ID	114
III.B.3.- Secreción de la proteína 52K en medio ID	115
III.B.4.- Expresión de c-Ha-ras en medio ID	115
 Discusión	
I.- Estudio de oncogenes en cáncer de mama	118
II.- Estudio génico de los receptores hormonales en el cáncer de mama	123
II.A.- Análisis del gen RE	124
II.B.- Análisis del gen RPg	129
III.- Estudio de la reguación hormonal del crecimeinto celular y la expresión génica en cáncer de mama	132
 Confesion	137
 Referencias	138

Introducción

Figura I.1: Modelo de mecanismo de acción de las proteínas ras	11
Figura I.2: Estructura química de las principales hormonas esteroideas	22
Figura I.3: Familia de receptores de hormonas esteroideas	25
Figura I.4.: Estructura de "dedos de Zinc" de la región C del RE	28
Figura I.5: Esquema de la anatomía de los conductos mamarios	36
Figura I.6: Arreglo celular del lóbulo mamario	36
Resultados	
Figura r.1: Análisis de los oncogenes myc y ras en tumores mamarios	74
Figura r.2: Análisis de los oncogenes ras y neu en tumores mamarios	77
Tabla r.1: Análisis genómico de oncogenes myc y ras	79
Tabla r.2: Análisis de amplificación del oncogen neu	81
Figura r.3: Análisis del gen RE en líneas celulares y tejidos humanos	84
Figura r.4: Análisis del gen RE en células de cáncer mamario	86
Tabla r.3: Correlación entre contenido de RE y su amplificación génica	88
Tabla r.4: Correlación de amplificación entre genes neu y RE	89
Figura r.5: Análisis de expresión de RE en líneas celulares de cáncer de mama	92
Figura r.6: Análisis de expresión de RE en tumores primarios de mama	93
Tabla r.5: Correlación entre las determinaciones RE _n y RE _c	95
Figura r.7: Análisis del gen RPg en líneas celulares y tejidos humanos	100

Figura r.8: Análisis del gen RPg en tumores primarios de mama	102
Tabla r.6: Análisis genómico del gen RPg	104
Figura r.9: Efecto del E2 y del Tam en el crecimiento celular de MCF-7	107
Tabla r.7: Efecto del E2 y del Tam en el crecimiento celular de MCF-7	108
Figura r.10: Curvas de crecimiento de células MCF-7 crecidas 1 mes en medio ID	109
Tabla r.8: Efecto del E2 y del Tam sobre células MCF-7 en medio ID	110
Figura r.11: Expresión de RE y de Ha-ras en medio ID	
Figura r.12: Expresión de pS2 y DHFR en medio ID	
Figura r.13: Secreción de proteína 52K por MCF-7 en distintos medios de cultivo	
Tabla r.9: Secreción de proteína 52K por células MCF-7 cultivadas en medio ID	117

"...y luego, hace un momento, unos determinados animales arbóreos se bajaron de los árboles y se dispersaron. Su postura se hizo erecta y se enseñaron a sí mismos el uso de herramientas, domesticaron otros animales, plantas y el fuego, e idearon el lenguaje. La ceniza de la alquimia estelar estaba emergiendo en forma de conciencia. A un ritmo cada vez más acelerado inventó la escritura, las ciudades, el arte y la ciencia y envió naves espaciales a los planetas y a las estrellas.

Estas son algunas de las cosas que los átomos de hidrógeno hacen si se les dan quince mil millones de años de evolución cósmica..."

Carl Sagan

Introducción

"La célula viviente es un régimen tan complejo y bello como el reino de las galaxias y de las estrellas. La exquisita maquinaria de la célula ha ido evolucionando penosamente durante más de cuatro mil millones de años. Fragmentos de alimento se metamorfosean en maquinaria celular. La célula sanguínea blanca de hoy es las espinacas con crema de ayer. ¿Cómo consigue esto la célula? En su interior hay una arquitectura laberíntica y sutil que mantiene su propia estructura, transforma células, almacena energía y se prepara para copiarse a sí misma..."

Carl Sagan
"Cosmos", 1980

En el transcurso de una vida se produce en el cuerpo humano un número de divisiones celulares del orden de 10^{16} . Y ocurrirán, en forma espontánea, aproximadamente unas 10^{-6} mutaciones por gen y por división celular. Así, un gen típico sufrirá probablemente una mutación en unas 10^{10}

ocasiones distintas en cualquier individuo. Entre las células somáticas mutantes existen con seguridad muchas que proliferan fuera de los controles normales o con mayor rapidez que sus vecinas no mutantes. Desde este punto de vista, el problema del cáncer parece que estriba en por qué se produce con tan poca frecuencia.

Para ser capaces de originar un tumor maligno, las células mutantes deben crecer y extenderse hacia el tejido conectivo adyacente, o bien deben enviar colonizadores que puedan viajar a través de los territorios extraños y continuar su proliferación en circunstancias en las que las células normales no lo conseguirían. Las células que proliferan en exceso pero permanecen en su lugar forman tumores benignos, que normalmente se pueden extirpar por completo mediante la cirugía local. En cambio, los cánceres son tumores malignos, formados por células que no desafían simplemente a los controles normales de la proliferación, sino también a los controles normales de la posición. Cuanto más se extienden estas células por el cuerpo, tanto más difíciles resultan de extirpar quirúrgicamente.

Está generalmente admitido que los cánceres humanos, a excepción quizás de los teratomas y de unos cuantos que están originados por virus, se desarrollan a partir de clones mutantes de células. Pero el cuerpo está organizado de tal manera que, aunque muchas células mutan, pocas células mutantes resultan peligrosas. Para generar un cáncer, una mutación debe surgir en una célula que esté en un lugar apropiado y conferir a esta célula unas propiedades nuevas muy complejas. De hecho, existen pruebas que indican que una sola mutación no suele ser suficiente: aparentemente la mayoría de los cánceres se desarrollan sólo después de que se hayan producido múltiples mutaciones en un mismo linaje celular (1, 2).

En los últimos tiempos, una gran parte de la investigación en el campo de la biología celular y molecular se ha dedicado a la búsqueda de la causa y curación del cáncer. La diferencia fundamental entre las células normales y las tumorales se ha explicado de diversas formas: cambios en los niveles celulares de nucleótidos cíclicos, en la fluidez de la membrana plasmática, en las proteínas segregadas, en el citoesqueleto, en los flujos iónicos, etc. Los mecanismos moleculares reales que intervienen en este proceso continúan siendo desconocidos. Sin embargo, se han descubierto diversos factores involucrados en la transformación neoplásica.

Los genes cuya función normal o patológica puede influir en los pasos de desarrollo de un tumor positiva o negativamente pueden ser clasificados provisoriamente como **oncogenes**, **emero genes** (también llamados antioncogenes o genes supresores) y **genes moduladores** (que ejercen su influencia sobre propiedades secundarias importantes del tumor).

En el presente trabajo de tesis se estudiarán algunos oncogenes (myc, N-ras, H-a-ras, Ki-ras, neu) y algunos genes reguladores (de los receptores de estradiol y progesterona) y su rol en el cáncer de mama.

I.- Oncogenes y emerogenes

I.A.- Oncogenes. Su rol en el desarrollo tumoral.

Como son numerosos los virus que provocan tumores en muchos vertebrados, desde los reptiles hasta los monos, parece probable que se pueda demostrar que ciertos virus específicos son la causa de algunos cánceres humanos. Sin embargo, por el momento, la búsqueda ha resultado difícil, y en la actualidad muchos científicos dudan que los virus sean una causa importante de tumores en el hombre.

Los virus perturban el control del crecimiento y de la división celular al integrarse en el genoma del huésped cambiando el nivel de expresión de algunos genes de la célula receptora (mutagénesis por inserción) (3-5) o por

medio de genes propios del virus. Estos últimos pueden ser identificados mediante el método de transformación mediada por el ADN viral, procedimiento en que un fragmento de ADN que contiene solo uno de los genes víricos, se introduce en células en cultivo, donde se integra ocasionalmente en el genoma y se expresa. Algunos de estos fragmentos de ADN harán que la progenie de la célula receptora se transforme en neoplásica, de forma que incluso formarán tumores si se implantan en un huésped animal apropiado. Así se han identificado los **oncogenes**, que comprenden uno o varios loci génicos y son los únicos responsables de la transformación neoplásica de la célula huésped. Se conoce un gran número de oncogenes víricos que actúan en muy diversas especies.

Posteriormente, fue posible aislar oncogenes activos sin la intervención de los virus, a partir de ciertos tumores del ser humano y de otras especies animales. Para estos tumores se ha encontrado que el ADN extraído de las células tumorales, al ser introducido en células normales cultivadas, transmite la propiedad de crecimiento canceroso (6-13). Por medio de técnicas de recombinación del ADN, se han identificado las secuencias de ADN de varios de estos genes activos, y luego se las ha aislado en forma altamente purificada a través del clonado en plásmidos bacterianos.

Para la mayoría de los oncogenes descubiertos existe su correspondiente gen celular normal, denominado por ello **protooncogen**. Por esta razón se plantea que los genes celulares que actúan como oncogenes han sufrido alguna lesión génica que ha incrementado su nivel de actividad o ha alterado la función de sus productos génicos.

I.B.- Oncogenes. Una familia de pocos miembros

Si los oncogenes son formas alteradas de genes normales que usualmente participan en la regulación del crecimiento, es razonable suponer que el número de diferentes oncogenes es pequeño.

La primera evidencia de repetición provino del estudio de un oncogen detectado originariamente en el virus del sarcoma de Kirsten (14), que causa sarcoma en ratas, al que se denominó **ras** (rat sarcoma), (**v-Ki-ras**) y resultó análogo al oncogen del virus del sarcoma de Harvey (15) (**v-Ha-ras**). A su vez, cada uno de estos oncogenes víricos fue hallado análogo, con un solo cambio de base, a los oncogenes detectados en carcinomas humanos de pulmón (16) y colon (17) y de vejiga (18) respectivamente. Una secuencia similar, con otro cambio de base fue encontrada en neuroblastoma y fibrosarcoma humanos, y se denominó **N-ras** (19). Estos genes **ras** codifican proteínas de 21000 daltons que unen GTP y GDP, que se hallan presentes en cantidades muy reducidas en las células normales (20), y por el momento, a nivel funcional, continúan siendo un enigma.

El estudio de un gran número de virus y tumores ha llevado a la identificación de más de 20 oncogenes diferentes.

I.C.- Oncogenes. Inducción tumoral en varios pasos.

En los primeros experimentos de transformación neoplásica realizados en líneas celulares en cultivo -su origen y establecimiento se describen más adelante-, como la de fibroblastos de origen murino NIH 3T3 (21), la presencia de un oncogen activo parecía suficiente para conferir propiedades cancerosas a las células (22-24). Este fenómeno contradecía conceptos establecidos previamente que indicaban

la existencia de por lo menos dos pasos, iniciación y promoción, en la inducción del cáncer.

Sin embargo, al intentar transformar células no inmortalizadas se observó que la activación de un oncogen no era suficiente. En experimentos realizados con células normales de piel de ratón, no se logró transformación neoplásica usando el oncogen **ras** (25). Pero, si las células se trataban previamente con rayos X o con carcinógenos químicos, la transformación sí ocurría (26). Otro oncogen, proveniente de un virus de leucemia de pollo, denominado **myc**, codifica para una proteína nuclear e induce transformación en ciertas líneas celulares pero no transforma células 3T3 (27).

En general, la expresión de una oncoproteína nuclear por sí misma no altera la morfología celular, o el requerimiento de factores de crecimiento, pero puede volver inmortal a las células. Por su parte, las oncoproteínas citoplasmáticas pueden reducir los requerimientos de factores de crecimiento, inducir cambios agudos en las células, pero no inmortalizarlas.

Posteriormente se ha descubierto que los tejidos primarios de fibroblastos de embrión de rata sí se transforman por tratamiento secuencial con los oncogenes **myc** y **ras** (28).

Evidencias de la cooperación entre oncogenes han surgido también de estudios con ratones transgénicos (29, 30, 31). Cepas de ratones transgénicos llevando oncogenes individuales bajo promotores tejido-específicos o ubicuos muestran un nivel de oncogénesis aumentado, pero generalmente los ratones se desarrollan como adultos sanos. En contraste, cuando dos cepas apropiadas de estos ratones se cruzan, la incidencia de tumores es mucho mayor -por ejemplo en ratones proveniente de la cruce de ratones transgénicos que llevan los oncogenes **myc** y **v-ras** (32).

Estos resultados demuestran que la célula normal posee múltiples mecanismos independientes que regulan su crecimiento y potencial de diferenciación, y son necesarios varios eventos separados para superar dichos controles e inducir el fenotipo transformado.

I.D.- Oncogenes. Su clasificación.

Para comprender la bases moleculares de la cooperación entre oncogenes, es necesario conocer la función del producto de los protooncogenes. Generalmente se encuentran muy conservados en la evolución, y en muchos casos juegan un rol central en el crecimiento y desarrollo de las células eucariotas de los organismos más primitivos y también del hombre.

Pueden clasificarse los protooncogenes en base a la función de sus productos. Una manera lógica de hacerlo es comenzar la clasificación con los genes cuyos productos son extracelulares, continuar con los citoplasmáticos y luego con los de localización nuclear.

I.D.1.- Factores de crecimiento

Varios oncogenes codifican para proteínas secretadas que constituyen verdaderos factores de crecimiento, como el **sis**, perteneciente al virus de sarcoma de mono (33), que codifica para la cadena β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y el **hst**, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (34), o son similares a factores de crecimiento, por ejemplo el **int-1** (35). Existen evidencias que indican que estas oncoproteínas actúan via un "loop" autócrino induciendo el crecimiento celular (36).

I.D.2.- Receptores de factores de crecimiento

Un número de oncogenes codifica para formas mutantes de receptores de superficie de factores de crecimiento. Por ejemplo, el oncogen **v-erb B**, es un gen de gran tamaño, parte del cual codifica para una tirosina quinasa (37). Sin embargo, otra parte de la proteína presenta gran analogía con el receptor celular de superficie para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), un inductor de la división celular en una gran variedad de líneas celulares (38). El receptor normal, codificado por su contraparte celular el gen **c-erb B**, es una proteína que atraviesa la membrana plasmática (39). Sólo la porción interna de este receptor es la codificada por el oncogen (39). Es posible que el receptor alterado producido por el oncogen viral modifique el mecanismo regulatorio al que el receptor normal está asociado. Otros ejemplos son el oncogen **v-fms** de sarcoma de gato, que codifica para el receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) (40), el oncogen **kit** (41, 42).

Otros oncogenes codifican para putativos receptores de ligandos desconocidos, como **neu/erbB-2** (42), que se describe más adelante.

I.D.3.- Proteínas asociadas a la cara interna de la membrana citoplasmática.

Dentro de este tipo de oncoproteínas hay dos clases: las de la familia del **src**, oncogen del virus del sarcoma de Rous, (44-46), que poseen actividad de tirosina quinasa y las de la familia **ras**.

I.D.3.1.- Oncogenes con actividad de tirosina kinasa o kinasas asociadas.

Se cree que estas proteínas podrían actuar como subunidades catalíticas de receptores de superficie, como ocurre con la proteínkinasa pp56^{lck}, que se une a los extremos citoplasmáticos de los receptores CD4 y CD8 de las células T, luego de que estos se unen a sus ligandos (47). Otros oncogenes pertenecientes a esta familia son: **abl**, del virus de la leucemia murina de Abelson, (48, 49); **fes**, de un virus de sarcoma de gato (50); **fps**, de un virus de sarcoma de pollo (51-53); **fgr**, de otro virus de sarcoma de gato(54), **yes**, de un virus de sarcoma de pollo (55); **fos**, del virus de sarcoma de ratón (56); **erbB**, del virus de eritroblastosis aviaria (57).

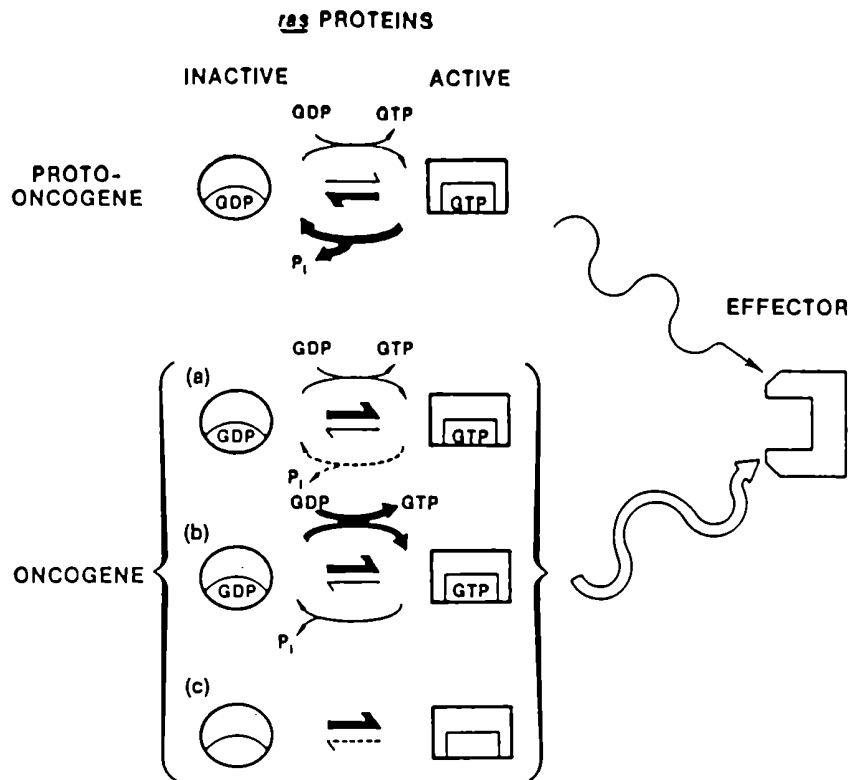
I.D.3.2.- Oncogenes de la familia ras.

Los oncogenes **Ha-ras**, **Ki-ras**, **N-ras**, codifican para una proteína de peso molecular de 21000 Daltons (denominada p21) (58-60).

Las propiedades bioquímicas y biológicas de las proteínas **ras**, y su gran analogía con las proteínas G, han conducido a la idea de que actúan como señales de transducción.

Un modelo de acción propone que las formas activa e inactiva coexisten en equilibrio. En la Figura I.1 se presenta un esquema del mismo. En una célula dada, la mayoría de las moléculas se encuentran en la forma inactiva, que se caracteriza por una conformación que permite la unión de GDP. La proteína **ras** normal permanecerá inactiva hasta recibir un estímulo de otra proteína previa en el camino de transducción de señal. Este estímulo resultaría en el intercambio de GDP por GTP, seguido por un cambio

Figura I.1: Modelo de mecanismo de acción de las proteínas ras



El modelo propone que la proteína ras existe en equilibrio entre los estados activo e inactivo. La mayoría de las moléculas ras en una célula dada existirían en su estado inactivo, caracterizado por una conformación que une GDP. La proteína ras normal permanecerá en su estado inactivo hasta que reciba un estímulo de otra proteína (un receptor?). Este estímulo resultaría en un intercambio de GDP por GTP seguido de un cambio conformacional de la proteína ras a su estado activo, que sería capaz de interactuar con sus putativas moléculas efectoras. Una vez que la interacción entre la proteína ras y el efector ocurriera, sería inmediatamente desactivada, mediante su capacidad intrínseca de actividad GTPasa. La estabilización de la proteína ras en su estado activo causaría un flujo continuo de señal de transducción, que llevaría a la transformación maligna. Estos procesos podrían alcanzarse por mutaciones que inhiban la actividad GTPasa intrínseca de la proteína ras (Figura a), que incrementen la velocidad de intercambio entre GDP y GTP (Figura b) o que induzcan a un cambio conformacional activo que no requiera la unión de nucleótidos de guanina (Figura c). El gen *ras* normal también induce transformación maligna si se sobreexpresa. Altos niveles de la proteína ras normal pueden producir suficientes moléculas en su estado activo, induciendo la transformación maligna sin afectar el equilibrio entre las formas activa e inactiva.

conformacional de la proteína **ras** a su estado activo. Esta sería capaz de interactuar con sus putativas moléculas efectoras. Luego, su actividad GTPasa intrínseca catalizaría la hidrólisis del GTP, llevando a la proteína a su forma inactiva, con unión a GDP. La estabilización de la proteína **ras** en su forma activa mantendría constante la señal enviada, llevando a la transformación maligna. Teóricamente, este proceso puede alcanzarse mediante mutaciones que inhiban la actividad GTPasa intrínseca -lo que se ha comprobado en muchos casos (61-66), que incrementen la velocidad de intercambio entre GDP y GTP -este fenómeno ha sido detectado (67)-, o que induzcan un cambio conformacional a una forma activa que no requiera la unión de nucleótidos de guanina.

Este modelo también toma en cuenta que el gen **ras** normal induce transformación maligna por sobreexpresión (68, 69).

I.D.4.- Oncogenes que codifican para proteínas solubles citoplasmáticas

Incluye a cuatro serina-teronina-kinasas, **Cot**, **Pim-1**, **Mos** (sarcoma y leucemia de ratón) y **Raf** (sarcoma de ratón), (70, 71), y a otras proteínas citoplasmáticas de funciones desconocidas como **Dbl** (71) y **v-Crk** (72).

I.D.5.- Oncogenes que codifican para proteínas de localización nuclear.

Varios de estos oncogenes han demostrado ser factores de transcripción como **myc** (27), **rel** (73) y **v-ErbA** (74). Algunos poseen mutaciones que los convierten en elementos regulatorios negativos como **jun** (75), **fos** (56) y **myb** (76). También incluye a los oncogenes antígeno T de poliovirus (77),

E1A (antígeno de Adenovirus) (78), **B-lym** (79), etc. Estos oncogenes estarían relacionados con la inmortalización de las líneas celulares en cultivo.

I.E.- Oncogenes. Cómo pueden activarse.

Existen dos mecanismos básicos de activación de protooncogen a oncogen: aumento de expresión de un protooncogen o producción de una proteína alterada. Se describen a continuación.

I.E.1.- Aumento de expresión

En este mecanismo, el oncogen no difiere de su contraparte celular. La conversión de protooncogen a oncogen activo se debe a un simple cambio de concentración, que puede ser motivado por diversas alteraciones génicas, a saber,

I.E.1.1.- Cambio del entorno génico. La modificación del entorno de un gen puede producir cambios en la regulación de su transcripción. Esto ocurre cuando se insertan secuencias virales en la vecindad de un protooncogen, quedando regulada su expresión por promotores virales, más fuertes (80).

I.E.1.2.- Translocación. Este es otro cambio que puede llevar a sobreexpresión de un gen, y consiste en una alteración cromosómica en la cual dos cromosomas tienen segmentos intercambiados. Por ejemplo, en el linfoma de Burkitt, fragmentos de los cromosomas 8 y 14 están intercambiados en el 90% de los pacientes, entre los cromosomas 8 y 2 en un 5% de los pacientes y entre los

cromosomas 8 y 22 en el 5% restante (81). En todos los casos el protooncogen **myc** (localizado en el cromosoma 8) se relocaliza adyacente a un gen que codifica para una inmunoglobulina. Esto pone al protooncogen bajo el control de los genes que regulan la síntesis de anticuerpos, que está activada en las células linfocíticas. Otro ejemplo de translocación existe en los pacientes con leucemia mielocítica crónica entre los cromosomas 22 y 9 (82). Esto lleva al protooncogen **abl** (presente también en el virus de la leucemia de Abelson de ratón (48, 49)) del cromosoma 9 al 22.

I.E.1.3.- Amplificación génica. Este mecanismo consiste en una repetición de cierta zona del genoma que contiene el oncogen, que puede aparecer en forma de pequeños cromosomas apareados sin centrómero llamados **DMS** ("double minutes bodies") o en secciones de un cromosoma denominadas **HSR** ("homogeneously staining regions") (83). Ejemplos de este tipo de activación se hallan para el oncogen **myc** en la línea celular de leucemia promielocítica aguda HL60 (84), y para el oncogen **Ki-ras** en una línea celular de carcinoma de colon (85) y en tumor adrenocortical de ratón (86).

I.E.2.- Producción de una proteína alterada.

Como se indicó anteriormente, en la línea celular de cáncer de vejiga T24/EJ, una mutación puntual convierte al protooncogen **Ha-ras** en oncogen (18). Este cambio hace que el residuo 12^a que normalmente es glicina sea valina. También se vio una alteración en el residuo 61^a de la p21 codificada por el **Ha-ras** en carcinoma humano de pulmón (16).

Otro caso de producción de una proteína alterada es la codificada por el oncogen **erb B** que consiste en la porción

intena del receptor del factor de crecimiento epitelial EGF (40), como ya se describió anteriormante.

El producto proteico del oncogen **erb A** (87) es un derivado del receptor de las hormonas tiroideas y se cree que promueve la producción de leucemia actuando como un factor de transcripción tirosina independiente (88). Por mecanismos desconocidos, cambios en la región de unión al ligando aparentemente activan al receptor, otorgándole una configuración similar a la que produce la unión del ligando.

Este es un ejemplo de cómo la pérdida de control alostérico puede conferir patogenicidad al producto de un oncogen.

I.F.- Emerogenes.

Se denomina con el término **emerogenes** -emero, del griego, domar, domesticar- a los genes normales que pueden actuar como antagonistas de los oncogenes. Algunos de ellos controlan la maduración celular. Son también llamados **antioncogenes**, o **genes supresores** de tumores, y pueden contrarrestar el comportamiento tumoral a varios niveles.

Diversos sistemas los han puesto de manifiesto. La hibridización somática de células normales con malignas lleva a la supresión del fenotipo tumorigénico en la mayoría de las combinaciones donde los híbridos mantienen un complemento cromosómico relativamente completo y la reaparición de la tumorigenicidad está acompañada de pérdida cromosómica (89-96). Han sido aisladas revertantes morfológicas y no tumorigénicas a partir de células transformadas viral y químicamente, no siempre generadas por la pérdida o inhibición del gen transformante original (97, 98).

La pérdida o inactivación por mutación de genes supresores de tumores juega un rol esencial en la génesis de los cánceres humanos retinoblastoma, tumor de Wilms,

osteosarcoma, indicando que los alelos normales de los genes involucrados pueden evitar transformaciones neoplásicas en los tejidos correspondientes (99). En estos casos se necesita la inactivación de ambos alelos para que la transformación neoplásica pueda proceder. Se trata de **mutaciones negativas recesivas**.

El protooncogen **p53** también pertenece a la familia de los genes supresores (100). Se ha observado que la sobreexpresión de su forma activada, en conjunción con la acción del oncogen **ras** activado produce transformación en células primarias de roedores (101, 102). Su activación se produce por mutación de una región que abarca el 25% de su secuencia aminocídica (103). Esta observación sugiere que la activación estaría asociada a una pérdida de función de la proteína p53. La mutante, al sobreexpresarse, podría actuar de manera dominante en trans, inactivando la proteína p53 normal, mediante la formación de complejos proteicos multiméricos no funcionales (104). Este es un caso interesante de **mutación negativa dominante**.

El estudio de estos genes es experimentalmente más dificultoso que el de los oncogenes, pero probablemente sus resultados sean aún más provechosos para lograr la comprensión de los complejos mecanismos que regulan la actividad celular.

I.G.- Oncogenes. Su rol en los tumores sólidos humanos.

Han sido observadas modificaciones estructurales y funcionales en protooncogenes en diversas patologías humanas. Este hecho ha llevado a numerosos investigadores a explorar la posibilidad de que los oncogenes posean la suficiente significación patogénica en la tumorigénesis para

servir de marcadores genéticos. Por ejemplo, la amplificación y sobreexpresión del oncogen **N-myc** (105) se correlaciona con un peor pronóstico en los niños con neuroblastoma (106). Similarmente, pacientes con mielodisplasia que poseen alelos mutados de **c-Ki-ras** o **c-Ha-ras** en la médula ósea son propensos a desarrollar leucemia (107), y mutaciones en **c-Ha-ras** y **N-ras** pueden jugar un rol en la progresión de la leucemia mielógena crónica a la fase aguda (108).

Recientemente, un nuevo gen transformante fue identificado por estudios de transfección con ADN proveniente de neuroglioblastomas inducidos químicamente en ratas (109). Este gen, llamado **neu** está relacionado con el protooncogen **erb-B** (42). Usando sondas del **v-erb-B** y del receptor humano de EGF para analizar una biblioteca de ADNc humano, otros dos grupos aislaron independientemente clones de secuencias relacionadas al **erb-B**, que denominaron **Her-2** (110) y **c-erb-B-2** (111). Subsecuentes análisis de localización cromosómica y secuencia revelaron que los tres genes eran idénticos (110, 112, 113). Un cuarto grupo, usando también la sonda **v-erb-B** identificó el mismo gen en una línea de carcinoma mamario MAC 117, donde se encuentra amplificado de 5 a 10 veces (114).

Este gen **neu** codifica para un nuevo miembro de la familia de los oncogenes con actividad de tirosina kinasa; posee un dominio extracelular, otro transmembrana, que incluye dos regiones repetitivas ricas en cisteína, y otro intracelular con actividad de kinasa (42), lo que indica que probablemente se trate de un receptor de un factor de crecimiento aún desconocido.

Estudios del gen **neu** aislado de neuroblastoma inducido químicamente revelaron que contiene una mutación puntual en el dominio de transmembrana que lo distingue del gen no

transformante encontrado en los tejidos normales de rata (115).

En 1987, se publicaron reportes que indicaban que el oncogen *neu* se encontraba amplificado con relativa frecuencia en los tumores primarios de mama, y dicha amplificación se correlacionaba con el número de ganglios linfáticos metastatizados, y la sobrevida del paciente (116). Estudios posteriores confirmaron que la amplificación también se encuentra en correlación con su expresión medida a nivel de ARN y de proteína (117).

El análisis de la secuencia del *neu* aislado de algunos tumores de mama reveló que no existen diferencias con respecto de la secuencia encontrada en placenta (117), lo que indica que la sobreexpresión del gen normal más que la mutación del gen alterado puede ser un evento patogénicamente importante.

II.- Regulacion hormonal

Considerando que la pérdida de control del crecimiento es una de las características esenciales de la célula tumoral, analizar los diversos mecanismos que lo regulan puede ser una buena estrategia para estudiarla. Existen diversos factores proteicos y no proteicos que inducen la proliferación en determinados tipos celulares. En algunos casos se ha demostrado que alteraciones en su estructura o niveles de producción están asociadas al desarrollo tumoral. Ejemplos de ello son los oncogenes asociados a factores de crecimiento como el v-erb B o el v-sis, descritos anteriormente.

Las hormonas también participan del control de crecimiento de las células de sus órganos blanco, y son factores a tener en cuenta al estudiar un tumor originado en ellos.

II.A.- Hormonas esteroideas.

II.A.1.- Hormonas esteroideas. Su clasificación.

Desde comienzos de siglo hasta el presente el conocimiento de los órganos endócrinos y de la fisiología que ellos coordinan ha avanzado enormemente (118, 119). Tres clases principales de hormonas esteroideas fueron descritas en base a ensayos biológicos: los esteroides adrenales (incluyendo cortisol y aldosterona), la vitamina D₃, y los esteroides sexuales (progesterona, estrógeno y testosterona). Estas moléculas mostraron ser de gran importancia para el desarrollo y la fisiología normales de los vertebrados y, en consecuencia, se han vuelto el centro de numerosas investigaciones biológicas y clínicas (120-122).

Los esteroides adrenales actúan sobre la homeostasis, controlan el metabolismo de glucógeno y minerales y median en la respuesta a stress.

La vitamina D₃ es necesaria para el normal desarrollo de huesos y actúa en el metabolismo del calcio.

Los esteroides sexuales provocan la determinación y el desarrollo del sistema reproductivo embrionario, controlan la reproducción y el comportamiento reproductivo en el adulto, y el desarrollo de las características sexuales secundarias.

II.A.2.- Hormonas esteroideas. Su biosíntesis y estructura.

Los esteroides son derivados del hidrocarburo tetracíclico saturado perhidro-ciclopentanofenantreno. Los diversos esteroides difieren en el número y la posición de

sus enlaces doble, en el tipo, localización y número de sus grupos funcionales sustituyentes, etc.

Todos los esteroides se originan a partir del escualeno, triterpeno lineal que se cicla con facilidad. El primer producto esteroide importante de esta ciclación es el **lanosterol**, precursor del **colesterol** en los tejidos animales. Ambos se encuentran en forma de alcoholes libres o de ésteres de ácidos grasos de cadena larga. El colesterol es precursor de todos los esteroides y también de los ácidos biliares.

Las estructuras de estas hormonas se muestran en la Figura I.2.

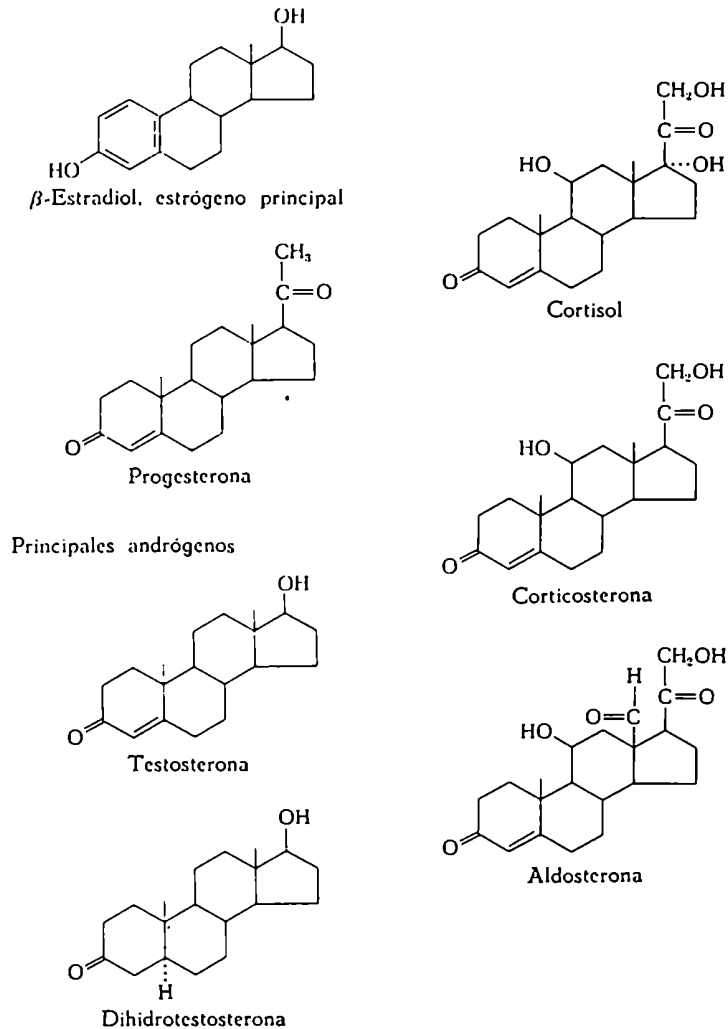
II.A.3.- Hormonas esteroideas. Descubrimiento de sus receptores.

¿Cómo pueden moléculas tan simples como las hormonas producir tal diversidad de respuestas complejas?

La primera explicación fue provista por la identificación de receptores hormonales, a través de la utilización de ligandos radioactivos, en los inicios de la década del '70 (123, 124). En cada caso, la hormona ejerce un cambio en el receptor tal que éste se asocia con alta afinidad a sitios de unión en la cromatina. Esto lleva a la inducción o a la represión de un número limitado de genes (125). La selectividad se alcanza, en parte, por la expresión restringida de los diferentes receptores en células y tejidos específicos. Como la cromatina está estructuralmente organizada de manera diferente en cada tipo celular, diferentes grupos de genes pueden ser accesibles al complejo hormona-receptor.

El desarrollo de análogos sintéticos de alta afinidad por los receptores de los ligandos en los inicios de la

Figura I.2: Estructura química de las principales hormonas esteroideas



Principales hormonas esteroideas. Todos los esteroides tienen como precursor común al colesterol, y difieren entre sí en el número y la posición de los dobles enlaces, en el tipo, localización y número de sus grupos funcionales constituyentes, en la configuración (α o β) de los enlaces entre sus grupos sustituyentes y el núcleo, y en la configuración que adoptan los anillos entre sí.

Se muestra la estructura de estradiol, el más importante de los estrógenos u hormonas femeninas, la testosterona y la dihidrottestosterona, los andrógenos u hormonas masculinas más importantes, la hormona progestativa progesterona y las principales hormonas esteroideas del córtex adrenal: cortisol, aldosterona y corticosterona.

década del '80 (126, 127) permitió el aislamiento de los receptores hormonales (128-131), tarea difícil de encarar debido a que se encuentran presentes en cantidades reducidas, del orden de trazas (10^3 - 10^4 moléculas por célula).

II.A.4.- Hormonas esteroideas. Descubrimiento de sus secuencias blanco en el ADN.

La purificación y la caracterización bioquímica de los receptores hormonales fueron acompañadas por la identificación de una variedad de genes respondedores a las hormonas esteroideas (130-133). Muchos de estos genes han sido aislados y se ha demostrado que están transcripcionalmente regulados por dichas hormonas (134). Estudios de transferencia génica con promotores de genes tales como ovoalbúmina y vitelogenina A2 han permitido identificar secuencias cortas que actúan en cis en la activación hormonal de la transcripción (135). Estas secuencias, denominadas elementos respondedores a hormona (**KRHs**) funcionan de manera independiente respecto de la posición y orientación, comportándose como verdaderos "enhancers" transcripcionales (136-139) y frecuentemente se halla más de uno en la región 5' flanqueante de los genes respondedores (140). Pero, a diferencia de otros "enhancers", su actividad depende de la presencia o ausencia de un ligando. Estos estudios sugieren que la regulación transcripcional deriva de la unión del complejo hormona-receptor a los sitios **KRHs** en el ADN. Esta interpretación ha sido verificada por análisis de "footprint" *in vitro*, que permite identificar las secuencias de una molécula de ADN que interactúan con proteínas determinadas, y reveló que los receptores purificados de glucocorticoides, estrógeno y progesterona, entre otros, se unen a secuencias localizadas

adyacentes al extremo 5'-o sea "upstream"- de los genes respondedores, en sitios que corresponden a los KRHs genéticamente identificados (141-147).

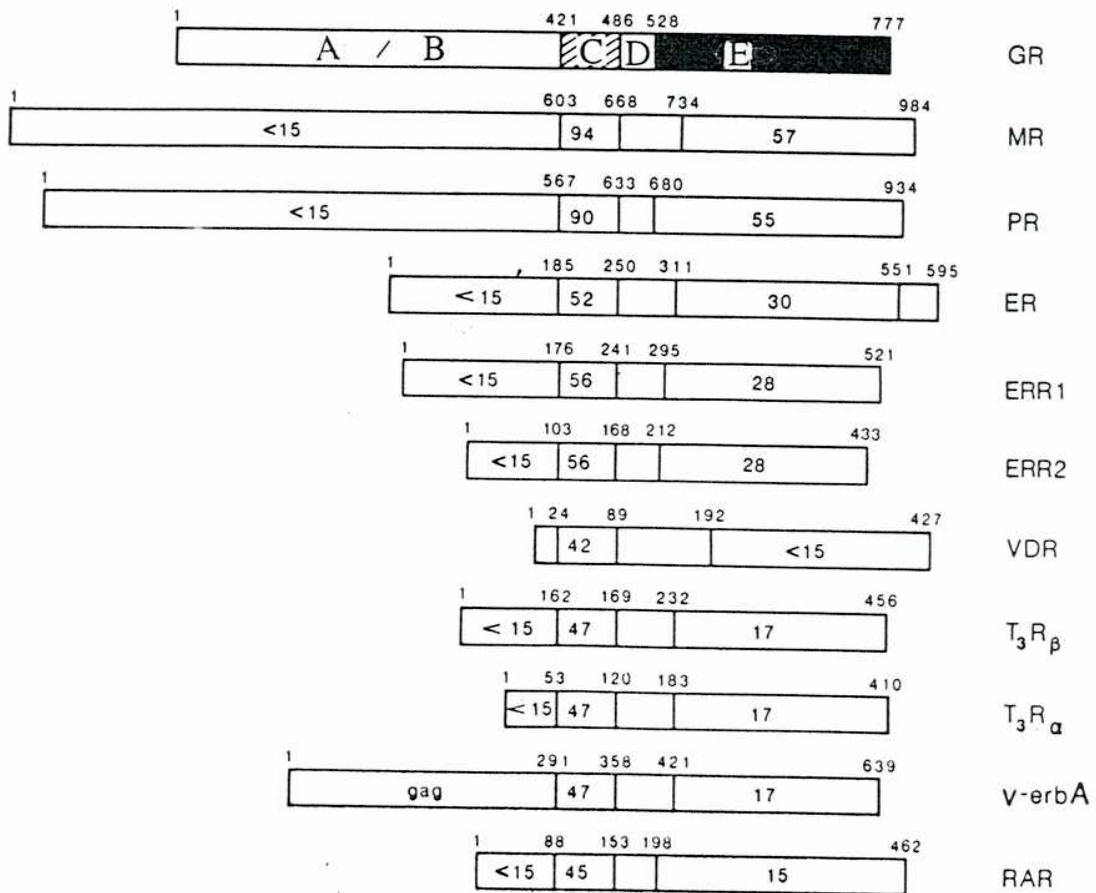
II.B.- Receptores hormonales.

II.B.1.- Receptores hormonales. Análisis de su estructura molecular.

El aislamiento de los ADNc de los receptores esteroideos ha llevado a la identificación de una familia de genes relacionados que une ligandos de una diversidad remarcable. La expresión del receptor estrogénico y de glucocorticoide humanos clonados (RE y RG respectivamente) proveyó las estructuras completas de dichos receptores esteroideos y reveló la presencia de un segmento sorprendentemente relacionado con el oncogen viral *erb A* (148-150), identificado luego como el análogo viral del gen celular correspondiente al receptor de hormonas tiroideas (151, 152). La analogía fue confirmada posteriormente por el clonado de los receptores de progesterona (RPg), aldosterona, vitamina D₃ y retinoides (153-164). Este hallazgo representó un avance crítico, pues sugería una hipótesis unificada para la estructura de receptores y la acción hormonal. En la Figura I.3 se muestra la familia de receptores, en donde las moléculas han sido alineadas en base a las regiones de máxima homología. El número indica la extensión de identidad de secuencia con el receptor de glucocorticoides humano.

La secuencia del "core" central es rica en residuos cisteína, lisina y arginina, y está altamente conservada (de 42 a 94% de homología). La región adyacente es de homología paralela a la relación entre las hormonas.

Figura I.3: Familia de receptores de hormonas esteroideas



Comparación esquemática de secuencia de aminoácidos entre los diferentes receptores de hormonas esteroideas. La división en regiones A, B, C, D y E indica zonas con diferente grado de homología. Las secuencias primarias de aminoácidos han sido alineadas en base a las regiones de máxima similaridad, con el porcentaje de identidad indicado para cada región con respecto al receptor de glucocorticoides (GR). Las denominaciones son las siguientes: MR: receptor de mineralocorticoides; PR: receptor de progesterona; ER: receptor de estradiol; ERR1 y ERR2: genes relacionados con ER; VDR: receptor de vitamina D₃; T₃R_β y T₃R_α: receptores de hormonas tiroideas; v-erb-A: oncogen de eritroblastosis aviaria; RAR: receptor de ácido retinoico.

La estructura amino terminal no está conservada, y puede contribuir a diferencias funcionales entre los receptores.

II.B.2.- Receptores hormonales. Dominios funcionales.

El modelo clásico de acción de las hormonas esteroideas propone que el ligando se une al receptor e induce un cambio alostérico que permite al complejo hormona-receptor unirse a sus **ERHs** en la región promotora del gen blanco de la acción hormonal. El clonado del ADNc de los receptores proveyó la oportunidad de analizar este fenómeno a nivel molecular, e identificar los dominios funcionales de unión a la hormona, de unión al ADN y de transactivación.

En base al grado de homología entre los diferentes receptores se definieron 5 regiones en la molécula de receptor, que se mencionan desde el extremo amino terminal como A, B, C, D, E (Figura I.3).

II.B.2.1.- Dominio de unión al ADN.

La suposición inicial fue que este dominio estaba incluido en el "core" central altamente conservado de la proteína -correspondiente a la zona C-. Tres hechos soportaban esta idea:

- a) la existencia de una región de residuos básicos, capaces de interactuar con el ADN;
- b) la presencia de un motivo rico en cisteína, ya encontrado en otras moléculas que interactúan con el ADN;
- c) la alta homología de ese "core" entre los receptores.

Para verificarlo, diferentes partes de esta región fueron mutadas. Estos receptores alterados continuaron uniéndose a la hormona, pero no se unieron al ADN (165-168).

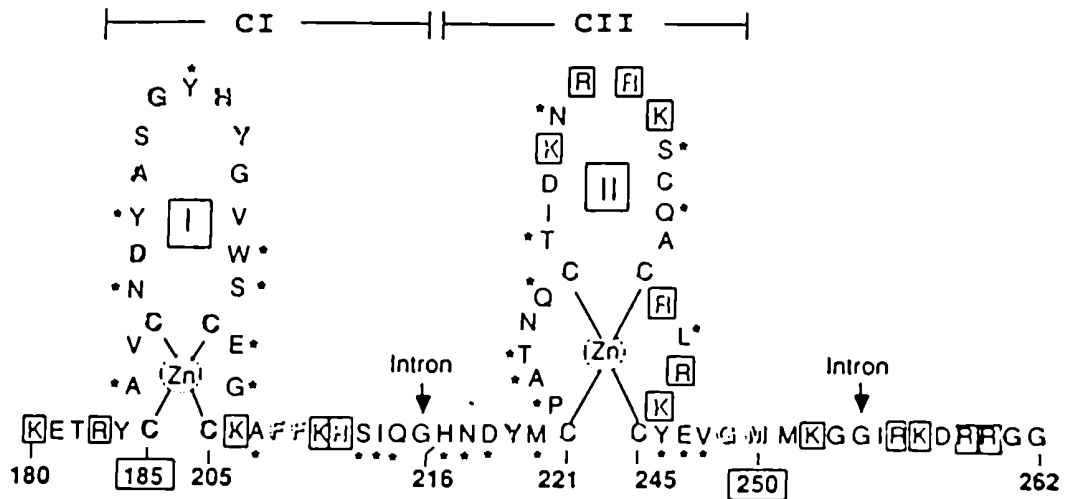
Una prueba funcional directa fue realizada sustituyendo el dominio de unión a ADN del receptor estrogénico humano por el del receptor de glucocorticoides humano, resultando un receptor híbrido, activador de genes respondedores a glucocorticoides por acción de estradiol (169).

Un hecho interesante de esta región es la conservación de los residuos cisteína, posicionados de manera similar al motivo originalmente observado en el gen 5S del factor de transcripción TF IIIA (170) cuyas múltiples unidades repetitivas forman aparentemente una estructura de "dedos", coordinada por un complejo tetrahédrico con el ion Zn^{++} .

Mediante espectroscopía de absorción de rayos X, se ha confirmado la unión de esta región correspondiente al receptor de glucocorticoides de rata a los dos átomos de Zn^{++} (171). Se propone que esta estructura interactúa con la hélice de ADN. La función de los dos "dedos" presentes en los receptores esteroideos se verificó mediante la obtención de moléculas incapaces de unirse al ADN eliminando las cisteínas por mutagénesis dirigida (169) o el ion Zn^{++} utilizando quelantes del mismo (172). Un esquema de dicha estructura se muestra en la Figura I.4.

Los "dedos de Zn" se encuentran codificados en diferentes exones (173); este hecho sugiere que corresponden a dominios funcionales separados, y estudios recientes parecen confirmarlo. El análisis detallado de esta región correspondiente al RE mostró que el primer "dedo de Zinc" - el N-terminal- es el que determina la especificidad génica (174). El modelo propuesto consiste en que el receptor se une a sus secuencias ERHs como un dímero, con el primer "dedo de Zinc" de cada monómero en la hendidura mayor de la hélice de ADN, reconociendo una mitad de la secuencia palindrómica de ERH, y que el segundo dedo estaría involucrado en uniones no específicas a ADN y en el contacto entre dos monómeros de RE.

Figura I.4: Estructura de "dedos de Zinc" de la region C del RE



Estructura hipotética de la región C del receptor estrogénico -aminoácidos 185-250-, que se halla altamente conservada entre los diferentes receptores. Se indican dos subregiones CI -aminoácidos 185-215- y CII -aminoácidos 216-250-. Cada región contiene cuatro residuos cisteína altamente conservados que pueden coordinarse en una estructura tetrahédrica con el ion Zn^{2+} , formando un "dedo de Zinc". Las regiones CI y CII están separadas por un intrón. Los aminoácidos básicos están recuadrados. El asterisco indica divergencia entre los receptores de estradiol y glucocorticoides.

II.B.2.2.- Dominio de unión a la hormona.

La región E es la parte del receptor que interactúa con la molécula de hormona y se localiza en la zona carboxi-terminal.

Esta región es esencial para una eficiente transcripción y su característica común es la hidrofobicidad (155, 168).

II.B.2.3.- Región amino-terminal.

En contraste con los demás dominios, la región aminoterminal (A/B) es hipervariable en medida y composición aminoacídica.

En el receptor de progesterona esta región tiene un alto contenido de prolina, que la hace flexible y susceptible de cambios conformacionales (161).

Los estudios de esta región indican que es de importancia para la funcionalidad de los receptores. Para el receptor estrogénico, la delección de esa zona no hace perder el efecto inductor sobre el promotor de vitelogenina pero sí sobre el de otra proteína inducida por estradiol, pS2 (175).

Para el receptor de progesterona existen dos formas, A y B, que difieren en 128 aminoácidos de la región amino-terminales, y poseen diferente capacidad regulatoria de la expresión génica (176).

II.B.2.4.-Región D.

La región D, hidrofílica, no conservada en secuencia ni en longitud entre diferentes especies (150, 151, 154, 155), puede actuar como bisagra entre las dos regiones de unión al

ADN (C) y unión a la hormona (E). Sin embargo, pueden ser modificada su composición y su longitud sin que se pierda la función del receptor (170).

II.B.3.- Receptores hormonales. Un gen ancestral común.

A pesar de la gran analogía de secuencia, sus genes están distribuidos en diferentes cromosomas del genoma humano: el gen del receptor de glucocorticoide en el cromosoma 5, el gen RE en el 6, el c-erb A en el 17, el gen de la vitamina D₃ en el 12, el gen RPg en el 11, y el receptor del ácido retinoico en el 17 (177-179).

Se puede especular que la región C de los receptores, que interacciona con el ADN, representa un gen primordial. Esta unidad génica se habría duplicado y dispersado a través del genoma, donde la subsecuente adquisición de exones habría provisto los dominios funcionales adicionales para esta familia de genes, análogamente al proceso involucrado en el ensamblado de los genes de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (180).

II.B.4.- ¿Cómo funciona el receptor estrogénico?

La unión de la hormona al dominio E del RE es requerida para la unión fuerte a los núcleos y para la activación de la transcripción de los genes blanco. Presumiblemente, la acción de la unión de la hormona sea modificar la estructura del receptor de tal manera que permite su unión a los ERHs. Experimentos de "footprint" realizados con el receptor de glucocorticoides demuestran que el RG se une a sus ERHs sólo en presencia de glucocorticoides (181). Se ha propuesto que la única función del dominio de unión a la hormona sería la de bloquear el dominio de unión a ADN y/o el dominio

responsable de la activación de la maquinaria de transcripción. Estudios realizados con mutantes del RE sin el dominio de unión a la hormona confirman esta hipótesis, pues demostraron capacidad de unirse a sus ERHs (170). Este enmascaramiento puede deberse a un bloqueo físico de la región C por la E, o a una estructura impuesta por la región E no ocupada que mantiene a la región C en una forma inactiva, o a una asociación del receptor no ocupado con otras proteínas, resultando un complejo inactivo. Sin embargo esta no puede ser la única función del dominio de unión a la hormona, pues mutantes que no lo poseen solo activan la transcripción muy pobremente (170). Existen varias posibilidades de acción de dicha región. Puede actuar directamente con algún componente de la maquinaria transcripcional o influenciar la habilidad de otras regiones del receptor de interactuar con esos componentes. Alternativamente, la función de activación de la región E podría estar relacionada con la propiedad del receptor de formar un complejo homodímero 5S en presencia de la hormona. En dicha dimerización existe interacción de los dominios de unión a la hormona (182). Como los ERHs para el estradiol son palindrómicos, tanto en el gen de vitelogenina de pollo como de *Xenopus* (183) el RE puede necesitar dimerizarse para aumentar la transcripción eficientemente. Esto podría explicar por qué los mutantes de receptor que carecen del dominio E, y por lo tanto están presentes como monómeros, son activadores pobres.

II.B.5.- Receptor de progesterona. Sus características particulares.

El RPg es el único de la familia de receptores que presenta dos formas proteicas en iguales cantidades en

extractos citosólicos, ya sea en células de oviducto de pollo como en la línea celular de cáncer de mama T47D (184-187), aunque en conejo se ha hallado una forma de receptor única (188, 189). Dichas formas se denominan A y B, y poseen un peso molecular de 79.000 Daltons y 109.000 Daltons respectivamente (190). Se encuentran estructural e inmunológicamente relacionadas y ambas son capaces de reconocer a sus elementos respondedores en el ADN ((191). Existen evidencias de que la forma A corresponde a la forma B truncada en la región aminoterminal (192). Ambas estarían codificadas en un único mRNA de 4472 bases, el que por ensayos de traducción in vivo e in vitro rinde una proteína idéntica a la forma B. El ADNc del receptor de progesterona posee dos secuencias AUG, potenciales sitios de iniciación de la transcripción. La expresión in vitro del ADNc sin las secuencias que se hallan 5' del segundo sitio AUG, codificante de metionina en posición 128, resulta en la aparición de una proteína indistinguible de la forma A natural, tanto por sus características electroforéticas, como de unión a ADN (193). Esto indica que dicha forma podría corresponder ya sea a una iniciación interna de la traducción o a una proteólisis específica de la forma B muy cercana a la metionina 128. Sin embargo, trabajos posteriores indican que se trata de dos proteínas codificadas por dos ARNm diferentes que se transcriben a partir de distintos promotores, ambos bajo control del E₂ (194).

En cuanto a los diferentes dominios del RPg, la conservación de la secuencia aminoacídica de los receptores correspondientes en pollo, conejo y hombre, sugiere que poseen la misma función que los dominios homólogos en los receptores de estradiol y glucocorticoide.

La función de las regiones C y D, como sitios de unión a ADN y a la hormona respectivamente, han sido

confirmadas experimentalmente. Se ha demostrado que la zona E de unión a la hormona es esencial para la activación de los elementos respondedores (193). La región A/B, "downstream" de la metionina 128 también es indispensable para la función activadora de la transcripción del receptor (193).

Puede especularse que la diversidad de formas del RPg provea un mecanismo de selectividad de la inducción. Se han encontrado evidencias a favor de esta hipótesis que muestran que la forma truncada del receptor, A, es capaz de actuar sobre los **KRHs** del gen de ovoalbúmina y sobre secuencias de origen viral, mientras que la forma completa, B, actúa sólo sobre las secuencias de origen viral (195). Esto indica que estos factores de transcripción cooperan diferencialmente con las dos formas del receptor. Además, la existencia de transcripción de este gen a partir de más de un promotor proveería una flexibilidad adicional en el control de la expresión génica.

III.- Cáncer de mama

III.A.- Cáncer de mama. Estadísticas.

El cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres. Uno de cada cuatro tumores de la mujer aparece en la mama. Estadísticas en Argentina indican que 1 cada 15 mujeres desarrolla cáncer de mama en alguna etapa de su vida. Para las mujeres norteamericanas la chance es de 1 en 10. El 75% de los carcinomas aparece entre los 40 y los 55 años, y es la principal causa de muerte de las mujeres entre 35 a 50 años.

III.B.- Glándula mamaria. Su anatomía normal.

Las glándulas mamarias son estructuras dinámicas que van sufriendo modificaciones estructurales en la infancia, pubertad, madurez, senectud, y con las distintas etapas funcionales: menarca, embarazo, lactancia y menopausia.

La mama adulta es una glándula compuesta de origen cutáneo; su estructura está formada por lóbulos (15 a 20), que convergen en el pezón de manera radial y contienen en su

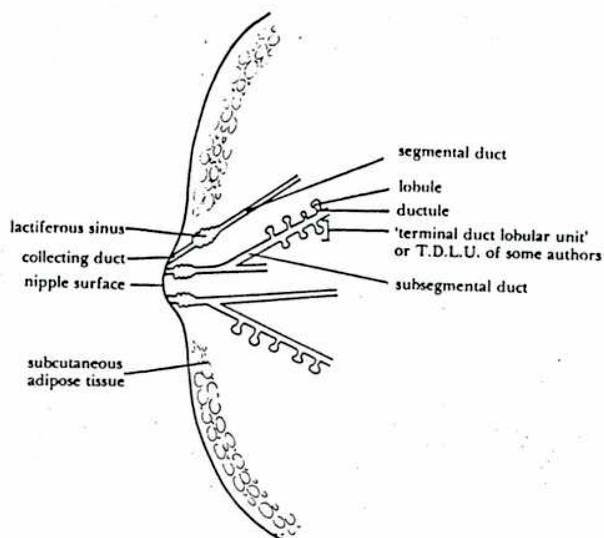
interior numerosos lobulillos secretores, como se muestra en la Figura I.5. La región del pezón contiene los conductos denominados ductos segmentales convergentes cada uno abierto a un espacio de contornos irregulares, el seno lactífero. Los senos se comunican con la superficie del pezón vía los ductos colectores o galactóforos. La estructura del pezón y la aréola es distintiva y especializada, con numerosas glándulas sebáceas. Rodeando los lóbulos y lobulillos se encuentra abundante tejido conectivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y terminaciones nerviosas. La glándula mamaria se encuentra rodeada de tejido adiposo, en una capa superficial (que se afina hacia el pezón) y una profunda, que se interpone entre la glándula y el músculo pectoral mayor, lo que permite su desplazamiento sobre la pared torácica.

El sistema epitelial ductal-lobular de la mama comprende dos tipos celulares que se disponen en un arreglo característico, como se observa en la Figura I.6, ideal para permitir la gran distensión que ocurre durante la lactancia. La apreciación de los mismos es extremadamente importante para distinguir entre enfermedades benignas y tumores malignos. Por ejemplo el carcinoma tubular no presenta los dos tipos celulares.

En el tejido conectivo normal lobular y también en el periductal se encuentran un gran número de núcleos de fibrocitos, algunos linfocitos y ocasionalmente histiocitos.

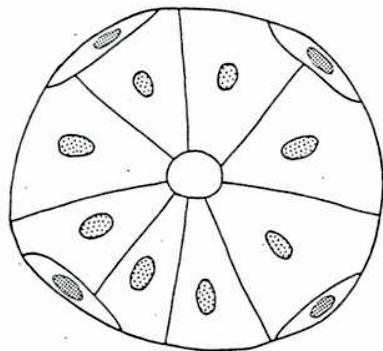
La actividad funcional de todo el sistema lobular-ductal comprende la secreción y la absorción. Que la secreción ocurre durante la lactancia es evidente, pero el parénquima de la mama secreta también en estado de reposo. Esta secreción no aparece generalmente en el pezón porque los ductos se encuentran ocluidos por queratina. En la mayoría de los carcinomas la secreción está alterada cuantitativa y cualitativamente.

Figura I.5: Esquema de la anatomía de los conductos mamarios



Se muestra en forma esquemática la principales estructuras anatómicas de la glándula mamaria. Fuente: Azzopardi (1979). "Problems in Breast Pathology", J.L. Bennington, Ed., W.B. Saunders Company Ltd London-Philadelphia-Toronto.

Figura I.6: Arreglo celular del lobulo mamario



Se muestra un esquema del arreglo en que se disponen las células epiteliales y mioepiteliales -estas últimas ubicadas en la periferia- en el acino mamario, para permitir la gran distensión que se produce durante la lactancia. Fuente: Azzopardi (1979). "Problems in Breast Pathology", J.L. Bennington, Ed., W.B. Saunders Company Ltd London-Philadelphia-Toronto.

III.C.1.- Carcinoma mamario. Definición.

En la mama, el desarrollo tumoral puede afectar tanto a los tejidos epiteliales como a los conectivos. No obstante, los **sarcomas**, cánceres de tejido conectivo puro, son raros. Más del 85% de los tumores mamarios humanos se originan en el epitelio, y se denominan **carcinomas**.

Muchos tumores malignos de mama se originan en la proliferación de las células que componen el revestimiento de los conductos, las que se mantienen dentro del conducto, bloqueando gradualmente su luz. El crecimiento subsiguiente puede adoptar la forma de una extensión de túbulos similares a los conductos o de cordones sólidos de epitelio atravesando el tejido conectivo circundante, o de células que pueden emigrar solas o en grupos desde la pared del conducto para infiltrarse entre los elementos del estroma.

III.C.2.- Carcinoma mamario. Diagnóstico.

Cuando un tumor es lo suficientemente grande como para ser percibido al tacto es generalmente de más de 1 cm de diámetro -esta medida es considerada el mayor punto de retorno- y contiene 1×10^9 células cancerosas, algunas de las cuales pueden haber llegado al torrente sanguíneo y comenzado a infiltrar otros órganos como cerebro, huesos, hígado o pulmón.

El método de diagnóstico precoz en el cáncer de mama es la mamografía, técnica que detecta tumores de menos de 0.5 cm de diámetro, antes que la metástasis se haya iniciado - este estadio se denomina carcinoma "in situ"-.

Los vasos linfáticos que llegan a las mamas están en comunicación con los ganglios axilares y constituyen una de las vías más rápidas por la que pueden viajar las células

tumorales para metastatizar. Es por ello que el análisis de los mismos reviste gran importancia para determinar el grado de avance de la enfermedad.

III.C.3.- Carcinoma mamario. Hormonodependencia.

Desde que en 1896 se describió por primera vez la regresión de un tumor de cáncer de mama inoperable luego de una ovariectomía (196), la modulación hormonal de esta patología ha sido intensamente analizada. El estradiol, producido por los ovarios en las mujeres premenopáusicas, favorece el crecimiento tumoral. Los estrógenos también se producen en los adipositos -por aromatización periférica de andrógenos- por lo que las mujeres obesas tienen niveles más altos de estrógeno que las delgadas, un probable factor de riesgo luego de la menopausia.

Con la intención de identificar los tumores hormonodependientes se realiza el análisis de RE en las biopsias de tumores mamarios (197). De 55% a 65% de los tumores primarios y de 45% a 55% de las metástasis expresan el RE -son RE positivos- (198). De los positivos, 50-65% responden objetivamente a terapia endocrina, ya sea por suministro de antagonistas del E₂- o por cirugía ablativa (199, 200). La fisiología de esta respuesta celular no ha sido completamente dilucidada. Defectos en el complejo sistema regulatorio pueden explicar el 35-50% de tumores RE positivos que no presentan respuesta clínica (201).

El contenido de RE posee también valor pronóstico, siendo los tumores negativos los más agresivos (202, 203).

La presencia de RPg en los tumores mamarios está asociada también a hormonodependencia, y a una sobrevida prolongada (204, 205). Se considera frecuentemente que la hormona progesterona ejerce un efecto protector contra el

desarrollo de cáncer de mama, por ejemplo, a través de una lactancia prolongada (206).

Actualmente, se hallan bajo estudio una variedad de proteínas que podrían servir de marcadores funcionales del sistema regulatorio estrogénico y proveer información adicional. Estas proteínas incluyen pS2 y catepsina D (207).

El gen pS2 fue identificado inicialmente por un rastreo diferencial de una biblioteca de ADN complementario derivada de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 -que se describe más adelante- crecida con o sin estrógenos (208). En esta línea celular su expresión está controlada a nivel transcripcional por estradiol (E₂) (209, 210). Ha sido demostrado que el ARNm de la proteína pS2 puede detectarse en 67% de los tumores RE-positivos y sólo en un 4% de los RE-negativos. Se han hallado muchos tumores RE-positivos, pS2-positivos y RPg-negativos, sugiriendo que la presencia de las proteínas pS2 y RPg podría estar caracterizando diferentes subgrupos de tumores RE-positivos (211).

El gen pS2 se expresa en forma constitutiva en las células normales de la mucosa estomacal y no se ha detectado en ningún otro tejido humano de los muchos analizados (212).

Estudios realizados analizando el nivel de proteína pS2 por inmunohistoquímica en tumores primarios de cáncer de mama avanzado sugieren que puede ser un indicador de funcionamiento del sistema de regulación estrogénica y predecir la respuesta clínica a la terapia hormonal (213).

Otro probable marcador biológico en el cáncer de mama es la catepsina D, proteasa lisosomal inducida por estradiol en ciertas líneas celulares que expresan el receptor estrogénico, y que se expresa en forma constitutiva en otras líneas de cáncer mamario RE-negativas (214, 215). Estudios realizados sobre biopsias de tumores mamarios indican que su concentración es significativamente mayor en el tejido maligno que en el normal de mama, y que las pacientes que

presentan altas concentraciones de catepsina D poseen un período de supervivencia más corto que aquellas que poseen bajas concentraciones (216). Sin embargo, otros trabajos arriban a conclusiones opuestas (217). La verdadera utilidad de este marcador podrá determinarse en un futuro cercano cuando se realicen estudios retrospectivos que involucren a mayor número de pacientes.

3.C.4.- Carcinoma mamario. Tratamiento.

Tradicionalmente, la paciente con carcinoma mamario era sometida a una extirpación total de la mama afectada (mastectomía). Sin embargo, la tendencia actual es la de realizar cirugías más conservadoras. Se ha demostrado que la tumorectomía o remoción del tumor canceroso más una pequeña cantidad de tejido circundante, seguida de terapia radiante -que involucra el ataque de las células en crecimiento-, es tan efectiva como la mastectomía en muchos casos, cuando el tumor es pequeño, confinado a una única área y accesible a la cirugía.

Para determinar si el proceso de metástasis ha comenzado, en la cirugía (tumorectomía o mastectomía) se remueven 10 a 25 ganglios linfáticos de la región axilar de la mama afectada y se examina esta estructura glandular en búsqueda de signos de cáncer. Una mujer con ganglios "positivos" tiene 37 % a 75 % de chance de volver a tener un tumor dentro de los 5 años, dependiendo del número de ganglios afectados y del tamaño del tumor original. En tales casos debe realizarse una terapia adyuvante a la brevedad. Sin embargo, la experiencia demuestra que un 30 % de las mujeres "ganglios-negativo" también desarrollan recurrencia (218).

La clase de tratamiento a llevar a cabo depende de muchos factores, incluyendo la edad de la paciente y la

biología del tumor. Las pacientes postmenopáusicas que presentan tumores RE-positivos generalmente son sometidas a terapia con tamoxifeno, un antagonista del E₂. Este reduce el riesgo de recurrencia aproximadamente en un 20 %, con efectos colaterales suaves (219).

Las mujeres jóvenes y aquellas cuyos tumores no poseen receptores usualmente reciben una combinación de 2 a 5 agentes quimioterápicos, tales como ciclofosfamidias, metotrexate y fluoruracilo, por un período de 4 meses a un año (219). Como estas drogas atacan células en rápido crecimiento, no sólo destruyen células cancerosas sino también el folículo piloso, el tracto digestivo y la médula ósea. Aunque este severo tratamiento no da garantías de cura, puede aumentar la sobrevida en un 40 % (220).

IV.- Cancer. Modelos de estudio en el laboratorio

IV.A.- Análisis de biopsias.

El estudio del cancer humano puede realizarse analizando las biopsias de tumores extraídos en la cirugía, pudiendo de esta manera tener noción de las características que presentan las células tumorales in vivo. Este tipo de estudio presenta la ventaja de reflejar fielmente el estado tumoral tal cual se presenta en el paciente, y lleva a una caracterización descriptiva de la célula tumoral.

Para analizar biopsias de cáncer de mama es necesario tener en cuenta el grado de agresividad y de avance que presenta la enfermedad en la paciente.

Para ello se dispone de diversas clasificaciones. Una de ellas es la clasificación **TNM** (Tumor, Nódulo, Metástasis), propuesta por la Unión Internacional de lucha contra el cáncer (UICC) . Se describe con detalles en Métodos.

IV.B.- Análisis de líneas celulares.

Otra manera de estudiar el comportamiento celular es mediante la utilización de cultivos de tejidos. Muchos tipos de células animales pueden cultivarse una placa de cultivo

de tejidos en condiciones apropiadas. Por consiguiente, es posible determinar los efectos sobre el comportamiento celular de la adición o eliminación de moléculas específicas, tales como hormonas y factores de crecimiento, y obtener poblaciones homogéneas de células, ya sean tumorales o no, para el análisis bioquímico o para estudiar las interacciones entre diversos tipos celulares. A menudo se dice que los experimentos realizados en células cultivadas han sido realizados in vitro. Aunque representa una gran ventaja el poder estudiar el comportamiento complejo de las células en las condiciones estrictamente definidas de una placa de cultivo, las observaciones deben compararse, tarde o temprano, con el comportamiento de las células en su ambiente natural in vivo.

IV.B.1.- Establecimiento de líneas celulares. Su historia.

El pionero en el desarrollo del cultivo de tejidos fue Roux, quien demostró, en 1885, que las células embrionarias de pollo pueden mantenerse vivas en una solución salina fuera del cuerpo del animal.

En 1913, Carrel demostró que las células podían crecer en cultivo durante mucho tiempo siempre que fueran alimentadas regularmente bajo condiciones asépticas.

En 1955, Eagle realizó la primera investigación sistemática sobre los requerimientos nutricionales esenciales de las células en cultivo, encontrando que las células animales se podían propagar en una mezcla definida de pequeñas moléculas, suplementada con una reducida proporción de proteínas séricas.

Los primeros experimentos de cultivo se realizaron a partir de pequeños fragmentos de tejido, o explantes. En la actualidad, los cultivos se preparan habitualmente a partir de suspensiones de células disociadas de tejidos. Estos

cultivos celulares disociados presentan la gran ventaja de que permiten purificar tipos celulares individuales a partir de la mezcla que siempre existe en un tejido, y así examinarlos aisladamente.

Los cultivos preparados directamente a partir de los tejidos de un organismo reciben el nombre de **cultivos primarios**. En la mayoría de los casos, las células de los cultivos primarios pueden sacarse de la placa y utilizarse para formar un cierto número de cultivos secundarios. Ocasionalmente surgen células que son inmortales en cultivo, que pueden ser propagadas indefinidamente -entre las que se encuentran las células cancerosas- como líneas celulares. Estas células muestran, a menudo, las propiedades diferenciadas del tejido del que fueron obtenidas, resultando así accesibles al estudio de formas que no son posibles en los tejidos intactos. Existe gran variedad de estas **líneas celulares** normales y tumorales de diversos orígenes animales, incluyendo al hombre.

Hasta que, en 1965, Ham introdujo un medio definido, sin suero, capaz de permitir el crecimiento clonal de ciertas células de mamíferos, la mayoría de los medios contenían una proporción de material biológico mal definido, como por ejemplo suero de caballo o suero fetal bovino, o extracto de embriones de pollo. Aunque estos medios se utilizan aún hoy en día para la mayoría de los cultivos rutinarios, resultan inapropiados para determinar las necesidades específicas de un tipo celular para el crecimiento y la diferenciación. Esto ha conducido al desarrollo de varios medios químicamente definidos que permiten el crecimiento de diferentes tipos de células. Sato y colaboradores publicaron en 1976 el primero de una serie de informes, demostrando que las líneas celulares diferentes requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en un medio sin suero.

En nuestro laboratorio, se ha desarrollado un medio definido con insulina como único factor de crecimiento (medio ID), en el cual líneas celulares de cáncer mamario crecen con un fenotipo más agresivo, probablemente más representativo de las condiciones de crecimiento in vivo que las que presentan en un medio con suero (221, 222).

IV.B.2.- Líneas celulares de cáncer de mama.

La línea celular MCF-7, derivada de un derrame pleural de un paciente con cáncer de mama (223), expresa RE (224) y representa un modelo in vitro para el estudio de los tumores de mama hormono-dependientes. En cultivo, estas células responden a concentraciones fisiológicas de E₂ acelerando su velocidad de crecimiento (225). In vivo, cuando son implantadas en ratones atímicos ovariectomizados requieren la presencia de estrógeno para exhibir tumorigenicidad (226).

Otras líneas celulares derivadas también de derrames pleurales presentes en pacientes con cáncer de mama presentan diferentes respuestas al E₂; la línea celular T47-D (227) responde aumentando su velocidad de crecimiento y la línea celular MDA-231 (228) es insensible al mismo. La

Recientemente ha sido caracterizada una variedad de proteínas, ARNm y factores de crecimiento secretados que se encuentran bajo control del E₂ en las células MCF-7. Uno de ellos, el gen pS2, mencionado anteriormente, fue descubierto por "screening" diferencial de una biblioteca de ADNc obtenida a partir de la línea celular MCF-7 crecida en presencia de estrógenos (208). El gen, presente en copia única (229), codifica para un polipéptido de 84 aminoácidos rico en cisteína con características de proteína de secreción (230). Estudios comparativos de secuencia mostraron que la proteína pS2 presenta analogía con el

polipéptido pancreático espasmolítico (PSP), una proteína secretada por el páncreas en bovinos (231-234). Se han identificado elementos respondedores a E₂ "upstream" del sitio de iniciación de la transcripción del gen pS2, que pueden actuar como "enhancers" inducibles sobre un promotor heterólogo en células HeLa que expresan el RE humano (235).

Otra proteína cuya producción está regulada hormonalmente es la 52K, glicoproteína secretada en grandes cantidades por las células de cáncer de mama (236). Aproximadamente un 40% de la proteína 52K fabricada es secretada al medio y el resto es procesado sucesivamente en proteínas de 48K y 14K+34K; esta última es la forma estable que se acumula en lisosomas. Se encontró que la proteína 52K secretada y sus formas celulares procesadas poseen fuerte actividad proteolítica a pH ácido (237, 238) y su clonado ha puesto en evidencia su alta homología con la enzima catepsina-D humana normal (214). En células de cáncer de mama la 52K es inducida específicamente por estrógeno y no por otras hormonas esteroideas (215), aunque se encuentra presente en forma constitutiva en las células tumorales que no expresan el receptor de estradiol (239). En células MCF-7, el estradiol produce un aumento en el nivel de ARNm de 10 veces. Otros mitógenos como EGF e insulina también inducen la producción de 52K a nivel transcripcional (240). Las características diferenciales que presenta la proteína 52K en las células tumorales es la existencia de la forma no procesada -en células normales se halla sólo la forma madura (34K+14K)- como proteína de secreción y citoplasmática. También es diferente su regulación hormonal, pues células mamarias normales en cultivo primario no responden a E₂ con inducción de la 52K (241). Todas estas diferencias pueden estar indicando un rol biológico de la 52K en el proceso de carcinogénesis. Puesto que la pro-catepsina D 52K es secretada en grandes cantidades a la periferia de las

células cancerosas, se ha postulado que la enzima puede adquirir funciones anormales, como facilitar crecimiento e invasividad celulares por digestión de la membrana basal, de la matriz extracelular y del tejido conectivo (242).

Estas proteínas constituyen una herramienta poderosa para estudiar las bases moleculares de la acción estrogénica.

"Según se dice, un eminente bioquímico definió la biología molecular como la práctica de bioquímica sin título. Algún genetista clásico tal vez haya sostenido que la biología molecular es el estudio la genética en los organismos que no se debían estudiar. Ambos tendrían razón..."

Salvador E. Luria

"Autobiografía de un hombre de ciencia"

Materiales y Metodos

Materiales

1.- Pacientes

Las biopsias analizadas, provenientes de diversos órganos, fueron recibidas del Hospital Ramos Mejía, y del Hospital Municipal de Oncología de la ciudad de Buenos Aires.

Los carcinomas primarios de mama y las metástasis axilares fueron obtenidas de pacientes a las que se les practicó tumorectomía o mastectomía. Las biopsias de endometrio y miometrio normales, y de fibroma fueron obtenidas de pacientes a las que se les practicó histerectomía.

Las placentas fueron obtenidas de partos normales a término.

2.-Tejidos

Las biopsias de mama, útero y placenta fueron conservadas en nitrógeno líquido hasta su análisis.

3.-Células

La cepa bacteriana utilizada para transformar y amplificar plásmidos fue E. coli HB 101 (F⁻, Rec⁻).

Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas fueron MCF-7 (223), T47-D (227) y MDA (228), mantenidas en atmósfera húmeda de aire:CO₂ (95%:5%), a 37 °C.

4.- Medios de cultivo

Para crecer bacterias se utilizó medio LB, que contiene por litro de solución: 10 g de Bactotripton, 5 g de extracto de levadura Bacto, 10 g de NaCl, pH 7.5, suplementado con ampicilina (50 µg/ml) o tetraciclina (150 µg/ml).

Para mantener las células en forma rutinaria se utilizaron medios conteniendo 10% de suero fetal bovino (Gibco). Para MCF-7 y T47-D: medio de Eagle modificado por Dulbecco:mezcla nutriente de Ham F-12 (1:1), suplementado con Insulina 10 µg/ml, Glutamina 4mM, Estreptomina 50 µg/ml, Penicilina 50 µg/ml y suero fetal bovino 10%; para MDA: medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con Glutamina 4mM, Estreptomina 50 µg/ml, Penicilina 50 u/ml y suero fetal bovino 10%.

Para realizar los experimentos de regulación de expresión mediada por hormonas en la línea celular MCF-7 se utilizó medio químicamente definido, denominado ID, compuesto por: medio de Eagle modificado por Dulbecco :mezcla nutriente de Ham F-12 (1:1), suplementado con Insulina 10 µg/ml, Glutamina 4mM, Estreptomina 50 µg/ml, Penicilina 50 u/ml y 1 mg/ml seroalbúmina bovina (Fracción V, Sigma Co, St. Louis, Ma.).

5.- Plásmidos recombinantes

Se utilizaron los siguientes plásmidos:

myc: plásmido pBR322 conteniendo un fragmento de 1.3 kb Eco R1-Cla 1, correspondiente al tercer exón del protooncogen humano (243).

Ha-ras: plásmido pBR322 conteniendo un fragmento de 6.6 kb Bam H1, correspondiente al protooncogen humano (244).

N-ras: plásmido pBR322 conteniendo un fragmento de 600 pb Hind III, conteniendo el primer exón del protooncogen humano (245).

Ki-ras: plásmido pBR322 conteniendo un fragmento de 1.0 kb Eco R1, perteneciente al clon HiHi-3 del virus del sarcoma de Kirstein (Ki-MuSV) (15).

HEO: plásmido M13 Blue Scribe conteniendo un inserto Eco R1 de 1.8 kb que comprende el ADNc completo del receptor estrogénico (168).

HE14: plásmido M13 Blue Scribe conteniendo un inserto Eco R1 de 1.2 kb que comprende el fragmento del ADNc del receptor estrogénico que codifica para el dominio de unión a la hormona (168).

BSM-PR: plásmido M13 Blue Scribe conteniendo un inserto de 3.5 kb que contiene el ADNc del receptor de progesterona, menos una secuencia corta 3' no codificante (246).

pFN4HO.95: plásmido conteniendo un inserto Hind III de 0.95 kb de ADN genómico humano correspondiente a un fragmento del gen de fibronectina (246).

ribo: plásmido pSp65 conteniendo un fragmento EcoR 1-BamH 1 de 1.3 kb del gen ribosomal 28s de ratón (247).

neu: plásmido pUC18 conteniendo un fragmento EcoR 1 de 1.6 kb del ADNc del protooncogen humano (248).

pS2: plásmido pBR322 conteniendo un fragmento Pst 1 de 0.3 kb del ADNc de pS2 proveniente de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (209).

36B4: plásmido pBR322 conteniendo un fragmento Pst 1 de 1.0 kb de un ADNc de expresión constitutiva en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (209).

DHFR: plásmido pBR322 conteniendo un fragmento Pst 1 de ADNc de 1.6 kb de la enzima dihidrofolatoreductasa de origen murino (249).

6.- Soluciones

La composición de las soluciones utilizadas se indica en cada método descripto. Las denominaciones particulares empleadas se describen a continuación.

Solución de Denhardt 50X: contiene por 500 ml, 5 g de Ficoll; 5 g polivinilpirrolodona; 5 g seroalbúmina bovina (Fracción V).

Medio LB: contiene por litro de solución 10 g de Bactotripton; 5 g de extracto de levadura Bacto; 10 g de NaCl; pH 7.5.

TBE 20X: 0.89 M Tris.ClH (pH 8); 0.89 M ácido bórico; 20 mM EDTA.

TE pH 7.5: 10 mM Tris.Cl (pH 7.5); 1mM EDTA (pH 8).

TE pH 8: 10 mM Tris.Cl (pH8); 1mM EDTA (pH 8)

PBS: contiene por litro de solución 8.5 g de NaCl; 1.43 g de K₂HPO₄ anhidro; 0.25 g de KH₂PO₄; pH 7.2-7.4.

SSC 20X: contiene por litro de solución, 175.3 g de NaCl; 88.2 g de citrato de sodio; gotas de NaOH hasta pH 7.

SSPE 20X: contiene por litro de solución, 174 g de NaCl; 27.6 g de NaH₂PO₄.H₂O; 7.4 g EDTA; 6.5 ml de NaOH 10N (aprox.) hasta pH 7.4.

Buffer de siembra Tipo II 6 X: 0.25% Azul de bromofenol; 15% Ficoll (Tipo 400) en agua.

Buffer de siembra Tipo III 6 X: 0.25% Azul de bromofenol; 30% glicerol en agua.

Metodos

1.- Obtención de tipos celulares puros

1.A.- Purificación de células tumorales de mama

Se suspendió un pequeño fragmento de tumor primario en medio mínimo de Eagle (MEM), suplementado con penicilina (100 u/ml) y estreptomicina (100 µg/ml), y se sometió a tratamiento enzimático con colagenasa (1 mg/ml) y elastasa (0.1 mg/ml), por 3 horas a 37 °C. Luego se filtraron las células por gasa. La suspensión celular se dejó a 37 °C durante 30 minutos y finalmente se sometió a un gradiente de Ficoll-Hypaque ajustado a una densidad de 1.085 g/l, centrifugando a 1500 rpm por 30 minutos. Las células no viables, los linfocitos y los glóbulos rojos sedimentaron y las células tumorales quedaron en la interfase. Estas se diluyeron con 2 volúmenes de PBS y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos. Se resuspendieron en buffer TE (pH 7.5) y se congelaron hasta su utilización.

1.B.- Purificación de linfocitos

Se extrajeron 40 ml de sangre con jeringa heparinizada (10 u/ml), se agregaron 4 ml de dextrano (0.6 % concentración final), se dejó decantar a temperatura ambiente por 60 minutos y se separó el sobrenadante. Se

agregó PBS hasta completar el volumen original. Se adicionó nuevamente dextrano 0.6 %, se dejó sedimentar 30 minutos más y el sobrenadante se sumó al anterior. Se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos. Se resuspendió el sedimento en 10 ml de PBS y se sembró en gradiente de Ficoll-Hypaque (a una densidad de 1.076 g/ml). Se centrifugó a 1500 rpm por 40 minutos, se separó la interfase y lavó con PBS, volviendo a centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos. Finalmente se resuspendió en buffer TE (pH 7.5).

2.-Obtención de ácidos nucleicos

2.A.- Purificación de ADN

Los trozos de tumores y demás tejidos (placenta, útero) fueron pulverizados con nitrógeno líquido y resuspendidos en buffer Tris.ClH 0.2 M (pH 8.5), EDTA 0.1 M y homogeinizados con dos pulsos de 30 segundos cada uno en Ultraturrax. Las células de cultivo o purificadas (de tumor de mama y linfocitos) fueron directamente resuspendidas en el mismo buffer y homogeinizadas de igual manera. En todos los casos se agregó SDS 0.1 % (concentración final) y se trató con proteinasa K (0.1 mg/ml) a 60 °C durante 2 horas. Se agregó 10 µl de dietilpirocarbonato (DPC) y se dejó a temperatura ambiente 30 minutos (bajo campana, pues el DPC es volátil y tóxico). Luego se agregó 1 ml de KAcO 5 M, se dejó 60 minutos en hielo y centrifugó a 15000 rpm por 15 minutos a 2 °C. Se tomó el sobrenadante y se precipitó con 10 ml de etanol absoluto. Se resuspendió en 0.5 ml de buffer TE (pH 7.5) conteniendo 1 µg/ml de ARNasa calentada a ebullición (para eliminar ADNasas contaminantes), y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. Se realizó la extracción de proteínas

contaminantes con un volumen de fenol saturado en buffer Tris.ClH (pH 7.5). Se centrifugó 5 minutos a 2000 rpm y la fase acuosa fue reextraída con una mezcla 1:1 de fenol:cloroformo (éste último con alcohol isoamílico en proporción 24:1); se repitió la centrifugación en iguales condiciones y se volvió a extraer con cloroformo. La fase acuosa recuperada luego de una tercera centrifugación fue llevada a 0.1 N de NaCl y precipitada con 2 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado se lavó con etanol 70 %, se secó al vacío y se resuspendió en 0.25 ml de buffer TE (pH 8), para ser luego tratado con enzimas de restricción en las condiciones de salinidad adecuadas (descriptas más adelante). Esta metodología de purificación ha sido descripta (250).

La cuantificación fue llevada a cabo por lectura densitométrica a 260 nm ($O.D._{260}=1$ corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN). Se verificó la pureza del ADN calculando en cada caso la relación $O.D._{260}/O.D._{280}$, que fue de 1.8.

2.B.- Purificación de ARN

Dada la extrema labilidad del ARN, las técnicas de purificación y las manipulaciones del mismo se realizaron con material autoclavado y utilizando guantes par evitar el contacto con ARNasas, presentes ubicuamente.

El ARN total fue extraído por el método de Rougeon (251). Las muestras fueron resuspendidas en frío en 10 ml de solución conteniendo LiCl 3 M, urea 6 M, NaAcO 10 mM y homogeinizadas en Ultraturax en 3 pulsos de 30 segundos cada uno. En el caso de purificación de ARN a partir de células en cultivo, se procedió agregando directamente a la placa de cultivo los 10 ml de solución de extracción. Luego se agregó 0.1 ml de SDS 10 %. Se dejó precipitar durante la noche a 4 °C. El precipitado se resuspendió 4°C en 3 ml de solución a

25 mM NaAcO (pH 5) y 0.1 % SDS. Se realizó luego una extracción fenol:cloroformo (como se describió anteriormente en la purificación de ADN), y se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto, durante la noche a -20 °C. Se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, se secó al vacío y resuspendió en 30 µl de agua bidestilada estéril.

La cuantificación fue llevada a cabo por lectura densitométrica a 260 nm (O.D.₂₆₀=1 corresponde a 40 µg/ml de ARN). Se verificó la pureza del ARN calculando en cada caso la relación O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀, que fue de 2.0.

3.- Corrida electroforética y transferencia

3.A.- Para ADN

Las muestras de ADN fueron digeridas durante la noche a 37°C con 5 unidades de enzima de restricción/µgADN (Bethesda Research Laboratories). Las enzimas utilizadas y sus correspondientes condiciones de salinidad se describen a continuación:

Bam H1: 20 mM Tris.HCl (pH 8); 100 mM NaCl; 7 mM MgCl₂; 2 mM 2-mercaptoetanol.

Cla I: 10 mM Tris.HCl (pH 8); 10mM MgCl₂; 100 µg/ml BSA.

EcoR I: 100 mM Tris.HCl (pH 7.5); 50 mM NaCl; 10 mM MgCl.

Hind III: 50 mM Tris.HCl (pH 8); 50 mM NaCl; 10 mM MgCl.

Hpa II: 20 mM Tris.HCl (pH 7.4); 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT.

Msp I: 50 mM Tris.HCl (pH 8); 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 100 µg/ml BSA.

Pst I: 50 mM Tris.HCl (pH 8); 50 mM NaCl; 10 mM MgCl.

La técnica llevada a cabo y que se describe a continuación, es la descrita por Southern (252), con algunas modificaciones. Luego de la digestión fue llevada a cabo la electroforesis en geles de agarosa 0.8% en buffer TBE 1X, 10 mM AcOK pH 5, a voltaje constante (1 Volt/cm de separación entre los electrodos). Se agregó 1 x buffer de siembra Tipo II para permitir la siembra de la mezcla de incubación - por aumentar la densidad- y visualizar el frente de corrida. Para observar si la digestión fue completa y la corrida correcta se tñieron los geles con bromuro de etidio 0.5 µg/ml por 30 minutos y se visualizó el ADN -fragmentos de todos los tamaños observables como una mancha continua a lo largo del gel en cada carril- por transiluminación con luz ultravioleta. La transferencia se realizó por capilaridad a membranas de nylon Z-Probe (Bio-Rad), previamente hidratadas y equilibradas en 0.4N NaOH, en solución alcalina 0.4N NaOH (253). ADN de fago digerido con Hind III fue usado como marcador de peso molecular y presenta bandas de 23.1 kb, 9.42 kb, 6.56 kb, 4.36 kb, 2.32 kb, 2.03 kb, 0.56 kb.

3.B.- Para ARN

Se desnaturalizaron 20 µg de ARN total con glioxal deionizado 1M y 50% de dimetilsulfóxido (DMSO) a 50 °C por 1 hora y se corrieron durante 3 a 4 horas a 30 Voltios en geles de agarosa 1.0 % en buffer 10 mM fosfato de sodio (pH 7.0); para visualizar el frente de la corrida se agregó a cada muestra colorante Tipo III. Luego se transfirieron por capilaridad durante la noche a membranas de nylon Gene-Screen (New England Nuclear), previamente hidratadas y

equilibradas en buffer 10 mM fosfato de sodio (pH 7.0), en el mismo buffer, como lo describe Patricia Thomas (254).

Para realizar cuantificación de un ARNm específico pero sin establecer su tamaño, se llevaron a cabo "dot blots". Para ello se sembraron diferentes cantidades de RNA total sobre nitrocelulosa (previamente hidratada con agua bidestilada y luego equilibrada en 20 XSSC), se secó bajo lámpara, y fijó en estufa a 80°C durante 2 horas.

4.- Condiciones de hibridización

4.A.- Para ADN

Luego de la transferencia, las membranas fueron lavadas en 6 x SSC y cocinadas por 2 horas a 80°C. Los filtros fueron prehibridizados durante la noche a 65°C en una solución conteniendo 6 x SSPE, 0.1% SDS, 100 µg/ml ADN de esperma de salmón y 10 x solución de Denhardt. La hibridización fue llevada a cabo durante 48 horas a 65°C en bolsas plásticas selladas conteniendo 6 x SSPE, 0.1% SDS, 100 µg/ml ADN de esperma de salmón, 10 x solución de Denhardt, 10% dextran sulfato y la sonda radioactiva (1×10^8 cpm/ml y actividad específica mínima 1×10^8 cpm/µg), cuya preparación se describe más adelante. Luego las membranas fueron lavadas en condiciones de alta astringencia: 30 minutos a temperatura ambiente en 2 x SSC, 0.1% SDS, y 60 minutos a 65°C en 0.1 x SSC, 0.1% SDS. Luego del lavado, las membranas fueron autorradiografiadas a -70 °C con películas Kodak X-OMAT y reveladas. El nivel de la señal fue determinado con un densitómetro. Las membranas fueron deshibridizadas por calentamiento dos veces de 20

minutos cada una a 95°C en una solución conteniendo 0.1 x SSC, 0.5% SDS, y fueron rehibridizadas como se describió anteriormente.

4.B.-Para ARN

Luego de la transferencia, las membranas fueron cocinadas por 2 horas a 80°C y prehibridizadas durante la noche a 42 °C en una solución conteniendo 50 % formamida, 5 x SSC, 0.1 % SDS, 100 µg/ml ADN de esperma de salmón, 1 x solución de Denhardt. La hibridización fue llevada a cabo durante 48 horas a 42 °C en bolsas plásticas selladas conteniendo 50 % formamida, 5 x SSC, 0.1 % SDS, 100 µg/ml ADN de esperma de salmón, 1 x solución de Denhardt, 10 % dextran sulfato y la sonda radioactiva (1 x 10⁶ cpm/ml y actividad específica mínima 1 x 10⁶cpm/µg), cuya fabricación se describe más adelante. Luego de la hibridización, las membranas fueron lavadas 60 minutos a 42 °C en 50 % formamida, 2 x SSC, 1 % SDS, 50 µg/ml ADN de esperma de salmón, 1 x solución de Denhardt y 60 minutos a 42 °C en 50 % formamida, 0.1 x SSC, 0.1% SDS. Posteriormente, se realizó la autorradiografía de las membranas con películas Kodak X-OMAT a -70 °C y se revelaron. El nivel de la señal fue determinado con un densitómetro.

5.-Producción de sondas

Las diferentes etapas de la fabricación de sondas radioactivas fueron realizadas tomando como base los protocolos de Maniatis y col. (255) con algunas modificaciones y se describen a continuación.

5.A.-Transformación bacteriana

Se transformó la cepa HB 101 con los diferentes plásmidos descritos previamente.

Se incubó 100 ml de LB con 1 ml de cultivo de células que permanecieron creciendo durante la noche anterior, con agitación vigorosa a 37 °C hasta una densidad óptica correspondiente a 5×10^7 cél/ml (2 a 4 horas). Para cada transformación se utilizaron 3 ml. Se enfrió el cultivo en hielo durante 10 minutos, se centrifugó a 4000g por 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en la mitad del volumen de cultivo inicial en solución helada y estéril 50 mM de CaCl₂ y 10 mM Tris.ClH (pH 8). Se fraccionó en alícuotas de 0.2 ml en tubos preenfriados y se dejó a 4 °C durante 12 horas. Luego se agregó el ADN plasmídico (40 ng en 0.1 ml de buffer TE pH 8) . Se mezcló y dejó en hielo por 30 minutos. Se transfirió a un baño de agua a 42 °C por 2 minutos. Se agregó a cada tubo 1 ml de LB y se incubó para permitir la expresión de resistencia a antibiótico a 37 °C, 30 y 60 minutos para seleccionar con tetraciclina y ampicilina respectivamente. Se sembraron alícuotas de este cultivo con rastrillo en placas con agar conteniendo LB y el antibiótico adecuado. Se incubó a 37 °C por 20 horas.

5.B.- Crecimiento bacteriano y amplificación de plásmidos

Se inoculó 10 ml de medio LB conteniendo antibiótico con una colonia bacteriana. Se incubó toda la noche a 37 °C con agitación vigorosa. A la mañana siguiente se inoculó 25 ml de medio LB conteniendo antibiótico con 0.1 ml del cultivo nocturno. Se incubó con agitación vigorosa a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó la fase logarítmica de crecimiento

(O.D.₆₀₀=0.6). Se inoculó con dicho cultivo 500 ml de medio LB con antibiótico, precalentado a 37 °C y se incubó 2.5 horas a 37 °C con agitación vigorosa (hasta O.D.₆₀₀=0.4). Se agregó 2.5 ml de cloranfenicol 34 mg/ml en solución etanólica y se incubó a 37 °C con agitación vigorosa por 16 horas.

5.C.- Lisis por álcali

El cultivo anterior se centrifugó a 4000 xg por 10 minutos a 4 °C y se resuspendió en 10 ml de solución conteniendo 5 mg/ml de lisozima, 50 mM de glucosa, 25 mM Tris.ClH (pH 8), 10 mM EDTA. Se transfirió a tubo de centrifuga y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregó 20 ml de solución recientemente preparada 0.2 N NaOH, 1% SDS. Se mezcló por inversión. Se dejó en hielo por 10 minutos y centrifugó a 20000 rpm por 20 minutos a 4°C. El ADN celular y los fragmentos bacterianos formaron un precipitado. Se transfirió el sobrenadante a tubos Corex de 30 ml. Se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló y dejó a temperatura ambiente por 15 minutos. El ADN plasmídico se obtuvo por posterior centrifugación a 12000 xg por 30 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el alcohol por vacío en desecador y resuspendió en buffer TE (pH 7.5).

5.D.- Purificación de DNA plasmídico por centrifugación a equilibrio en gradiente de CsCl en presencia de bromuro de etidio

Se mezclaron la solución de ADN y el CsCl sólido (1g por ml de solución agitando hasta su disolución). Se agregó bromuro de etidio (0.8 ml de 10 mg/ml cada 10 ml de solución de ADN). Se mezcló bien y transfirió a un tubo de

centrifugación. Se equilibraron cuidadosamente los pesos de los tubos y centrifugó a 45000 rpm por 36 horas a 20°C. Se colectó la banda de ADN circular, visible con luz ultravioleta, con jeringa. Se extrajo el bromuro de etidio por mezcla con alcohol isoamílico y centrifugación a 1500 xg a temperatura ambiente y recuperación de la fase acuosa, hasta desaparición del color rosado de la fase alcohólica. Después se dializó contra buffer TE (pH 7.5) durante la noche.

5.E.- Purificación de inserto por freeze-squeeze

Se digirieron los plásmidos con las enzimas correspondientes al inserto en cada caso y, luego de una inactivación con 25 mM EDTA pH 8, se corrieron las mezclas de incubación en minigeles de agarosa 1 a 2 % -según el tamaño del inserto a purificar- a 60 mA por 2 horas aproximadamente, en buffer de corrida 1 X TBE. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se localizaron las bandas por transiluminación con luz ultravioleta. Se cortaron los fragmentos de agarosa conteniendo las bandas correspondientes a los insertos y se introdujeron en tubos eppendorf. Se agregó 1 ml de solución de NaAcO 0.3 M (pH 7) y EDTA 1 mM. Se agitó en ausencia de luz (envolviendo los tubos con papel metalizado). Se pasaron luego los trocitos de gel a tubos eppendorf perforados en el fondo y adicionados con lana de vidrio. Se congeló en nitrógeno líquido por 5 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 12000 x g dentro tubos mayores, donde eluyó el ADN. Se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto, a -20 °C durante la noche. Se descartó el sobrenadante, se lavaron los precipitados con etanol 70%, se secaron al vacío y se resuspendieron en buffer TE (pH 7.5).

5.F.- Purificación de inserto por electroelución

La digestión con enzimas de restricción, la corrida electroforética en minigeles de agarosa, la visualización de las bandas y el corte del fragmento de agarosa conteniendo la banda de interés se realizó como se describió anteriormente.

El fragmento de agarosa se introdujo en una bolsa de diálisis con 0.5 ml de 0.5 X TBE. Se sumergió la bolsa en 0.5 X TBE en la cuba electroforética y se sometió a 100 Voltios durante 30 minutos. Se invirtió la polaridad durante 45 segundos. Se verificó por observación bajo luz U.V. la elución del ADN fuera de la agarosa y se recuperó el buffer de la bolsita conteniendo el ADN. Luego se procedió a purificar dicho ADN de las impurezas que suelen acompañar a la agarosa por pasaje por Elutip (Schueller & Schull). Inicialmente se lavó la columnita con un buffer de "alta sal": 20 mM Tris.Cl pH 7.4, 1 mM EDTA, que contiene 2 mM NaCl. Luego se la equilibró con buffer de "baja sal": 20 mM Tris.ClH pH 7.4, 1 mM EDTA, que contiene 0.2 mM NaCl. Se sembró la muestra de ADN en buffer de "baja sal", se lavó con varios volúmenes del mismo buffer y luego se eluyó con 0.5 ml de buffer de "alta sal". Se precipitó con 1 ml de etanol absoluto, durante 1 hora a -70 °C (o durante la noche a -20 °C). Se centrifugó 10 minutos a 15000 rpm, lavó con etanol 70 % y resuspendió en buffer TE (pH 7.5).

5.G.- Marcación de inserto por nick translation

Se incubaron 0.2 µg de ADN en presencia de Tris.Cl 50 mM, pH 7.2, MgSO₄ 10 mM, BSA 0.05 mg/ml, dATP 20 µM, dGTP 20 µM, TTP 20 µM, [³²P]dCTP 50 µCi (actividad específica 3200 Ci/mmol), ADN polimerasa (0.1 unidades/µl), ADNasa 1 mg/ml,

durante 2 horas a 16 °C. Se detuvo la reacción con 2 µl de solución de EDTA 0.5 M (pH 8). Se separó la sonda radioactiva de los nucleótidos no incorporados por pasaje por columna de Sephadex G-50 -armada en jeringa de tuberculina- equilibrada en buffer TE (pH 8). Se determinó la radioactividad recuperada en contador de centelleo Beckman.

6.- Determinación de receptores hormonales

6.A.- Por inmunohistoquímica

Para realizar la determinación del **RE** por inmunohistoquímica sobre biopsias se realizaron cortes en micrótopo por congelación -de aproximadamente 10 µm de espesor-. Para analizar líneas celulares se sembraron en 2 ml de medio aproximadamente 10⁵ células en placas P-25 sobre vidrios tratados previamente con suero fetal bovino durante la noche a 5 °C, para que las células se adhieran a su superficie.

Los tejidos y líneas celulares fueron fijados en una solución 3.7% de formaldehído en PBS durante 10 a 15 minutos a 5°C, luego en metanol 3 a 5 minutos a -20 °C, lavados con PBS por 5 minutos a 5°C y por último 1 a 3 minutos a -20°C en acetona. Se transfirieron a un recipiente con PBS por 4 a 6 minutos a temperatura ambiente. Con lápiz de diamante se determinaron los sectores de tejido a analizar. Se trataron las muestras con suero de cabra al 2% por 15 minutos para reducir la unión no específica del segundo anticuerpo. Luego se agregó el anticuerpo monoclonal H222 fabricado contra el receptor estrogénico proveniente de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (256, 257) y se incubó durante 30

minutos. Luego se lavó dos veces de 5 minutos cada una con PBS. Para amplificar la señal se utilizó un segundo anticuerpo que actúa como puente por 30 minutos y se lavó dos veces de 5 minutos cada una con PBS. Posteriormente se efectuó la incubación con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa por 30 minutos. Después de lavar 2 veces de 5 minutos cada una con PBS, se mezclaron el cromógeno diaminobenzidina y la solución sustrato 0.06% de peróxido de hidrógeno en PBS y agregados inmediatamente e incubados durante 6 minutos. Posteriormente se lavó las secciones con agua. Como contrateñido se utilizó hematoxilina Harris diluída 1:10. Las secciones fueron deshidratadas y montadas con Permount.

Se calculó el índice de intensidad de teñido (SII) (258) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SII} = \frac{\% \text{ de células tumorales teñidas con intensidad A} \times 0 + \% \text{ de células tumorales teñidas con intensidad B} \times 1 + \% \text{ de células tumorales teñidas con intensidad C} \times 2 + \% \text{ de células tumorales teñidas con intensidad D} \times 3}{100}$$

donde A: teñido nuclear específico no visible

B: teñido nuclear específico débil.

C: teñido nuclear específico moderado.

D: teñido nuclear específico fuerte.

El índice tiene un rango de 0-3, se considera RE-positivos a los tumores que presentan SII >0.1.

6.B.- Determinación de RE y RPg por el método bioquímico

La técnica utilizada (259) se describe a continuación:

6.B.1.- Preparación de citosoles a partir de tumores

Las muestras de cirugía fueron homogeneizadas por disrupción mecánica. El polvo obtenido se resuspendió en 2 volúmenes (ml/g) de 1mM MgCl, 1 mM ditioneitol, 250 mM sacarosa, 20 mM Tris.HCl, pH 7.8, 0.01% NaN₃. Los homogenatos fueron centrifugados a 800 x g por 10 minutos para separar la fracción nuclear; el sobrenadante obtenido fue diluido 1:1 con buffer conteniendo 3 mM EDTA, 1 mM ditioneitol, 20 mM Tris.HCl, pH 7.8, 0.01% NaN₃ -buffer de dilución- y sometido a 105000 xg por una hora a 2 °C. El sobrenadante claro, libre de grasas, constituye la fracción citosólica.

6.B.2.- Ensayo DCC ("Dextran-Coated Charcoal")

Para el análisis de saturación, 90 µl de los citosoles se incubaron con 10 µl de etanol 10% en buffer de dilución conteniendo 2 pmol [³H]hormona- [³H]estradiol o [³H]progesterona- o sea 20nM de concentración final, y para determinación de unión inespecífica [³H]hormona y 200 pmoles de hormona no radioactiva -2µM de concentración final-. Las incubaciones se llevaron a cabo durante la noche a 4°C y se detuvieron por agregado de un volumen de suspensión de DCC (0.5% p/v Norit-A, 0.05% p/v dextrano T70, 0.0% p/v gelatina en 20 mM K₂PO₄, pH 7.4 a 4 °C, 1mM EDTA, y 3 mM buffer NaN₃). Luego de 15 minutos el charcol se precipitó por centrifugación a 15000xg por 5 minutos. Luego se determinó la radiactividad unida a proteínas en el sobrenadante en un contador de centelleo líquido.

La concentración de los receptores estrogénicos y de progesterona, expresados en fentomoles por mg de proteína se calcularon en base a la ecuación siguiente:

$$R_0 = (B_{01} - B_{02}) \times 4 \times V_c \times 50 \times 1000 / 3 \times SA \times 90 \times Ph \times V_h$$

donde B_{01} y B_{02} son las desintegraciones por minuto unidas a componentes del citosol en ausencia y presencia de hormona no radioactiva respectivamente; V_c es el volumen citosólico total; SA es la actividad específica de la hormona marcada - expresada en desintegraciones por minuto por femtomol-; Ph es el contenido proteico -expresado en μg - de 50 μl de homogenato; V_h es el volumen del homogenato; $4/3$ es la fracción inversa de la fracción citosólica de incubación contada; 50 (μl) es el volumen de homogenato usado para la determinación de proteínas; 90 (μl) es el volumen de citosol incubado; y $\times 1000$ es para la conversión de proteínas de μg en mg.

El contenido total de proteínas fue determinado usando colorante Azul de Coomassie G250, de acuerdo con el método de Bradford (260), usando albúmina para la construcción de la curva de calibración.

7.- Determinación de proteína 52K.

Placas "multiwells" fueron tratadas con 50 μl de un anticuerpo contra la proteína 52K (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en buffer fosfato-azida (0.1 M fosfato de sodio (pH 7.4) 0.01 % NaN_3) durante la noche a 4 °C. Los sitios restantes de adsorción fueron saturados con una incubación de 3 horas a 37 °C en 200 μl de buffer fosfato-azida conteniendo 5 % globulina bovina. En todos los pasos siguientes, fue agregado 1 % globulina bovina en el buffer. Luego de 2 lavados, el antígeno fue agregado en 50 a 100 μl de buffer o medio de

cultivo por 20 horas a 4 °C. Se lavó 2 veces, y se incubó con 50 µl de un segundo anticuerpo iodinado contra la proteína 52K (2 a 4 x 10⁵ cpm/well) por 3 horas a 37 °C. Luego de un extensivo lavado, los wells fueron separados y contados. La unión no específica del anticuerpo radiiodinado fue evaluada en un control donde faltaba el primer anticuerpo. La radioactividad fue convertida a concentración de proteína 52K por referencia a una curva standard obtenida con proteína 52K purificada, previamente cuantificada por medición densitométrica de geles teñidos con plata con referencia a una curva standard obtenida en paralelo con ovoalbúmina.

8.- Curvas de crecimiento

Los estudios de proliferación celular fueron realizados como se describe a continuación. Las células MCF-7 fueron sembradas en botellas conteniendo Dulbecco:F-12 (1:1) + 10% suero fetal bovino y 10 µg/ml de insulina para permitir la adhesión celular al plástico. Luego de 4 horas fueron lavadas extensivamente con medio sin suero, y pasadas a medio ID, con o sin el posterior agregado de hormona o antagonista. A intervalos de tiempo apropiados fueron tratadas con tripsina (2.5 mg/ml):colagenasa (2.5 mg/ml) (1:1) y contadas.

9.- Biopsias de tumores de mama

9.A.- Clasificación

Para analizar biopsias de cáncer de mama es necesario tener en cuenta el grado de agresividad y de avance que presenta la enfermedad en la paciente.

Para ello se utilizó la clasificación **TNM** (Tumor, Nódulo, Metástasis), propuesta por la Unión Internacional Contra el Cáncer -UICC-, que se detalla a continuación:

T Tumor primario

T₀ tumor no demostrable en la mama.

T₁ tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor

T_{1a} sin fijación al músculo pectoral.

T_{1b} con fijación al músculo pectoral.

T₂ tumor de más de 2 cm pero no mayor de 5 cm en su diámetro mayor.

T_{2a} sin fijación al músculo pectoral.

T_{2b} con fijación al músculo pectoral.

T₃ tumor de más de 5 cm en su diámetro mayor.

T_{3a} sin fijación al músculo pectoral.

T_{3b} con fijación al músculo pectoral.

T₄ tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared del pecho o a la piel.

T_{4a} con fijación a la pared del pecho.

T_{4b} con edema, infiltración o ulceración de la piel de la mama, o nódulos en la piel circundante de la misma mama.

T_{4c} con la suma de las características de 4a y 4b.

N Nódulos linfáticos regionales

N₀ sin nódulos axilares homolaterales palpables.

N₁ nódulos axilares homolaterales movibles.

N_{1a} nódulos considerados estabilizados.

N_{1b} nódulos considerados en crecimiento.

N₂ nódulos axilares homolaterales fijos unos a otros, o a otras estructuras.

N₃ nódulos infraclaviculares o supraclaviculares o edemas del brazo (por obstrucción linfática).

M Metástasis a distancia

M₀ ninguna evidencia de metástasis a distancia.

M₁ presencia de metástasis a distancia con afectación de la piel más allá del área de la mama.

9.B.- Biopsias de tumores de mama. Agrupación por estadios.

T₁S: Carcinoma in situ.

Carcinoma invasor

Estadio I	T _{1a}	N ₀	N _{1a}	M ₀
	T _{1b}	N ₀	N _{1a}	
Estadio II	T ₀	N _{1b}		M ₀
	T _{1a}	N _{1b}		
	T _{1b}	N _{1b}		
	T _{2a}	N ₀	N _{1a}	
	T _{2b}	N ₀	N _{1a}	
	T _{2a}	N _{1b}		
	T _{2b}	N _{1b}		
Estadio III	Cualquier T ₃ con cualquier N			M ₀
	Cualquier T ₄ con cualquier N			
	Cualquier T con cualquier N ₂			
	Cualquier T con cualquier N ₃			
Estadio IV	Cualquier T con cualquier N			M ₁

"Los millones de sistemas y subsistemas que componen un organismo, lo único que tratan de mantener es equilibrio de la última estructura alcanzada, la actual. Por más que las chances de que se les escape algo de control sean pequeñas, tarde o temprano se van desequilibrando. El resultado es el progreso o lo patológico. Desde el punto de vista biofísico-químico ambos son perfectamente "razonables", ordenados y hasta entretenidos y hermosos de estudiar. Intrínsecamente, todo es natural y explicable. Desde el punto de vista biológico, no."

Marcelino Cereijido

"Orden, equilibrio y desequilibrio"

Resultados

I.- Estudio de oncogenes en el cancer de mama

Antecedentes y objetivos

Los primeros estudios de oncogenes realizados en cáncer mamario detectaron una expresión aumentada de los oncogenes **myc** y **Ha-ras** (261). Como se han hallado casos de cooperatividad de ambas familias en el establecimiento de tumores (262), decidimos analizar la estructura génica del oncogen nuclear **myc** y de los oncogenes de la familia **ras** en tumores de mama.

Se analizaron tumores primarios y una metástasis (tumor #V), pues se conoce que dichos tumores presentan características distintivas (de cariotipo, velocidad de crecimiento, etc.). También se estudiaron células tumorales purificadas (tumor #X), eliminando de esta manera linfocitos y otras células normales presentes en los tumores (263), para evaluar una posible amplificación de manera más precisa. Como control se utilizó ADN de placenta,

considerada tejido normal por excelencia. En uno de los casos fue posible obtener ADN de células normales para realizar un estudio comparativo, y poder detectar alteraciones genéticas propias de las células tumorales.

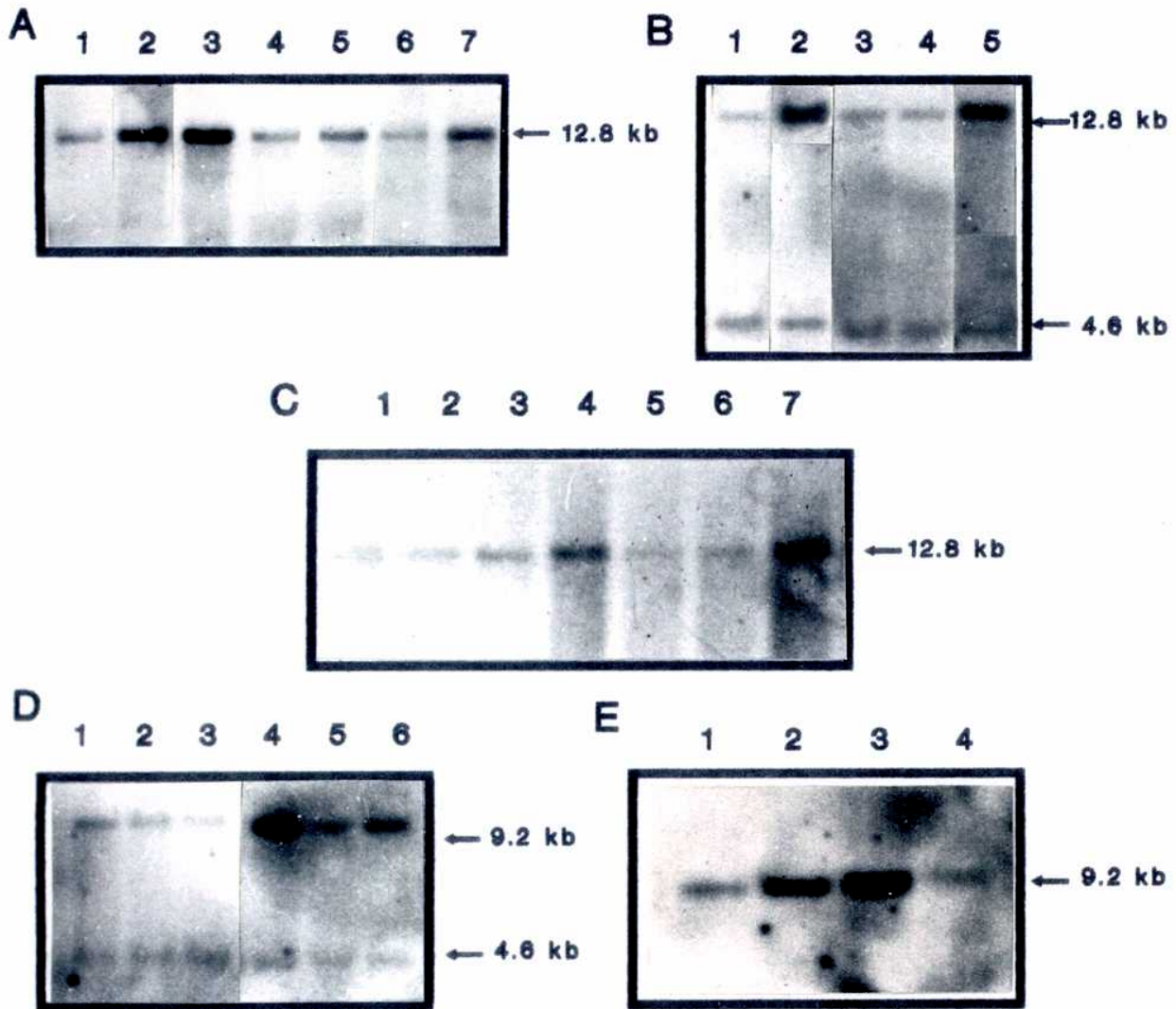
Los ADNs purificados de las diferentes fuentes fueron digeridos con la enzima de restricción Eco R1 y analizados mediante la técnica de Southern, como se indicó en Materiales y Métodos. Esta técnica brinda dos tipos de información: permite la cuantificación del número de copias presentes de un gen en forma comparativa con respecto a un tejido control, en este caso placenta, tomado su contenido génico como unitario; además permite estudiar la presencia de rearrreglos cromosómicos que determinen un patrón de bandas alterado en el tejido tumoral respecto del control, un tejido normal cualquiera o, más correctamente, tejido normal de la misma paciente.

Resultados

I.A.- Análisis genómico del oncogen *myc*

Para el análisis genómico del oncogen *myc* se utilizó una sonda de 1.3 kb que contiene el tercer exón del protooncogen humano (264) y se detectó una banda de 12.8 kb en todos los tejidos analizados, -Figura r.1A-, coincidente con publicaciones previas (265). Los tumores #I y #II mostraron una aparente amplificación, al comparar la intensidad de dicha banda presente en los tumores con la de placenta. También se detectó amplificación en la línea celular HL60, de la que se conoce que presenta múltiples copias del gen *myc* (84) -no mostrado-.

Figura r.1: Analisis de los oncogenes *myc* y *N-ras* en tumores mamarios



Southern blots de ADN_s extraídos de distintos tejidos digeridos con Eco R1.
 1A: Sonda: c-myc; 1: placenta; 2: #I; 3: #II; 4: #III; 5: #IV; 6: #VI; 7: #VII
 1B: Sondas: c-myc+B-globina; 1: placenta; 2: #II; 3: #IV; 4: #VI; 5: #I.
 1C: Sonda : c-myc; 1: placenta; 2: #I dil.1/4; 3: #I dil.1/2; 4: #I; 5: #II dil.1/4; 6: #II dil.1/2; 7: #II.
 1D: Sondas: N-ras+B-globina; 1: placenta; 2: #I; 3: #II; 4: #X; 5: placenta; 6: HL60.
 1E: Sonda: N-ras; 1: #X dilucion 1/4; 2: #X dilucion 1/2; 3: #X; 4: placenta.

Para descartar que la mayor intensidad observada se debiera a un artefacto de la técnica, se repitió la hibridización incluyendo una sonda correspondiente a un gen de copia única no relacionado, el ADNc completo del gen de β -globina (266), que reveló una banda de 4.6 kb, de acuerdo con reportes previos (267) -Figura r.1B-. De este modo se confirmó la presencia de amplificación en los tumores #I y #II. Para cuantificarla, se realizaron diluciones sucesivas, sembrando 10, 5 y 2.5 μ g de ADN tumoral -llevando la cantidad sembrada en cada carril a 10 μ g con ADN de esperma de salmón-, y resultó ser de 4 veces para el tumor #I y aún mayor para el tumor #II -Figura r.1C-.

El resto de los tumores analizados presentó una copia del gen *myc*. Los resultados se suman en la Tabla r.1.

I.B.- Análisis genómico de los oncogenes de la familia ras

I.B.1.- Estructura del oncogen N-ras

Se analizó el oncogen **N-ras** utilizando para las hibridaciones un fragmento de 0.6 kb correspondiente al primer exón del protooncogen humano (268). Este reconoce específicamente un sector del gen **N-ras** y no a los demás oncogenes de la familia ras. Se observó una banda de 9.2 kb -Figura r.1D-, en concordancia con lo informado previamente (269). También se hibridizó el mismo filtro con la sonda control de β -globina. El resultado muestra amplificación presente en la muestra #X, de células tumorales aisladas -Figura 2E-, y copia única para el resto de los tumores analizados. Puede verse que la línea celular de leucemia promielocítica humana HL60, de la que se sabe presenta el

oncogen **N-ras** activado (270), muestra también la banda de 9.2 kb. Esto indica que una posible activación por mutación puntual en los tumores mamarios podría ocurrir sin alteración del patrón de restricción para Eco R1.

Para cuantificar la amplificación observada se sembraron sucesivas diluciones del ADN del tumor #X. Como se observa en la Figura 1E, la intensidad de la banda presente en 10 μ g de ADN de placenta es similar a la mostrada por 2.5 μ g de ADN de la células tumorales purificadas, lo que indica que la amplificación sería aproximadamente de 4 veces.

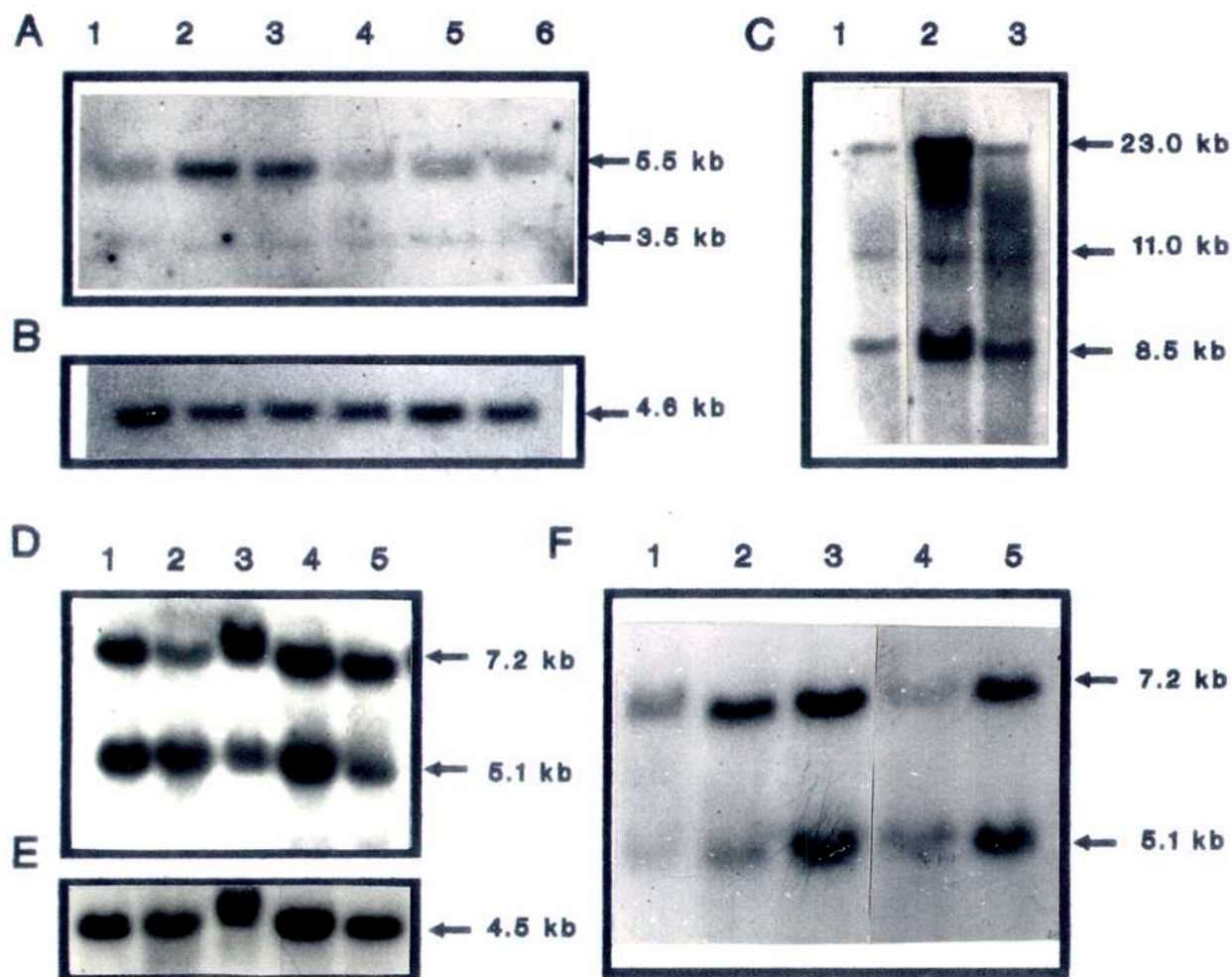
I.B.2.- Estructura del oncogen Ki-ras

El estudio del oncogen **Ki-ras** reveló la presencia de dos bandas de 3.5 kb y 4.5 kb, en placenta y en todos los tumores estudiados, incluyendo las células tumorales aisladas y los linfocitos de la misma paciente (Figura r.2A). La sonda específica HiHi-3 usada corresponde a un fragmento de 1.0 kb del clon KBE-2 del virus del sarcoma de Kirstein -denominado clon Ki-MuSV- (271). Las mismas bandas fueron informadas por otros autores (15). Se observó amplificación en los tumores #XI y #XII, confirmada al hibridizar el mismo filtro con la sonda de β -globina -Figura r.2B-.

I.B.3.- Estructura del oncogen Ha-ras

El análisis del oncogen **Ha-ras**, llevado a cabo con un fragmento Bam H1 de 6.6 kb conteniendo la actividad transformante (18), reveló tres bandas de 23.0 kb, 11.0 kb y 8.5 kb -Figura 2C-. Reportes previos indican la presencia de

**Figura r.2: Analisis de los oncogenes
ras y *neu* en tumores mamarios**



Southern blots de ADN extraídos de distintos tejidos digeridos con Eco R1.

2A: Sonda: v-KI-ras; 1: placenta; 2: #XI; 3: #XII; 4: #II; 5: #X; 6: linfocitos #X.

2B: Sonda: Bglobina; 1: placenta; 2: #XI; 3: #XII; 4: #II; 5: #X; 6: linfocitos #X.

2C: Sonda: Ha-ras; 1: placenta; 2: #X; 3: linfocitos #X.

2D: Sonda: neu; 1: placenta; 2: MOF-7; 3: MDA; 4: endometrio #1; endometrio #2.

2E: Sonda: pFN4H0.95; 1: placenta; 2: MOF-7; 3: MDA; endometrio #1; endometrio #2.

2F: Sonda: neu; 1: placenta; 2: G (#13); 3: H (#15); 4: I (#20); 5: J (#21).

las tres bandas, aunque señalan que sólo la de 23 kb permanece al hibridizar en condiciones de alta astringencia con la misma sonda utilizada por nosotros. En nuestros experimentos, a pesar de utilizar condiciones de hibridización y lavado de alta astringencia, las tres bandas se mantuvieron presentes.

Se detectó amplificación en la muestra #X, de células tumorales aisladas; la intensidad de las bandas detectadas en el resto de los tumores estudiados fue igual a la presentada por placenta. Como fue posible obtener linfocitos circulantes de la paciente, se purificó ADN a partir de los mismos y se analizó. Las bandas presentes fueron idénticas a las del tumor -Figura r.2C-, lo que descarta un rearrreglo cromosómico importante, y parece haber una amplificación selectiva en las células tumorales -en este caso se verificó que fueron sembradas cantidades equivalentes de ADN en los distintos carriles por tinción con bromuro de etidio-.

El estudio de la amplificación de los distintos oncogenes analizados se resume en la Tabla r.1, y permite concluir que, si bien existe un aumento en el número de copias en algunos casos, dicha amplificación es de nivel bajo (hasta 4 veces) y no es un fenómeno generalizado en el cáncer de mama.

Tabla r.1: Analisis genomico de oncogenes *myc* y *ras*

tumor oncogen	I	II	III	IV	V*	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>myc</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d
N- <i>ras</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ha- <i>ras</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nd	nd
Ki- <i>ras</i>	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	+

Se indican los tumores analizados para cada oncogen. El signo + significa que fue detectada amplificación; el signo - indica que el tumor presenta una sola copia del oncogen; nd: no determinado.

* Metástasis axilar.

I.C.- Análisis genómico del oncogen neu

Antecedentes y objetivos

Unos años después que realizáramos nuestro estudio de oncogenes, se descubrió que un oncogen con relevancia en cáncer de mama es el neu (116). Este oncogen se halla amplificado en un alto porcentaje de tumores mamarios, predominantemente en los estadios III y IV (117).

Resultados

Nosotros analizamos algunos tumores, líneas celulares, y tejidos normales con una sonda que contiene 1.6 kb del protooncogen humano (248). Los resultados se muestran en la Figura r.2D, donde aparecen dos bandas de 7.2 kb y 5.1 kb.

Como control de la cantidad de ADN sembrada en cada carril, se usó la sonda pFN4H0.95, un fragmento del gen de fibronectina (246), de copia única, que reveló una banda de 4.5 kb, en concordancia con lo esperado (246) -Figura 2E-.

El estudio de las líneas celulares MCF-7 (223) y MDA (227) demuestra que presentan una sola copia del oncogen, al igual que placenta y endometrio normales.

Los 11 tumores primarios de mama analizados muestran amplificación en 5 casos y presentan de 2 a 9 copias; algunos de ellos se encuentran en la Figura r.2F.

Las características clínicas de las pacientes cuyos tumores fueron estudiados se muestran en la Tabla r.2.

**Tabla r.2: Analisis de amplificacion
del oncogen *neu***

Paciente	Edad	Estadio Clínico	Gen Neu (nº copias)
A (#4)	53	II	1.0
B (#6)	59	I	1.0
C (#7)	45	II	1.0
D (#8)	33	II	1.0
E (#9)	57	I	2.0
F (#10)	60	III	1.0
G (#13)	38	III	3.0
H (#14)	35	III	9.0
I (#15)	61	III	5.0
J (#20)	56	II	1.0
K*(#21)	53	IV	3.0

Se presentan las características clínicas de las pacientes estudiadas y el número de copias del oncogen *neu* detectadas. La denominación numérica (#) se corresponde con la utilizada en el análisis de RE (Tabla 4).

* Metástasis axilar.

II.- Estudio genico de receptores de hormonas esterideas en cancer de mama

II.A.- Analisis del gen del receptor estrogenico

II.A.1.- Análisis de la estructura del gen RE normal.

Antecedentes y objetivos

A pesar que el tejido mamario normal expresa muy pobremente el RE, en la mayoría de los tumores de mama se halla presente en cantidades considerables (198). El motivo de esta diferencia no ha sido dilucidado, pero podría indicar que el RE ejerce una función de importancia en el crecimiento tumoral. Tampoco se ha establecido el mecanismo por el cual su expresión se halla aumentada en el tejido

tumoral. Nosotros decidimos analizar la posibilidad de que exista una alteración génica del **RE**.

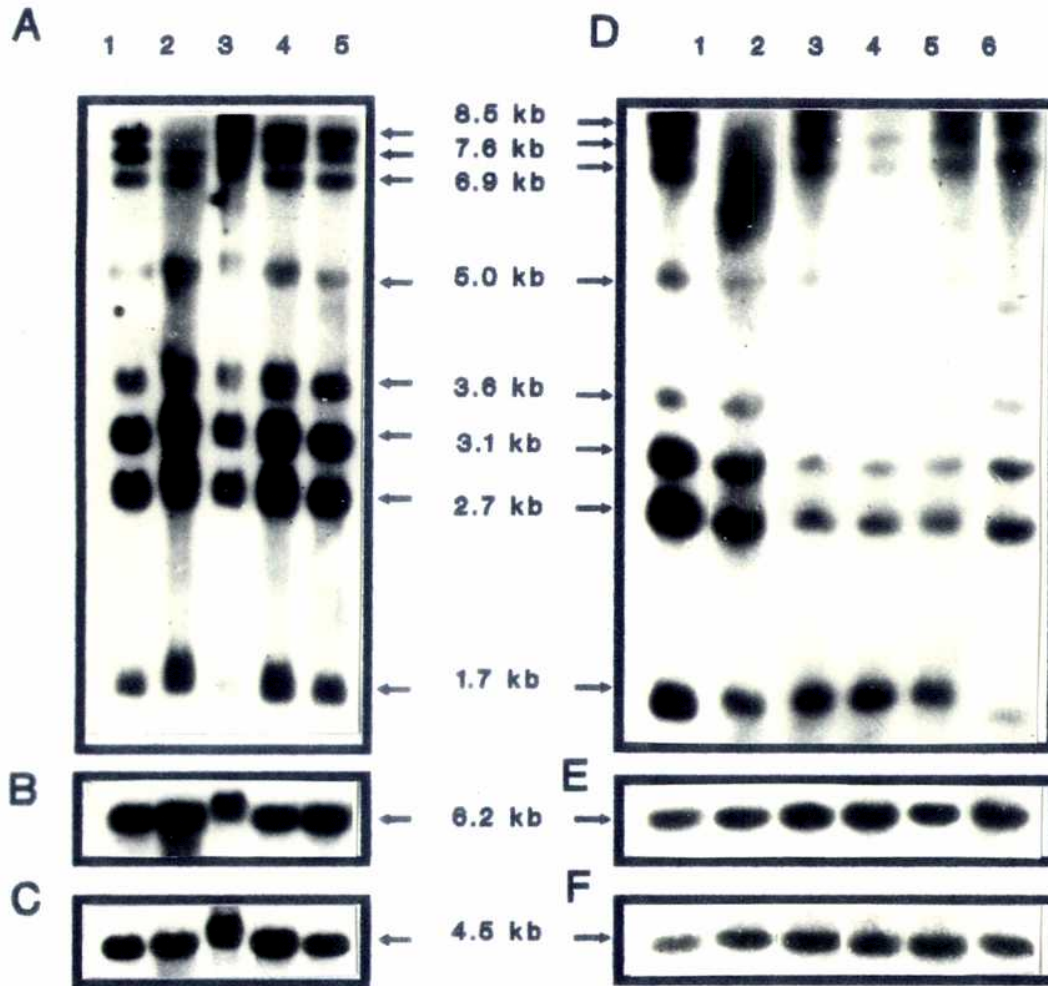
Con esta intención realizamos los primeros experimentos dirigidos a determinar el patrón del gen **RE** en los tejidos normales, y a detectar posibles diferencias en este patrón en tejidos con una gran divergencia de expresión de **RE** como placenta y endometrio. Fueron también analizados ADN's aislados de líneas celulares de cáncer de mama humano **RE**-positivas (MCF-7) y **RE**-negativas (MDA), y así poder comparar la estructura génica del **RE** en tejidos normales y tumorales.

Resultados

Se utilizó la técnica de Southern (252) para analizar el gen **RE**. Las hibridizaciones fueron llevadas a cabo con el plásmido HEO que codifica para la secuencia completa del ADNc (168). En todos los casos el patrón obtenido fue idéntico, ocho bandas de 8.5 kb, 7.6 kb, 6.9 kb, 5.0 kb, 3.6 kb, 3.1 kb, 2.7 kb y 1.7 kb -Figura r.3A-. Estos resultados están en concordancia con los informados para la línea celular MCF-7 (155).

Los filtros fueron luego deshibridizados y rehibridizados con las sondas rRNA -Figura r.3B- y pFN4H0.95 -Figura r.3C-. Las hibridizaciones con estas dos sondas, que detectan un gen múltiple copia y uno simple copia respectivamente, fueron usadas como control de las variaciones en la cantidad del gen **RE** debidas a razones técnicas. Cuando se analizaron los cocientes **RE**/rRNA, fue hallada una relación similar a placenta para las diferentes muestras. La misma situación se presentó cuando se analizó los cocientes **RE**/pFN4H0.95, con la única excepción del ADN de MCF-7 (relación=1.5). Con esta posible excepción, puede

Figura r.3: Analisis del gen *RE* en lineas celulares y tejidos humanos



Southern blots de ADN_e extraídos de distintas líneas celulares y tejidos humanos digeridos con Eco R1.

- 3A: Sonda: HE0; 1: placenta; 2: MCF-7; 3: MDA; 4: endometrio #1; 5: endometrio #2.
 3B: Sonda: rRNA; 1: placenta; 2: MCF-7; 3: MDA; 4: endometrio #1; 5: endometrio #2.
 3C: Sonda: pFN4H0.95; 1: placenta; 2: MCF-7; 3: MDA; 4: endometrio #1; 5: endometrio #2.
 3D: Sonda: HE0; 1: #9; 2: #14; 3: #4; 4: #7; 5: #6; 6: placenta.
 3E: Sonda: rRNA; 1: #9; 2: #14; 3: #4; 4: #7; 5: #6; 6: placenta.
 3F: Sonda: pFN4H0.95; 1: #9; 2: #14; 3: #4; 4: #7; 5: #6; 6: placenta.

concluirse que el gen **RE** no está amplificado en ninguno de estos tejidos o células.

Con el propósito de identificar las bandas genómicas que codifican los diferentes dominios del gen **RE**, y poder localizar eventuales alteraciones génicas en tumores mamarios, fueron llevadas a cabo hibridizaciones con el plásmido HE14 que contiene las secuencias codificantes del dominio de unión a la hormona del gen **RE** (168). En la Figura r.4B puede observarse que solo las bandas de 8.5 kb, 7.6 kb, 6.9 kb, 3.6 kb y 2.7 kb están presentes.

II.A.2.- Estructura del gen **RE en tumores primarios de mama**

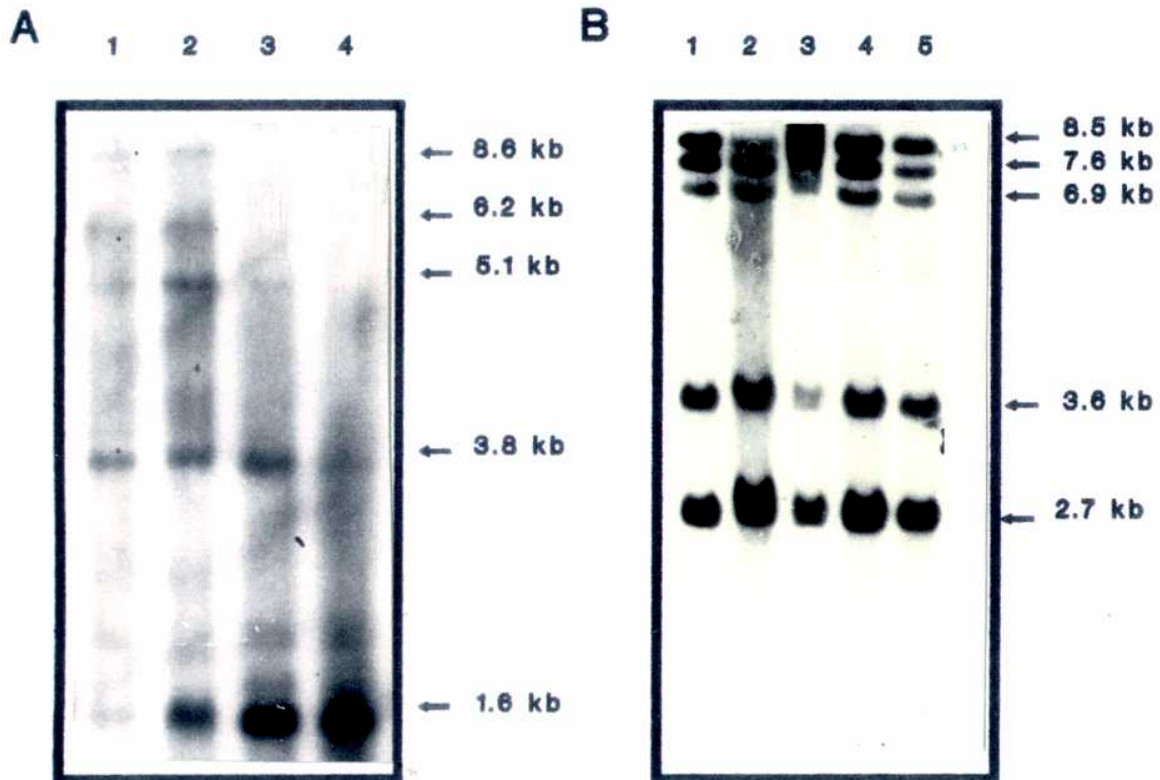
Antecedentes y objetivos

Una vez analizada la estructura general del gen **RE** en tejidos normales y líneas celulares de cáncer mamario decidimos compararla con la de muestras de tumores de mama de diversas pacientes, con la intención de detectar cambios cualitativo o cualitativo en el gen **RE** ya sea en los tumores **RE**-positivos que presentan muy alto dosaje de **RE** tumores como en los tumores de mama y **RE**-negativos, que no expresan en **RE**, que expliquen esta diversidad de expresión.

Resultados

Algunos de los resultados obtenidos se ilustran en la Figura r.3D, donde una serie de tumores **RE**-positivos fueron analizados por Southern blot con la sonda HEO. En la misma figura se muestran los resultados de hibridizaciones con

Figura r.4: Analisis del gen *RE* en celulas de cancer mamario



Southern Blots de ADN_e extraídos de diversos tejidos humanos.

4A: Analisis de metilacion. Enzimas: HpaII, MspI; Sonda: HEO;
1: MCF-7/HpaII; 2: MDA/HpaII; 3: MCF-7/MspI; 4: MDA/MspI.

4B: Analisis del gen RE en lineas celulares de cancer de mama, placenta endometrio normal. Enzima: Eco R1; Sonda: HE14; 1: placenta; 2: MCF-7; 3: MDA; 4: endometrio #1; 5: endometrio #2.

sondas rRNA y pFN4H0.95 (Figuras r.3E y r.3F respectivamente). Cuando el cociente de intensidades entre las bandas correspondientes a HEO y a rRNA para placenta fue tomada como unidad, la relación para los tumores #9, #14, #4, #7 y #6 fue 3.0, 1.6, 1.0, 1.0 y 1.0, respectivamente. Se obtuvieron idénticos resultados cuando la relación de intensidad entre las bandas correspondientes a HEO y a pFN4H0.95 para placenta fue tomada como unidad. Como consecuencia, la primer relación fue usada para el análisis de todos los tumores.

Las características clínicas relevantes de los pacientes estudiados, incluyendo la amplificación génica del RE y las determinaciones bioquímicas de RE y RPg se indican en la Tabla r.3.

Los resultados obtenidos demuestran que: 1) el patrón genómico del RE fue similar en los tumores RE-positivos y en los RE-negativos; 2) una copia única del gen RE fue hallada en todos los tumores RE-negativos analizados (8/8); 3) en algunos tumores RE-positivos (6/14) fue detectada una amplificación del gen RE.

En algunos de los tumores analizados se había investigado previamente la presencia de amplificación del oncogen neu. Sus datos se resumen en la Tabla r.4.

Considerando los tumores que expresan RE, los que presentaron copia única del RE también lo hicieron para el neu (5 casos), y el resto presentó amplificación para ambos genes (3 casos), aunque no de manera proporcional. Los tumores que no expresan RE mostraron una sola copia del gen RE, y amplificación para el neu en 2 de 3 casos.

Podemos concluir que a pesar de su diferente localización cromosómica, la coamplificación de los genes RE y neu es un fenómeno frecuente en los tumores RE-positivos.

Tabla r.3: Correlacion entre contenido de RE y su amplificacion genica

Paciente	Edad	Estadio Clínico	RE (fmoles/mg prot)	RPg	Gen RE (nºde copias)
1	71	II	445	0	1.6
2	57	II	397	241	1.0
3	38	II	308	207	2.0
4	53	II	275	60	1.0
5	74	II	200	71	1.0
6	59	I	187	0	1.0
7	45	II	141	155	1.0
8	33	II	103	348	1.0
9	57	I	77	241	3.0
10	60	III	62	169	1.0
11	70	II	32	10	2.4
12	56	II	14	0	1.0
13	38	III	13	0	2.6
14	35	III	12	28	1.6
15	61	III	0	0	1.0
16	40	II	0	0	1.0
17	48	I	0	0	1.0
18	44	III	0	0	1.0
19	51	II	0	0	1.0
20	56	II	0	0	1.0
21*	53	IV	0	0	1.0
22	83	III	0	0	1.0

Se indican las características clínicas de los pacientes estudiados y los valores de RE y RPg.

* Metástasis axilar.

**Tabla r.4: Correlacion de amplificacion
entre genes *neu* y *RE***

Paciente	Edad	Estadio Clínico	NºCopias Gen neu	NºCopias Gen RE
A (#4)	53	II	1.0	1.0
B (#6)	59	I	1.0	1.0
C (#7)	45	II	1.0	1.0
D (#8)	33	II	1.0	1.0
E (#9)	57	I	2.0	3.0
F (#10)	60	III	1.0	1.0
G (#13)	38	III	3.0	2.6
H (#14)	35	III	9.0	1.6
I (#15)	61	III	5.0	1.0
J (#20)	56	II	1.0	1.0
K*(#21)	53	IV	3.0	1.0

Se indican las características clínicas de los pacientes estudiados y los valores de RE y el número de copias de los genes neu y RE dosadas. La denominación numérica (#) se corresponde con la utilizada en el análisis de RE (Tabla r.3) y la alfabética con la utilizada en el análisis del oncogen neu (Tabla r.2).

* Metástasis axilar.

II.A.3- Determinación del contenido de RE_n en los tumores que presentaron amplificación

Antecedentes y objetivos

Actualmente, está aceptado que el receptor estrogénico (RE) está localizado en el núcleo de las células, tanto en su estado libre como ocupado por la hormona. El hecho de que el RE se detecte en la fracción citosólica de los homogenatos de tejidos resulta un artefacto del método de preparación (271-274). La forma libre no unida a la hormona es fácil de extraer del homogenato de tejido con buffers de baja fuerza iónica, es la que se determina rutinariamente, y se denomina RE_c. En el campo de la investigación del cáncer de mama, la mayoría de los datos relacionados con la concentración del RE, con la respuesta a terapia endócrina y con el pronóstico de la enfermedad están basados en la determinación del RE_c (275-279).

El reciente desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen epitopes del RE humano permite la determinación *in situ* del RE en cortes de tejido, donde se ha comprobado su localización nuclear (RE_n) (258).

En nuestro trabajo experimental, la determinación de receptor se realizó rutinariamente por el método bioquímico, o sea, se dosó RE_c.

Como la amplificación del RE hallada en los tumores primarios analizados no estuvo directamente relacionada con el contenido RE_c, consideramos interesante dosar la totalidad de las moléculas de RE mediante el uso del anticuerpo monoclonal en cortes de tejido realizados por congelación (258).

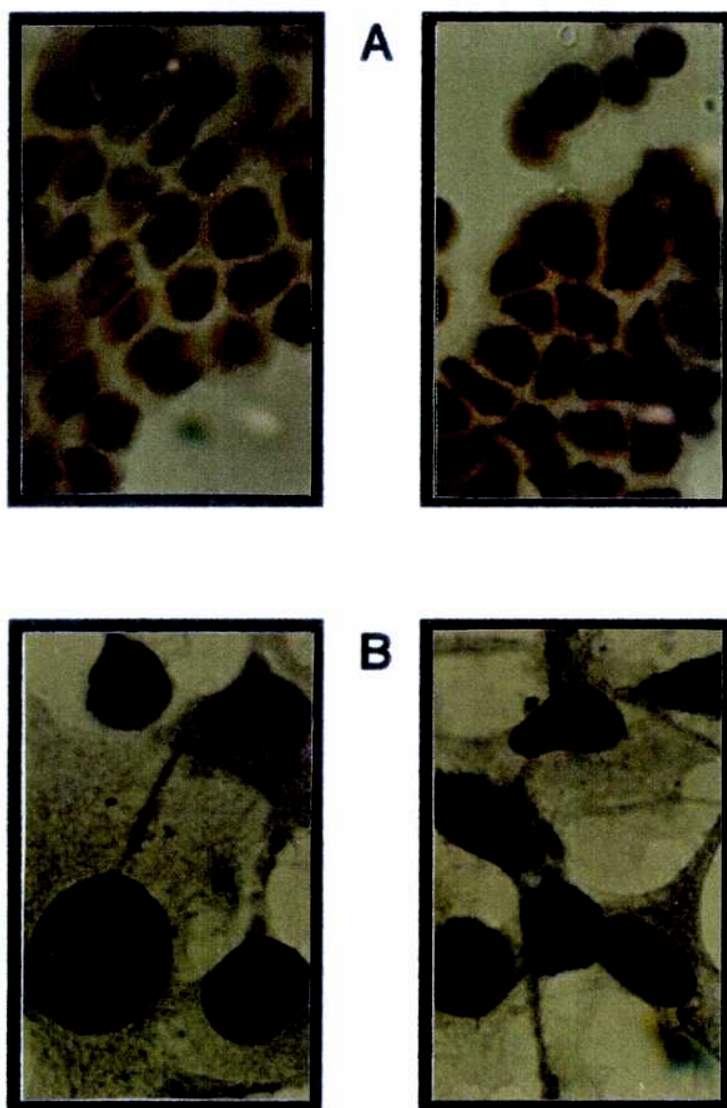
Resultados

Primeramente realizamos la determinación de RE por inmunohistoquímica sobre células MCF-7 y MDA-235 fijadas con formaldehído. El resultado se muestra en la Figura r.5. Se observa una fuerte señal marrón intenso que indica positividad en células MCF-7 (Figura r.5A), con algunas células negativas -de color azul, teñidas con colorante de contraste-. Para la células MDA la negatividad fue completa (Figura r.5B). En ambos casos el resultado coincide con la determinación bioquímica publicada (280, 281). Nuestra intención fue analizar si la negatividad de las células MDA se debía a la presencia de un receptor estrogénico no funcional - que no pudiera unir hormona y por lo tanto no fuera detectado por el método bioquímico- o a la ausencia de proteína. Comprobamos que este último hecho era el que ocurría.

En la Figura r.6 se observan cortes por congelación de tumores primarios de mama sobre los que se realizó la determinación de RE por inmunohistoquímica. Las Figuras 6A y 6B corresponden al tumor #10 (40x y 100x de aumento respectivamente), que mostró 25% de células con una intensidad de tinción moderada. La Figura r.6C muestra cortes correspondientes al tumor #18, y se observa que no expresa el RE.

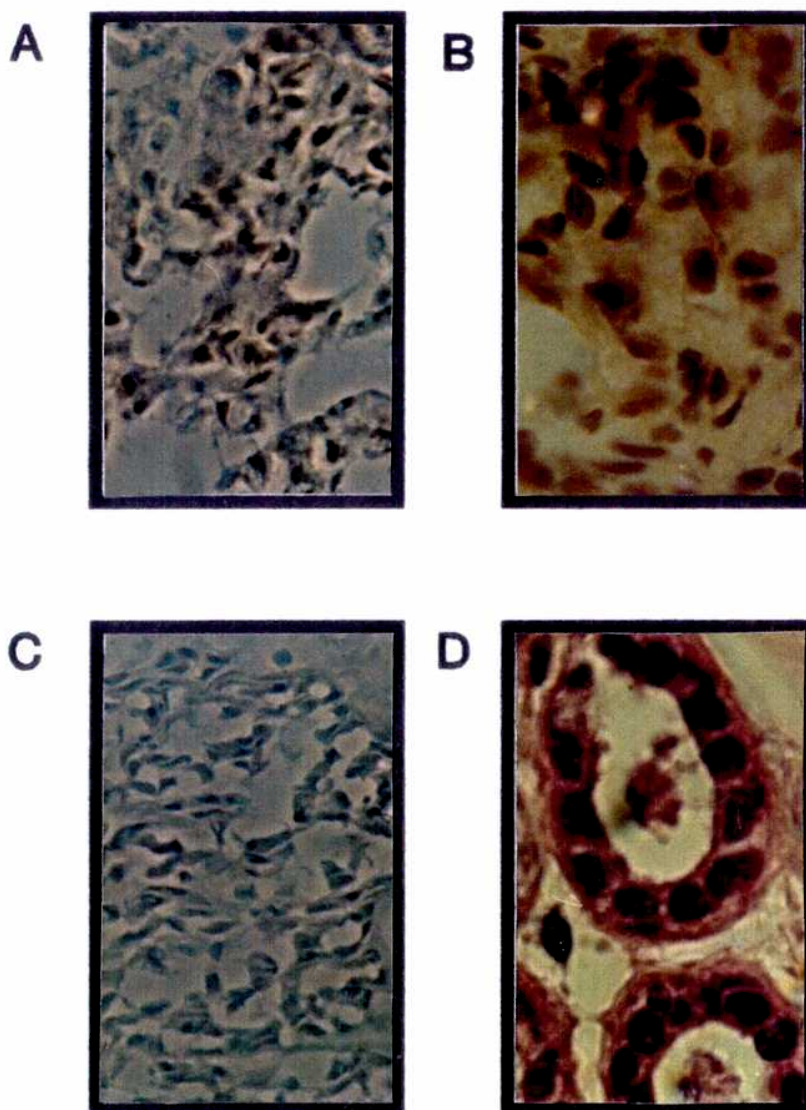
Puede notarse en las Figuras r.6A, r.6B y r.6C que las células epiteliales se encuentran distribuidas en aglomerados, sin formar estructuras. Aunque es necesario tener en cuenta que el tipo de corte realizado puede alterar la morfología del tejido -el corte de una inclusión en parafina conserva más fielmente las estructuras, pero la labilidad del RE hace que sea muy difícil su posterior

Figura r.5: Analisis de expresion de *RE* en lineas celulares de cancer de mama



Las celulas fueron fijadas y sometidas a la tecnica de Inmunohistoquimica para la determinacion del receptor estrogenico (RE).
A: celulas MCF-7 (aumento 100X); B: celulas MDA (aumento 100X).

**Figura r.6: Analisis de expresion de RE
en tumores primarios de mama**



Se realizaron cortes por congelacion de los tumores y se sometieron a la determinacion de RE por Inmunohistoquimica.

A: Tumor #10 (aumentado 40X); B: Tumor #10 (aumentado 100X); C: tumor #18 (aumentado 40X).

El tejido mamario normal se incluyo en parafina y los cortes se hicieron con coloracion hematoxilina-eosina. D: mama normal (aumentado 100X).

determinación-, representa una de las características del crecimiento desordenado de las células tumorales. En contraposición, pueden verse en la Figura 6D las estructuras de conductos epiteliales presentes en el tejido mamario normal.

Los resultados del análisis del RE comparando los dos métodos de determinación se resumen en la Tabla r.5; en los tumores #9, #11 y #13 el valor de REn es mucho mayor que el esperado considerando los datos de REc. Esto puede deberse a que el receptor se encuentre unido fuertemente a la sus secuencias blanco en el ADN y no sea extraído en las condiciones de baja fuerza iónica usadas en el método bioquímico. La razón de esta unión puede hallarse en la presencia del receptor ocupado por estradiol endógeno, en el caso de la paciente premenopáusica -#13-. En las pacientes postmenopáusicas podría indicar la existencia de moléculas de RE alteradas que se unen fuertemente a la cromatina aún en ausencia de hormona. Contrariamente a lo ocurrido en estos casos en los que se detectó alteración génica, en las pacientes #10, #12 y #15 que poseen una sola copia de RE, los datos de REn se hallan en correlación con los obtenidos para REc.

II.A.4.- Análisis de metilación del gen del receptor estrogénico.

Antecedentes y objetivos

En los organismos eucariotes la metilación del ADN está involucrada en el control de la expresión génica; del 2 % al

Tabla r.5: Correlacion entre las determinaciones REn y REc

Paciente	Edad Clínico	Estadio	REn (IHQ)	Indice SII	REc	NºCopias gen RE
9	57	I	42% ++	0.82	77	3.0
10	60	III	25% ++	0.50	62	1.0
11	70	II	80% ++	1.60	32	2.4
12	56	II	10% +	0.10	14	1.0
13	38	III	70% ++	1.40	13	2.6
15	61	III	5% +	0.05	0	1.0

Se indican las características clínicas de las pacientes y los valores de receptor estrogénico medidos por el método bioquímico (REc) y por inmunohistoquímica (REn). Los valores del índice de tñido se calcularon en base a la fórmula descrita en Materiales y Métodos.

7 % de las citosinas del ADN de los mamíferos se encuentran como a m⁵cyt. La expresión tejido específica de algunos genes como β -globina, ovoalbúmina y otros, ha sido correlacionada con la demetilación de dinucleótidos CpG (282, 283).

Por otro lado, la metilación parece estar asociada al proceso neoplásico. Han sido observados cambios en la metilación del ADN en algunos cánceres humanos (284); la demetilación de secuencias específicas ha sido implicada en el aumento de la actividad transcripcional de varios genes (283).

El 90 % de los residuos m⁵cyt presentes en ADN eucariote se encuentra en la secuencia CpG. Afortunadamente, varias enzimas reconocen estos sitios. La enzima de restricción HpaII reconoce la secuencia CpCpGpGp, pero no actúa si está metilada. De esta manera, es una herramienta muy útil para estudiar la metilación de un gen. En la práctica, para que un resultado pueda ser considerado confiable, es necesario tener un control que muestre el corte total, en todas las secuencias reconocidas, estén o no metiladas. La enzima de restricción Msp I reconoce el mismo sitio CpCpGpGp, y lo hace independientemente de la existencia de metilación. Así, mediante la técnica de Southern (252), comparando las bandas presentes al digerir con Hpa II con las correspondientes a Msp I, puede localizarse los sitios CCGG metilados.

Con la intención de averiguar si la metilación de los residuos C juega algún rol en el control de expresión del receptor estrogénico, analizamos con la enzima de restricción HpaII, usando la enzima MspI como control, el patrón de metilación del gen RE en una línea celular de cáncer mamario de alta expresión -RE-positiva-, MCF-7 (223) y en otra que no expresa el receptor -RE-negativa-, MDA-235 (227) con la sonda HeO, que codifica para la secuencia completa del ADNc del RE (168).

Resultados

En la Figura r.4A se aprecia una diferencia en el patrón de restricción entre las enzimas HpaII -bandas de 8.6 kb, 6.2 kb, 5.1 kb, 3.8 kb y 1.6 kb- y MspI -bandas de 3.8 kb y 1.6 kb- , lo que implica que existen en el gen del RE secuencias CCGG metiladas. Sin embargo, no parece haber diferencia en las bandas para HpaII entre ambas líneas celulares, lo que indicaría que la metilación del gen no está involucrada de manera evidente en la regulación de la expresión génica del receptor de estradiol.

II.B.- Analisis del gen del receptor de progesterona

II.B.1.- Estudio de la estructura del gen del receptor de progesterona humano

Antecedentes y objetivos

De manera análoga a lo que ocurre con el RE, el receptor de progesterona (RPg) se halla presente en la mayoría de los tumores mamarios y ausente en el tejido de mama normal (204). Con la intención de analizar si existía algún cambio a nivel del gen RPg, como amplificación, translocación, delección, etc. en los tejidos tumorales, analizamos

primeramente la estructura del gen RPg humano en ADNs aislados a partir tejidos normales como placenta y una patología benigna de útero, otro órgano blanco de las hormonas esteroideas, un fibroma, comparando el tejido tumoral con endometrio y miometrio normales de la misma paciente.

Luego estudiamos ADNs provenientes de diversas líneas celulares de cáncer de mama, RE-positiva y RPg inducible (MCF-7) (223), RE-positiva RPg constitutivo (T47-D) (227), y RE-negativa (MDA) (228).

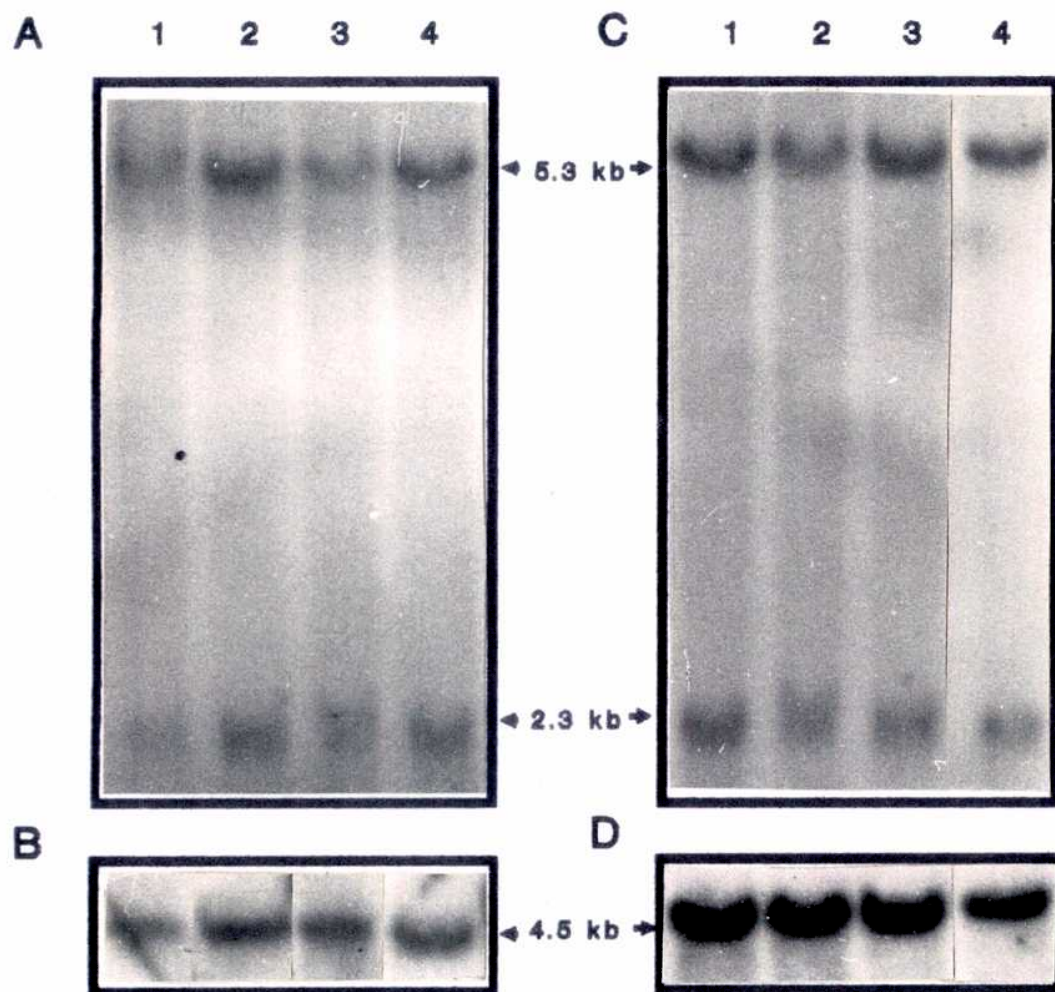
Resultados

Las hibridizaciones fueron llevadas a cabo con el plásmido BSM-PR que contiene casi todas las secuencias codificantes del ADNc del gen RPg humano (245). El patrón obtenido fue el mismo en todos los casos: dos bandas de 5.3 kb y 2.3 kb (Figuras r.7A y r.7C).

Luego los filtros fueron deshibridizados y rehibridizados con la sonda pFN4H0.95 (246), como control interno para evaluar la cantidad de ADN presente -Figuras r.7B y r.7D-. Cuando se analizó la relación RPg/pFN4H0.95, fue hallada una relación similar a la encontrada en placenta para las diferentes muestras.

De este análisis se concluye que los tejidos y líneas celulares estudiados no presentan rearrreglos ni amplificaciones del gen RPg.

Figura r.7: Analisis del gen *RPg* en lineas celulares y tejidos humanos



Southern blots de ADN_e extraídos de distintas líneas celulares y tejidos humanos digeridos con Eco R1.

7A: Sonda: BMS-PR; 1: MCF-7; 2: T47-D; 3: MDA; 4: placenta.

7B: Sonda: pFN4OH0.95; 1: MCF-7; 2: T47D; 3: MDA; 4: placenta

7C: Sonda: BMS-PR; 1: placenta; 2: endometrio; 3: miometrio; 4: fibroma.

7D: Sonda: pFN4OH0.95; 1: placenta; 2: endometrio; 3: miometrio; 4: fibroma.

II.B.2.- Estructura del gen Rpg en tumores primarios de mama.

Antecedentes y objetivos

Aunque los estudios iniciales no mostraron diferencias evidentes entre el gen **RPg** de tejidos normales y las líneas celular de cáncer mamario, éstas representan casos particulares, los tumores de mama a partir de los cuales se originaron, por lo que decidimos de todos modos analizar una serie de tumores primarios.

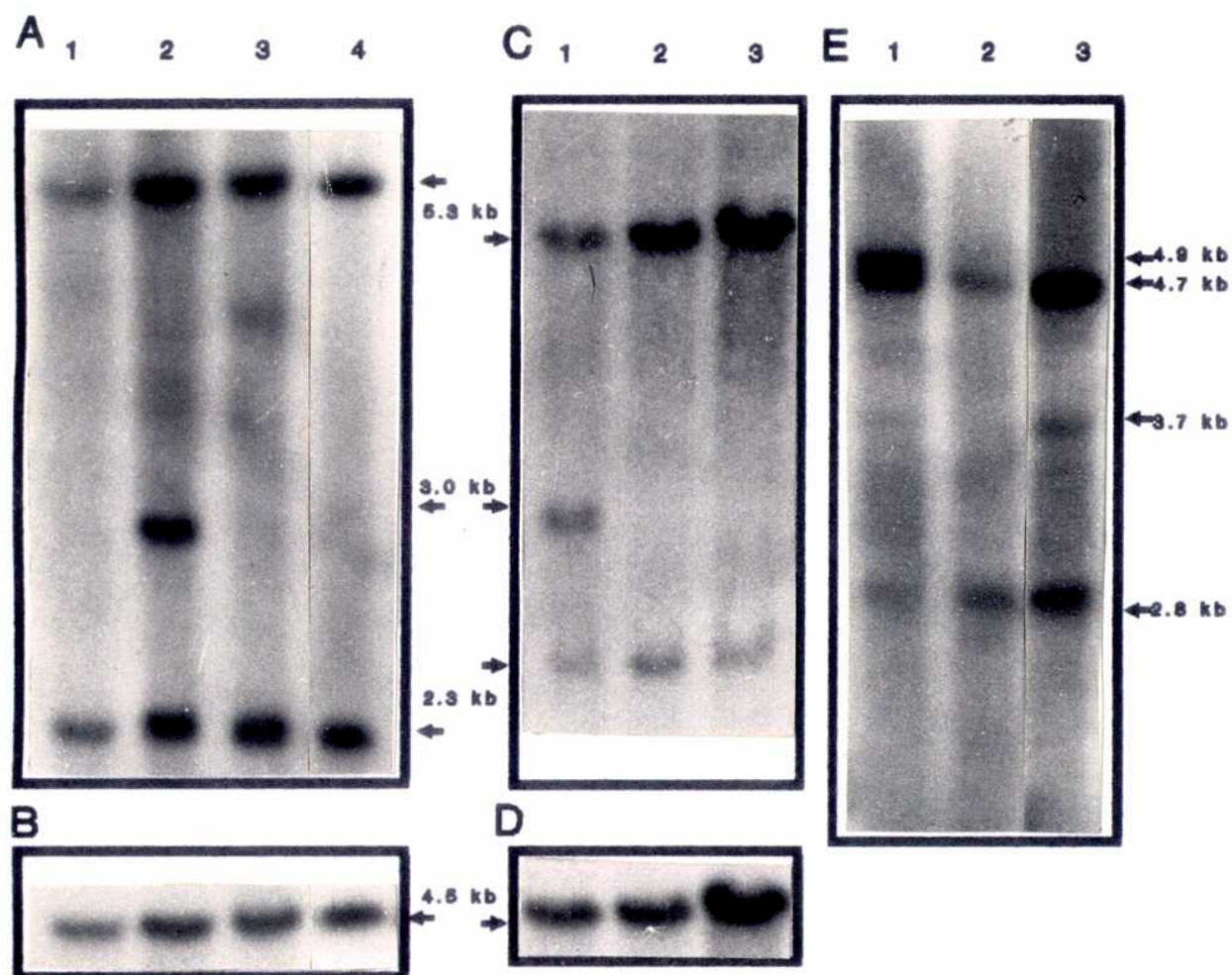
Los tumores estudiados poseen diferentes niveles de receptores hormonales, y analizamos sus ADNs en busca de alteraciones en el gen **RPg** que expliquen la diversidad de su expresión en los distintos tumores y con respecto a las células normales de mama.

Resultados

Algunos de los resultados obtenidos se presentan en la Figura r.8A, y corresponden a una serie de tumores representativos analizados por Southern blots con la enzima Eco R1 y la sonda BMS-PR. En la misma figura se observan los resultados de la hibridización con la sonda pFN4H0.95 - Figura 8B-. Tomando como unidad la relación de intensidad entre las bandas de de 5.3 kb del gen **RPg** y de 4.5 kb del gen de fibronectina presentes en placenta, la relación para todos los tumores estudiados fue 1.

En uno solo de los casos estudiados (tumor #11) apareció un patrón alterado, con una banda adicional de 3.0 kb para Eco R1 y 4.9 kb para Hind III -Figura r.8C y r.8E respectivamente-.

Figura r.8: Analisis del gen *RPg* en tumores primarios de mama



Southern blots de ADN's extraídos de distintas líneas celulares y tejidos humanos.
 8A: Enzima: Eco R1; Sonda: BMS-PR; 1: #3; 2: #11; 3: #13; 4: placenta.
 8B: Enzima: Eco R1; Sonda: pFN4HO.95; 1: #3; 2: #11; 3: #13; 4: placenta.
 8C: Enzima: Eco R1; Sonda: BMS-PR; 1: #11; 2: linfocitos #11; 3: placenta.
 8D: Enzima: Eco R1; Sonda: pFN4HO.95; 1: #11; 2: linfocitos #11; 3: placenta.
 8E: Enzima: Hind III; Sonda: BMS-PR; 1: #11; 2: linfocitos #11; 3: placenta.

Para analizar si la diferencia entre este tumor y los demás tumores estudiados se debía a la aparición de un alelo polimórfico, decidimos estudiar células normales de esta paciente. Se purificó ADN proveniente de linfocitos circulantes y analizó como lo muestran las Figuras r.8C y r.8E. Las bandas adicionales de 3.0 kb para Eco R1 y de 4.9 kb para Hind III presentes en las células tumorales estuvieron ausentes en el tejido normal de la paciente. Este resultado descarta la hipótesis de polimorfismo y muestra que esta modificación es específica del tejido tumoral.

Las características clínicas de los pacientes estudiados se presentan en la Tabla r.6; se incluyen las determinaciones bioquímicas de RE y de RPg y el número de copias del gen **RE** en los casos en los que fue determinado.

**Tabla r.6: Análisis genómico
del gen *RPg***

Paciente	Edad	Estadio Clínico	RE (fmoles/mg prot.)	RPg	Gen RE Nº de copias
A	49	III	87	416	n.d
B	52	II	31	290	n.d
C(#2)	57	II	397	241	1.0
D	52	IV	15	181	n.d
E	78	III	0	92	n.d
F	76	II	0	80	n.d
G(#5)	74	III	200	71	1.0
H	71	I	51	61	n.d
I(#4)	53	II	275	60	1.0
J	84	I	233	38	n.d
K+(#14)	35	III	12	28	1.6
L(#11)	70	II	32	10	2.4
M(#1)	71	II	445	0	1.6
N(#6)	59	I	187	0	1.0
O	64	II	70	0	n.d
P(#22)	83	III	0	0	1.0
Q*(#21)	53	IV	0	0	1.0
R(#17)	48	I	0	0	1.0
S(#20)	56	II	0	0	1.0

Se presentan las características clínicas de los pacientes estudiados, los valores de RE y RPg, y el número de copias del gen RE; n.d.: no determinado. La denominación numérica (#) se corresponde con la utilizada en el análisis de RE (Tabla r.3).

+ Tumor que presenta gen RPg alterado.

* Metástasis axilar.

III.- Analisis de la expresion de proteinas E₂-dependientes de la linea celular MCF-7 en medio definido

Antecedentes y objetivos

El estudio de los tumores primarios brinda valiosa información acerca de sus características genéticas. Sin embargo, estudios de regulación hormonal son sólo posibles de realizar mediante la manipulación del sistema, pudiendo controlar la composición del medio en el que crecen las células y analizando su comportamiento frente al agregado de hormonas.

Por este motivo, para estudiar la inducción de expresión mediada por estradiol en las células de cáncer de mama, utilizamos la línea celular MCF-7(223).

Como ha sido demostrado previamente, las células MCF-7 crecen rápidamente en un medio definido sin suero (medio ID), alcanzando una alta densidad celular con insulina como

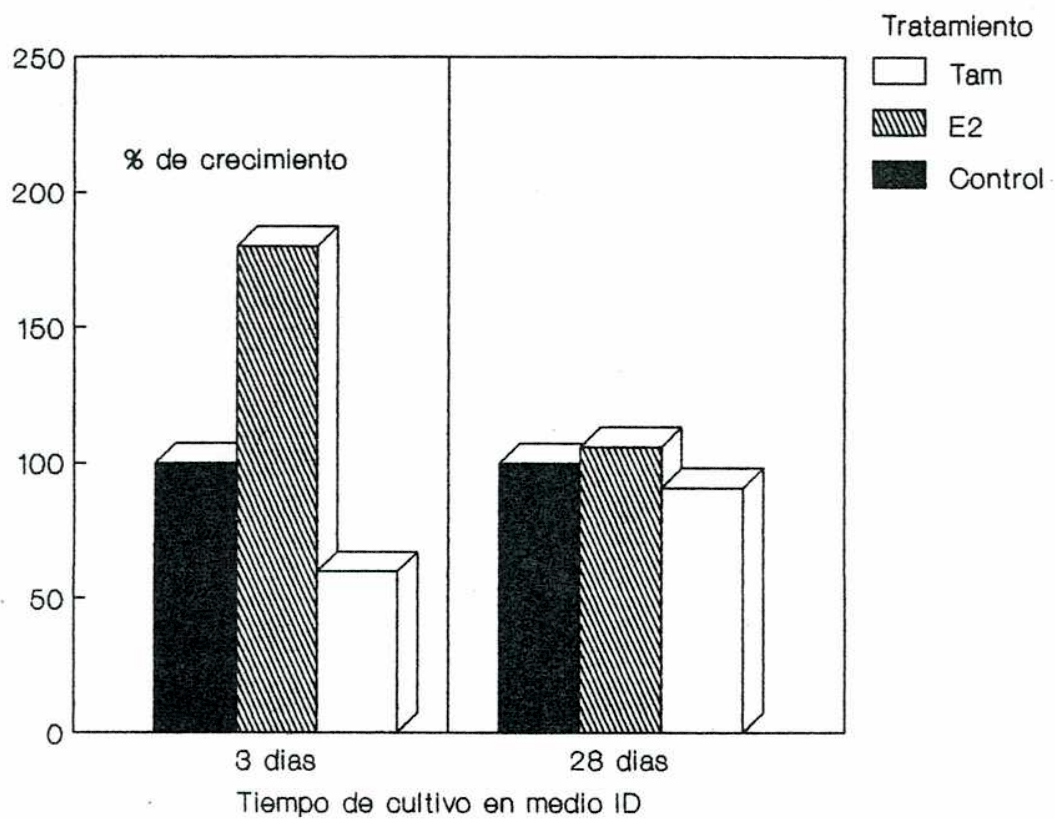
único factor de crecimiento (222). Para analizar si el rol del estradiol se alteraba al adaptarse las células al crecimiento en este medio, estudiamos el efecto del agregado de estradiol y su antagonista, el tamoxifeno en la velocidad de crecimiento celular. También medimos la expresión del receptor estrogénico, y de proteínas inducidas por el complejo E₂-RE, como pS2, DHFR, y 52K, y del oncogen Ha-ras, involucrado en la transducción de señales (286).

Resultados

III.A.- Caracterización del crecimiento celular

Al analizar el comportamiento de las células MCF-7 al ser cultivadas en un medio definido, encontramos que cuando las células crecieron por tres días en ausencia de suero respondieron a 1 nM E₂ casi duplicando el número de células y que el tamoxifeno inhibe un 40 % el crecimiento, en ambos casos respecto del control de células MCF-7 tratadas con una alícuota de etanol, que es el vehículo de las drogas usadas -Figura 9-. Sin embargo, las células que permanecieron un mes en ausencia de suero se vieron solo levemente afectadas por E₂ o tamoxifeno, actuando por uno, dos, o tres días - Figuras r.9 y r.10 y Tablas r.7 y r.8-. Podemos concluir que en ese período las células se vuelven independientes del E₂, y tal vez de otros factores de crecimiento presentes en el suero, con respecto a la velocidad de crecimiento.

Figura r.9: Efecto del E2 y del Tam en el crecimiento celular de MCF-7



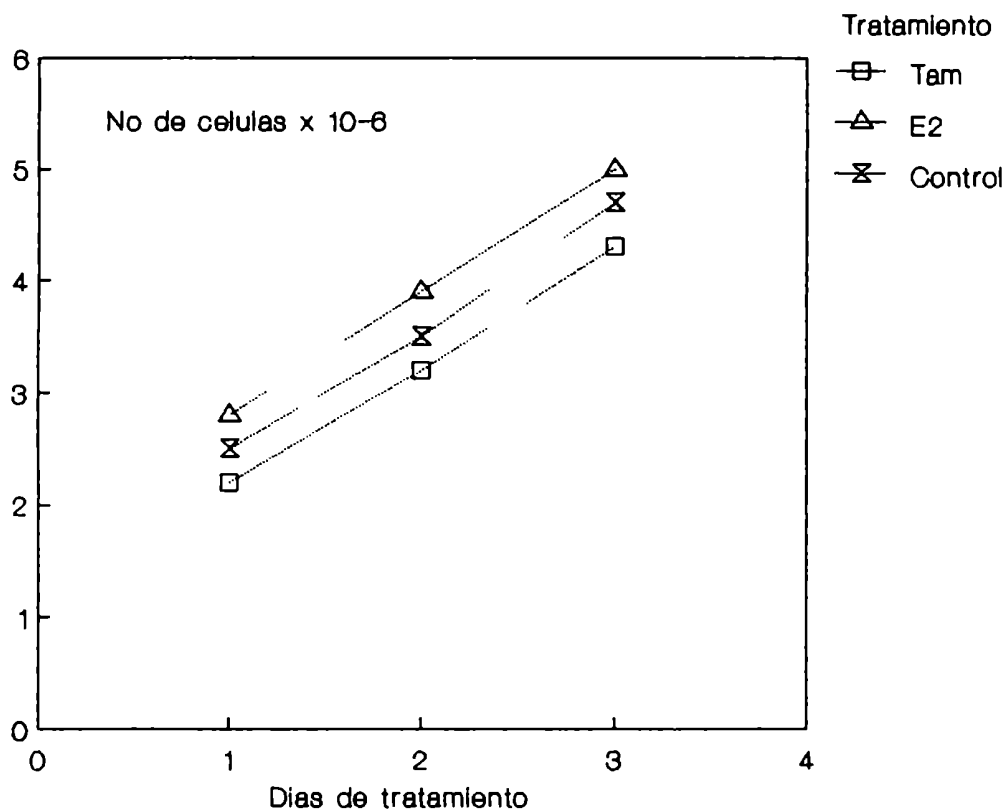
Porcentaje de crecimiento de células MCF-7 cultivadas en medio ID por un periodo corto (3 días) o un periodo largo (28 días) y luego suplementadas con 1 nM de estradiol (E2) o 1 μ M de tamoxifeno (Tam) por 3 días, con respecto al control (tratado con etanol).

Tabla r.7: Efecto del E2 y del Tam en el crecimiento celular de MCF-7

Tratamiento	Número de células $\times 10^{-6}$	
	3 días en ID	28 días en ID
1nM E ₂	3.9+/-0.15	5.0+/-0.10
1 μ M Tam	3.2+/-0.10	4.3+/-0.15
Control	3.5+/-0.10	4.7+/-0.10

Crecimiento de células MCF-7 cultivadas en medio ID por un período corto (3 días) o largo (28 días) y luego suplementadas con 1 nM estradiol (E₂), 1 μ M tamoxifeno (Tam) o una alícuota de etanol solo, que es el disolvente de las drogas (Control). Los valores tabulados son el promedio obtenido de dos experimentos realizados por duplicado y se expresan con su desviación standard.

Figura r.10: Curvas de crecimiento de células MCF-7 crecidas 1 mes en medio ID



Curvas de crecimiento de células MCF-7 cultivadas por 28 días en medio ID, y tratadas por 1, 2 y 3 días con 1 nM de estradiol (E2) o 1 μ M de Tamoxifeno (Tam).

Tabla r.8: Efecto del E2 y del Tam sobre células MCF-7 en medio ID

Tratamiento	Número de células x 10 ⁻⁶		
	1 ^{er} día	2 ^{do} día	3 ^{er} día
1nM E2	2.8+/-0.1	3.9+/-0.1	5.0+/-0.15
1µM Tam	2.0+/-0.1	3.2+/-0.1	4.3+/-0.1
Control	2.5+/-0.1	3.5+/-0.1	4.7+/-0.1

Crecimiento de células MCF-7 cultivadas en medio ID por 28 días y luego suplementadas por 1, 2 y 3 días con 1 nM estradiol (E2), 1 µM tamoxifeno (Tam) o una alícuota de etanol solo, que es el disolvente de las drogas (Control). Los valores tabulados son el promedio obtenido de dos experimentos realizados por duplicado y se expresan con su desviación standard.

III.B.- Análisis de la expresión de diversas proteínas

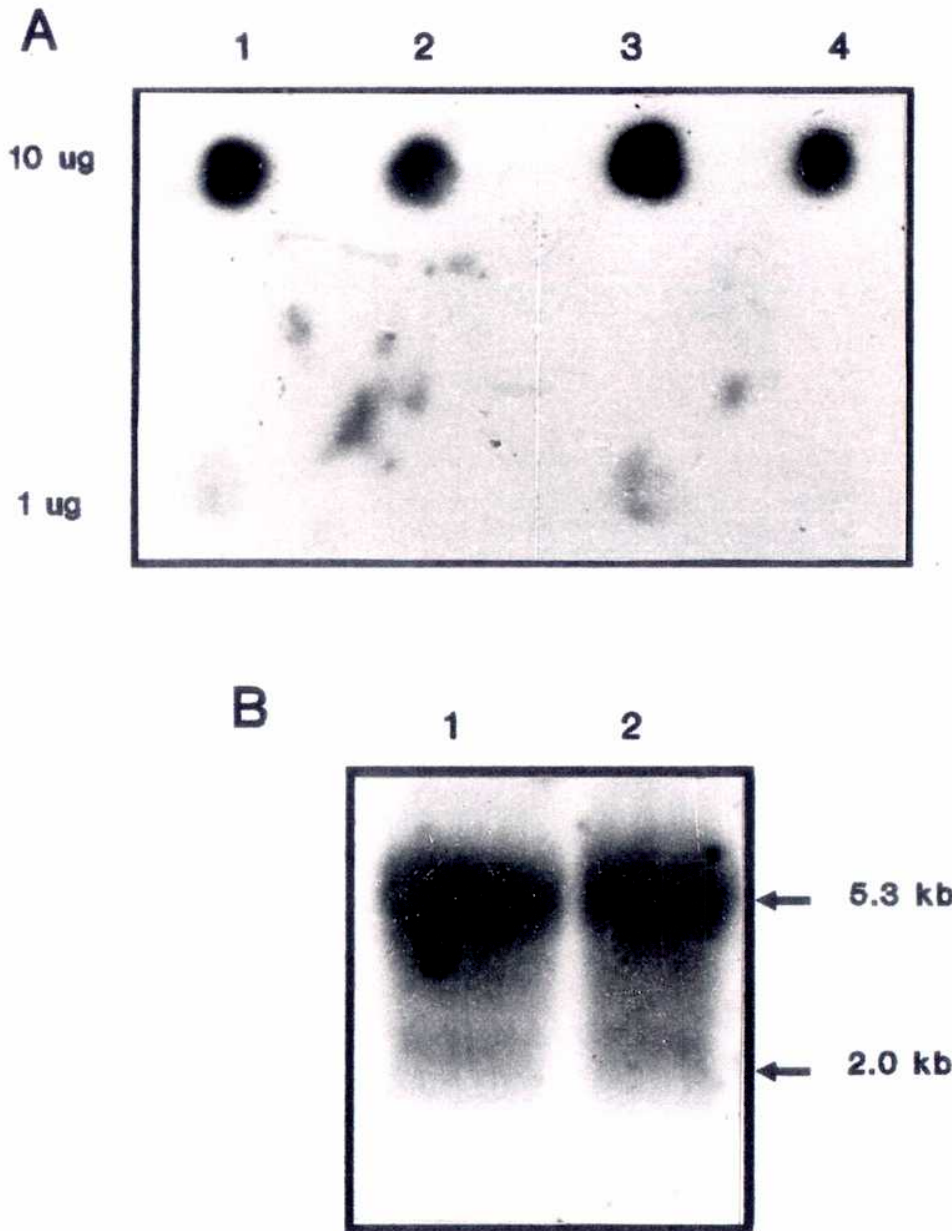
III.B.1.- Expresión de RE, pS2 y DHFR en medio ID

Al analizar la expresión del ARNm del RE en estas células deprivadas de E₂, encontramos niveles algo mayores en células en medio ID que en células cultivadas en presencia de suero -Figura 11, se observa señal positiva de hibridización con 1 µg de ARN proveniente de células cultivadas en medio ID únicamente-. Estos resultados se repitieron a partir de células crecidas en medio sin rojo de fenol como indicador de pH, del que se conoce que ejerce un efecto débilmente estrogénico (287).

Para analizar si estos resultados tenían alguna implicancia regulatoria, decidimos investigar los niveles de proteínas normalmente inducidas por el complejo RE-E₂.

La técnica de Northern blot reveló en medio ID una banda de 0.6 kb correspondiente al ARNm de pS2 cuya intensidad fue mayor que la presente en células creciendo con 10% de suero fetal bovino -medio FBS- que contiene cantidades fisiológicas de E₂ -Figura r.12A, carriles 1 y 2). Usando el ADNc 36B4, que corresponde a un ARNm no afectado por E₂ en células MCF-7, para corregir las variaciones en las cantidades de ARN sembradas en cada carril, la relación de intensidades reveló que la expresión de pS2 en medio ID fue dos veces la presente en medio FBS. En los experimentos iniciales las células fueron crecidas en medio con rojo de fenol como indicador de pH; para descartar que los elevados niveles de ARNm de pS2 fueran debidos al efecto estrogénico de esta droga (287), la purificación de ARN fue repetida a partir de células creciendo en medios ID y FBS libres de rojo de fenol. Los resultados obtenidos fueron idénticos

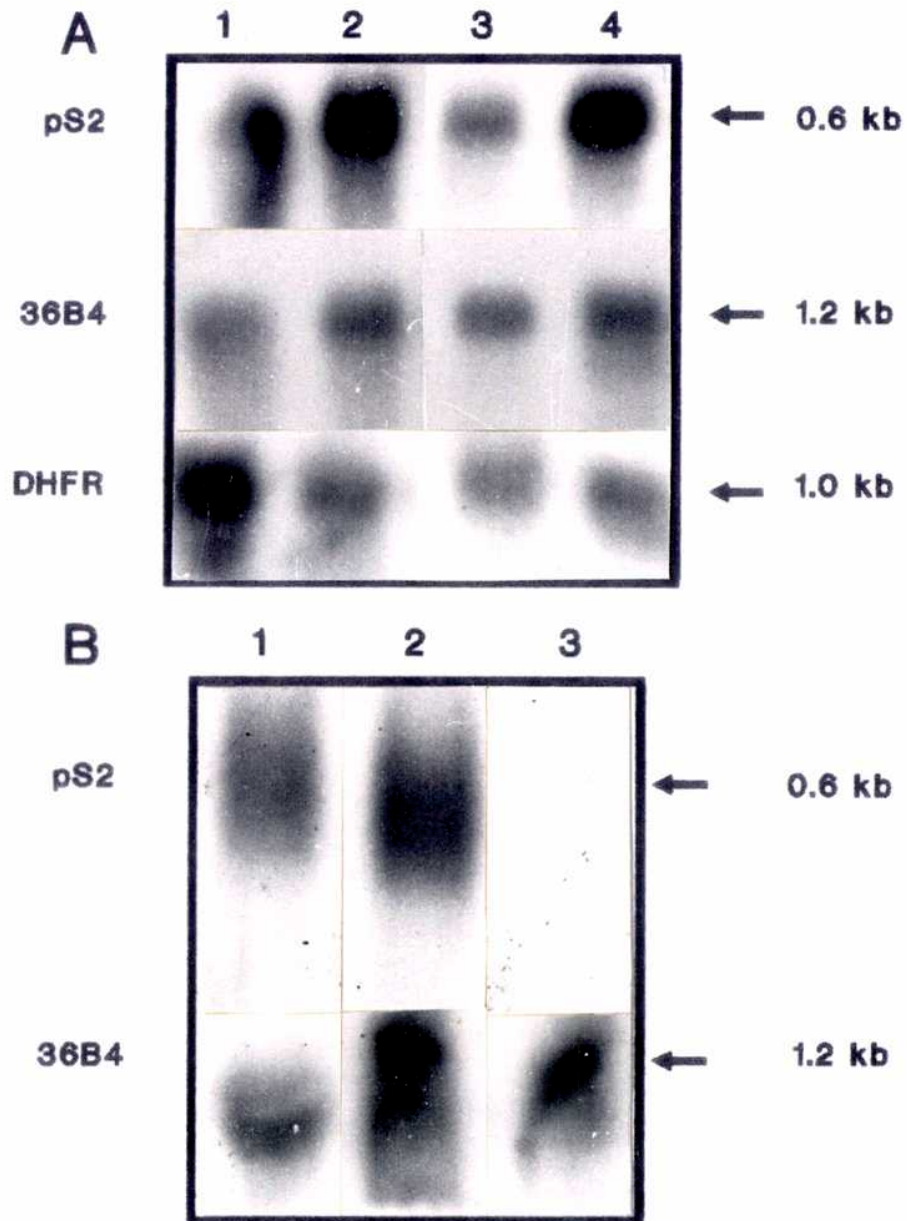
Figura r.11: Expresion de *RE* y de *Ha-ras* en medio ID



11.A: Analisis por dot blot del ARNm del RE. Se analizo ARN purificado a partir de celulas MCF-7 cultivadas en medio con suero (medio FBS) o en medio definido (medio ID) con o sin rojo de fenol (RF) por 28 dias. 1: medio ID; 2: medio FBS; 3: medio ID+RF; 4: medio FBS+RF.

11.B: Analisis del ARNm del Ha-ras. Se analizaron 20 ug de ARN total a partir de celulas MCF-7 cultivadas en medio FBS o en medio ID por 28 dias. 1: Medio FBS; 2: medio ID.

Figura r.12: Expresión de *pS2* y *DHFR* en medio ID



Se analizaron 20 ug de ARN purificados a partir de células MOF-7 cultivadas en medio ID por 28 días en presencia o ausencia de rojo de fenol (Figura 12A) y luego tratadas por 3 días con 1nM de estradiol (E2) o 1uM de Tamoxifeno (Tam) (Figura 12B).

12.A: 1: medio FBS + RF; 2: medio ID + RF; 3: medio FBS; 4: medio ID.

12.B: 1: medio ID; 2: medio ID + 1nM E2; 3: medio ID + 1uM Tam.

-Figura r.12A, carriles 3 y 4-.

También medimos el nivel del ARNm de la DHFR en células creciendo en medio ID y en medio FBS, y observamos una banda de 1.3 kb en ambos casos tanto en presencia como en ausencia de rojo de fenol -Figura r.12A, carriles 1, 2 y 3, 4 respectivamente-.

Los resultados indican que el mecanismo alternativo que estas células usan para crecer en ausencia de E₂ y otros factores de crecimiento presentes en el suero es capaz de producir ARNm de la DHFR, una enzima clave en la biosíntesis de nucleótidos, y pS2, de función desconocida hasta el presente.

III.B.2.- Efecto del E₂ y del tamoxifeno en la expresión de pS2 en medio ID.

Para investigar con más detalle la expresión de pS2, se mantuvieron las células por 28 días en medio ID y luego se transfirieron por tres días a medio ID conteniendo 1 nM E₂ o 1 μ M tamoxifeno. El E₂ no alteró sustancialmente la expresión de pS2, como lo muestra la Figura r.12B, tomando en cuenta que más ARN fue sembrado en el carril del E₂, como muestra la mayor intensidad de la banda del ARNm de 36B4 en dicho carril -Figura r.12B, segundo carril-, en contraste con su supresión cuando las células fueron tratadas con Tamoxifeno que se une al RE libre -Figura r.12B, tercer carril-.

Podemos concluir que el RE podría estar actuando como un inductor activo sin necesidad de unirse al E₂.

III.B.3.- Secreción de la proteína 52K en medio ID

Para analizar si esta hipótesis podría constituir un mecanismo de inducción general, medimos el nivel de 52K (234), otra proteína normalmente regulada por el complejo RE-Ez (238). Fue analizada su secreción al medio de cultivo en 24 horas.

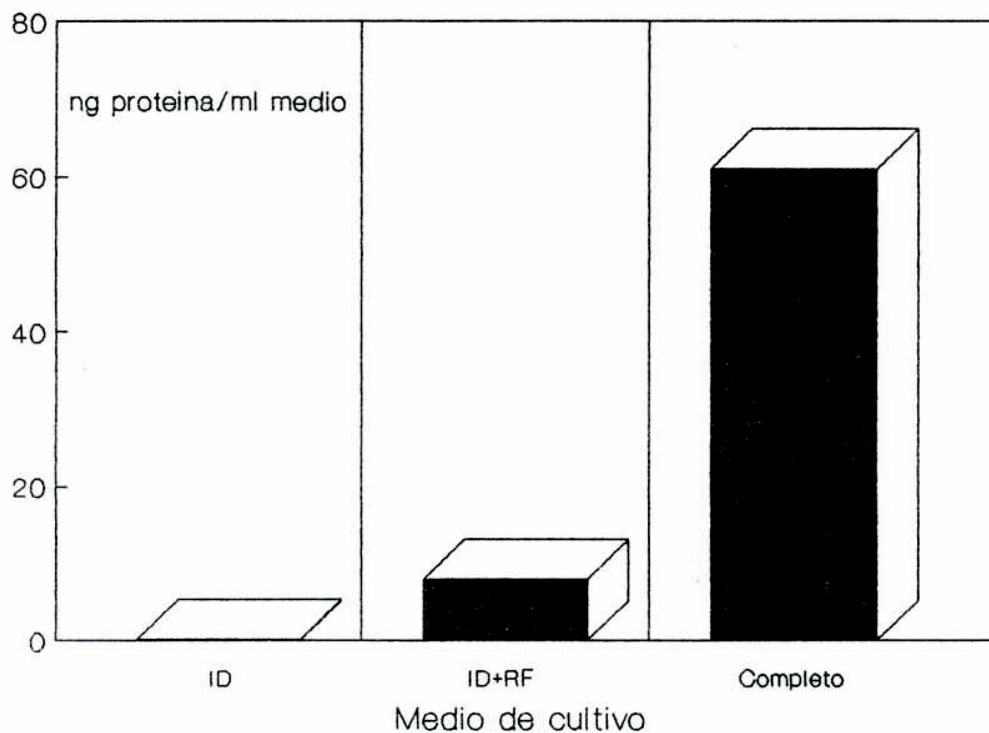
Observamos que cuando las células crecieron en medio ID con rojo de fenol por un mes produjeron 8.5 ng de proteína/ml de medio; pero cuando este indicador de pH fue eliminado, la proteína 52K estuvo ausente. Luego de 24 horas de tratamiento con 10% FBS el nivel de dicha proteína alcanzó a 60.5 ng/ml -Figura r.13 y Tabla 9-.

Es interesante notar que aunque ha sido reportado que la insulina puede estimular la secreción de la proteína 52K (288), este fenómeno no se observó en medio ID.

III.B.4.- Expresión de Ha-ras en medio ID

Los genes *ras* están involucrados en las señales de transducción de una variedad de receptores y de otras moléculas asociadas a membrana (286), y se sabe que la pS2 contiene secuencias respondedoras a la oncoproteína Ha-ras (288). Nosotros razonamos que el Ha-ras podía estar reemplazando al Ez en la inducción de la proliferación celular y la expresión de pS2, y analizamos la presencia de su ARNm. Observamos una banda de 5.0 kb y otra banda de 2.0 kb de menor intensidad como se describió anteriormente (289). Se halló un alto nivel de expresión las células MCF-7 creciendo en medio I. Sin embargo, debe observarse que dicho nivel fue igualmente elevado para las células crecidas en medio FBS -Figura r.11B-.

Figura r.13: Secrecion de proteina 52K por MCF-7 en distintos medios de cultivo



Las células MCF-7 fueron cultivadas por 28 días en medio ID con o sin rojo de fenol (*ID+RF* e *ID* respectivamente) y luego transferidas al medio FBS con rojo de fenol por un día (*Completo*). Los niveles de 52K medidos en cada caso se grafican en ordenadas y se expresan en ng de proteína 52K/ml de medio.

**Tabla r.9: Secrecion de proteina 52K por
celulas MCF-7 cultivadas en medio ID**

Medio de cultivo	ng proteina/ml medio
ID	0+/-0.5
ID+RF	8+/-1
FBS+RF	61+/-2

Las células MCF-7 fueron cultivadas por 28 días en medio ID con o sin rojo de fenol ("ID+RF" e "ID" respectivamente) y luego transferidas por 24 horas a medio FBS con rojo de fenol (FBS+RF). Se midió la cantidad de proteína 52K secretada al medio de cultivo en 24 horas en cada caso. Los valores tabulados son el promedio obtenido de dos experimentos realizados por duplicado y se expresan con su desviación standard.

Los que eran patos en el mundo del científico antes de la revolución, son después conejos...

Thomas Khun

Discussion

"Ahora asomamos la cabeza a un paisaje de brumas: titilante, infinitamente sutil y novedoso. En este paisaje vemos a los científicos saltando de paradigma en paradigma como conejos en un espectáculo de magia. A medida que se desarrolla un paradigma, parece generar -no sólo descubrir- anomalías que lo destruyen, conduciendo a otros. Así, a través de la bruma, vislumbramos la extraña posibilidad de que la mutabilidad de las leyes de la naturaleza pueda relacionarse de alguna manera con la actividad de la mirada de los científicos. El observador y lo observado parecen influirse mutuamente, el científico como un remolino tratando de entender el flujo del agua..."

Jhon P. Briggs y F. David Peat

"A través del maravilloso espejo del universo"

I.- Estudio de oncogenes en el cancer de mama

La célula normal posee múltiples mecanismos independientes que regulan su crecimiento y potencial de diferenciación, y son necesarios varios eventos separados para superar dichos controles e inducir el fenotipo transformado.

Los oncogenes se hallan estrechamente relacionados con estos mecanismos de control, y su activación conduce a alteraciones del comportamiento celular que pueden llegar a transformar una célula normal en cancerosa.

Evidencias de la cooperación entre oncogenes en la transformación neoplásica de cultivos primarios por tratamiento secuencial con los oncogenes **myc** y **ras** (28), indican que existen por lo menos dos pasos en la oncogénesis. Se ha demostrado en estudios con ratones transgénicos que estos oncogenes pueden cooperar entre sí (290), y que se requiere de dos o quizás múltiples eventos para desarrollar un tumor.

Es obviamente imposible probar en forma retrospectiva que un cambio genético particular fue causal en un tumor dado y no un evento casual. Sin embargo, estadísticamente, pueden asociarse determinadas alteraciones de oncogenes con tumores específicos, lo que lleva a pensar que tales cambios juegan un rol cardinal en la oncogénesis.

Una línea de evidencia que involucra alteración oncogénica es la asociación de su amplificación con la progresión tumoral, como fue descubierta inicialmente en neuroblastomas (109).

Por todas estas razones investigamos si los oncogenes **myc** y los pertenecientes a la familia **ras** presentaban alteraciones en los tumores primarios de mama, que indicaran que se hallaban involucrados en el origen o en el crecimiento tumoral. Los resultados muestran que no presentan cambios de estructura de importancia y que la amplificación de estos oncogenes es un fenómeno que ocurre en baja magnitud y con cierta frecuencia en el cáncer de mama: 18% para el **myc**; este fenómeno había sido descrito previamente (291, 292), 8% para **N-ras**, 8% para **Ha-ras**, y con más frecuencia (29%) el **Ki-ras**, pero se analizaron pocos casos para este oncogen como para obtener conclusiones

definitivas. En la muestra #X, que consiste en células tumorales purificadas a partir de un tumor primario de mama se halló amplificación para 2 oncogenes simultáneamente (N-ras y Ha-ras), lo que puede ser un hecho fortuito o deberse al aumento de sensibilidad en la cuantificación logrado al eliminar las células normales presentes en los tumores sólidos.

En 1987, se descubrió que el oncogen *neu* se encontraba amplificado en los tumores primarios de mama con relativa frecuencia, y se postuló su utilidad como marcador genético de un subgrupo de tumores mamarios (116).

La amplificación genómica del protooncogen *neu* -de 10% a 46% según los diferentes trabajos- y su sobreexpresión han sido estadísticamente correlacionadas con presencias de ganglios linfáticos metastatizados (293-298), ausencia de receptores hormonales (296-300), alto grado nuclear (295, 297, 301), tumores de gran tamaño (302), estadio clínico avanzado (294), mal pronóstico y evidencias de recurrencia y/o corta sobrevida (293, 297, 300, 303-305). Sin embargo, al mismo tiempo, la presencia de un elevado número de copias de este oncogen en el ADN tumoral ha sido juzgada por otros autores como de escasa significación en el pronóstico (306-312).

Nosotros realizamos el análisis del oncogen *neu* en un grupo de tumores mamarios, hallando que un 36% presenta una amplificación de 3 o más copias, y que dicha amplificación se encuentra presente en los estadios más avanzados de la enfermedad, pues todos los tumores que presentaron amplificación fueron grado III o IV. Estos resultados se encuentran en concordancia con el hecho conocido de su correlación con un estadio clínico avanzado (293) y con la presencia de ganglios linfáticos positivos (116).

Nuestro análisis de oncogenes se dirigió a detectar rearrreglos de cierta magnitud y amplificaciones génicas. No puede descartarse que otras alteraciones, tales como mutaciones puntuales, se hallen presentes en los tumores mamarios estudiados. Por ejemplo, se ha detectado la forma activada del oncogen **Ha-ras** en los tumores mamarios de rata inducidos por el carcinógeno nitrosometilurea (NMU) (313). Una forma activada del oncogen **N-ras** se halla presente en la línea celular HL60 (270), hecho que pasa inadvertido en nuestro análisis. Sin embargo, esto no quita legitimidad a la búsqueda de su amplificación como mecanismo de activación. Por ejemplo el oncogen **neu** se activa por mutación en los tumores de origen neuroectodérmico inducidos por el mismo agente alquilante (NMU) en ratas (314), mientras que en tumores primarios de mama es la amplificación de dicho oncogen la que se correlaciona con diversos indicadores de agresividad tumoral, como se indicó anteriormente.

Dos grupos de investigación (297, 306) han observado que el protooncogen **c-erbA**, miembro de la familia de receptores hormonales tiroideos (315, 316) se halla con frecuencia coamplificado con el **neu** en carcinomas mamarios, hecho probable debido a que se localizan ambos en el cromosoma 17 (17q21-22), y pueden quedar en la misma unidad de amplificación (317). Sin embargo la amplificación del **c-erbA** no va acompañada de un incremento en el nivel de su ARNm (306), lo que indicaría que se trata de un evento fortuito, debido a su proximidad con el protooncogen **neu**.

Otros protooncogenes cuya amplificación ha sido asociada polémicamente a parámetros clínico-patológicos aceptados son el **myc**, e **int-2** y **hst-1**, dos genes inductores de angiogénesis, similares al factor de crecimiento de fibroblastos, localizados cercanos en el cromosoma 11 (11q13) (318-320), que se hallan involucrados en la

inducción de tumores mamarios murinos por el virus MMTV (321, 322). La frecuencia de amplificación observada para el *myc* varía entre 4% y 56% (291, 293, 296, 297, 303, 309-311, 323, 324), para el *int-2* entre 4% y 18% (297, 310, 211, 323, 325-328) y para el *hst-1* entre el 12% y el 18% (297, 323, 327, 328). La amplificación de estos tres oncogenes ha sido asociada a ganglios positivos (296, 311, 323), y mal pronóstico (297, 303). Además la amplificación del *myc* ha sido correlacionada con negatividad para receptores hormonales (323), alto grado tumoral (323), y mayor edad de la paciente (4); en contraste, la amplificación *int-2/hst-1* se asoció a la presencia de receptores hormonales (323), bajo grado tumoral (323), y pacientes más jóvenes (297, 311), sugiriendo que alteraciones en la integridad estructural y expresión de ciertos loci pueden servir para delinear diferentes subgrupos de carcinomas mamarios. Sin embargo, estas correlaciones no han sido observadas por otros grupos de investigación (293, 310, 324, 327).

Finalmente algunos trabajos indican que pueden encontrarse genes supresores inactivados en los carcinomas mamarios, pues se ha hallado pérdida alélica en el brazo largo de los cromosomas 13 y 16 (329), y en el brazo corto del cromosoma 17, (329, 330) donde se localiza el gen supresor p53 (331). Sin embargo, otros autores no han podido detectar disminución del número de copias de dicho gen en tumores primarios de mama (332).

Las diferencias en los resultados obtenidos por los diversos autores pueden deberse a que se hayan analizado grupos pequeños de pacientes, al conocimiento incompleto de su estadio clínico y evolución, a técnicas analíticas inadecuadas, etc. Además, considerando que la etiología del cáncer mamario es heterogénea, e involucra presumiblemente interacciones de factores ambientales y genéticos (333, 334), es necesario tener en cuenta la diversidad geográfica y de "background" genético de los grupos estudiados.

II.- Estudio genico de los receptores hormonales en el cancer de mama

La expresión en el tejido mamario de los genes que codifican para los receptores hormonales de estradiol y progesterona (RE y RPg respectivamente) no está claramente comprendida, ya sea en condiciones normales o patológicas. Mientras que en el tejido mamario adulto normal se encuentran pocas células positivas para dichos receptores, más del 60% de los tumores de mama presentan cantidades significativas de RE (198) y gran parte de ellos posee PgR (204). Esto indica que el aumento de expresión de los receptores hormonales podría estar involucrado en la génesis o el mantenimiento del crecimiento tumoral. De hecho, alrededor del 60% de los tumores ER positivos responden efectivamente a una terapia con antiestrógenos comparado con un 5% de respuesta en los ER negativos (335), lo que muestra una correlación entre la expresión de RE y la proliferación del tumor inducida por estrógenos in vivo.

A priori, pueden considerarse varias posibilidades que expliquen la expresión incrementada de los receptores hormonales de estradiol y progesterona en la células de cáncer de mama respecto de las células normales: a) alteración del gen -como un dosaje incrementado, o un cambio en el patrón de metilación-; b) una actividad transcripcional aumentada de ese gen c) modificaciones a niveles traduccional o post traduccional. Con la intención

de analizar si la primera de estas opciones regía la velocidad de transcripción de los ARNm de los receptores de estradiol y progesterona en las células tumorales de cáncer de mama, analizamos, mediante la técnica de Southern (252), ADNs purificados a partir de muestras provenientes de diferentes pacientes.

II.A.- Análisis del gen RE

Estudiamos el número de copias del gen RE presente en una serie de tumores mamarios con diferente grado de expresión del receptor. Los resultados que hemos obtenido sugieren fuertemente que un aumento en el número de copias puede jugar un rol en el incremento en la cantidad de proteína RE encontrada en los tumores RE-positivos. Esta aseveración se basa en el hecho de que en el 43% de los tumores RE-positivos analizados fue hallado un cierto grado de amplificación en oposición al nivel normal presente en todos los tumores RE-negativos estudiados (336).

Aunque el nivel de amplificación detectado fue relativamente bajo (1.6 a 3.0 veces), debe considerarse que este es un valor mínimo, puesto que existe una contribución significativa de fibroblastos normales y células linfocíticas en los tejidos de cáncer de mama (292). Sin embargo, la posibilidad de que el dosaje aumentado del gen RE se deba a una duplicación parcial o total del cromosoma 6 no puede ser excluida.

Es interesante notar que en los tumores en los que se detectó amplificación hubo divergencias en la determinación de RE con los dos métodos utilizados, el bioquímico, que detecta las moléculas de RE que se extraen a baja concentración salina (REc) y por inmunohistoquímica, que detecta la totalidad de las moléculas en cortes de tejido (REn) -en las pacientes analizadas que poseen una sola copia de RE los datos de REn son coincidentes con los obtenidos para REc-. Esta divergencia podría ser explicada asumiendo la existencia de moléculas de RE fuertemente unidas a la cromatina- no dosadas a baja concentración salina-, ya sea por estar ocupadas por hormona endógena -en el caso de la paciente premenopáusica- o debido a una alteración en la molécula de RE que le otorgue mayor fuerza a la unión aún en ausencia de hormona.

Analizando los resultados presentes en la Tabla r.3, no se halla correlación entre el grado de amplificación detectado y la cantidad de REc dosado. Sin embargo, considerando válidos los valores de REn medidos -Tabla r.5-, puede notarse que todos los tumores que presentan amplificación poseen cantidades altas de RE, indicando que este podría ser el mecanismo utilizado por ciertas células para aumentar su expresión de RE. Esto no excluye que existan otras vías de regulación; de hecho, varios de los tumores analizados que presentan un alto nivel de expresión no poseen amplificación génica.

Como se ha observado que en tumores humanos se encuentran presentes alteraciones en la metilación del ADN (281) y que éste es uno de los mecanismos que utiliza la célula eucariota para regular la transcripción de ciertos genes (282), quisimos averiguar si la metilación de los residuos C jugaba algún rol en el control de expresión del RE. Para ello analizamos el patrón de metilación del gen RE en una línea celular de alta expresión, MCF-7 (222) y en otra que no expresa el receptor, MDA (227), en Southern

blot. Observamos que, aunque aparecen diferencias en el patrón de restricción entre las enzimas HpaII y MspI en cada línea celular, señalando la existencia de secuencias CCGG metiladas, no parece haber diferencia en las bandas para HpaII entre ambas líneas celulares, lo que indicaría que la metilación del gen no está involucrada de manera evidente en la regulación de la expresión génica del receptor de estradiol.

Un trabajo reciente realizado con tumores primarios mamarios confirma esta falta de correlación entre el nivel de metilación y el de expresión del RE e indica que el gen RE contiene sitios de metilación variables, que podría estar indicando solamente la naturaleza heterogénea del tejido tumoral (337).

Además se hallaron diferencias en el patrón de metilación presente en el tejido tumoral respecto del tejido normal adyacente (337), lo que sugiere que existe una modulación de la metilación durante el proceso neoplásico mamario.

Existen múltiples evidencias que indican que el mecanismo de regulación de la expresión del RE en cáncer de mama es complejo. Por un lado, el RNAm transcripto necesario para codificar una proteína del tamaño del RE (PM 65 kD) es de 2 kb de longitud. Sin embargo el tamaño de los ARNm encontrados en diversos tejido tanto humanos como de otras especies es mucho mayor -en MCF-7 es de 6.5 kb (155), en útero de 4.2 kb (338)- y contiene secuencias 3' y 5' no traducidas, cuya función se desconoce.

Nuestro análisis génico indica que el tamaño del gen RE es mucho mayor que el de su producto de transcripción, pues la suma de los fragmentos de restricción es de aproximadamente 40 kb, indicando la presencia de numerosos intrones. El estudio del gen RE humano completo fue realizado recientemente (339) y muestra un tamaño de mínimo

de 140 kb, y que cada dominio funcional está codificado en un exón separado.

Por otra parte, se ha hallado que existen diferencias en la estabilidad del RE entre los tumores RE-positivos (340), indicando posibles diferencias en la molécula de RE o en los mecanismos celulares de procesamiento.

Además, recientemente, se han detectado varias especies de ARNm en tumores de mama humanos, sugiriendo mecanismos adicionales en la variación del contenido de RE (341, 342).

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos al realizar el análisis del RE a nivel proteico, identificando moléculas con capacidad de unirse a un derivado radioactivo del tamoxifeno. Investigaciones de este tipo llevadas a cabo en útero mostraron un componente mayor, de 65 KD, y otros de menor peso molecular de 54 kD y 37 kD, que pueden representar productos de degradación proteolítica del primero, aunque la posibilidad de que se trate de moléculas diferentes no puede ser excluida (343). En relación con estos experimentos, se ha hallado en tumores mamarios una proteasa con actividad de quimiotripsina que incrementa la afinidad del receptor RE por el ADN (344). Puede postularse que este clivaje separe dominios funcionales del RE. Además, se ha encontrado que en útero de ternero el RE se encuentra sometido a un mecanismo de fosforilación por acción de una quinasa nuclear y una fosfatasa citosólica (345), y se ha informado que el RE mismo posee actividad proteolítica, responsable de su activación (346).

Es notable que no hayamos encontrado cambios en el patrón de restricción del gen RE para la enzima Eco R1 en ninguno de los tumores analizados. Otros autores obtuvieron los mismos resultados con otras enzimas como BamH I, Hind III, Sst I y Pst I, y con Pvu II, PstI y Bbv I se encontraron dos alelos polimórficos (347, 348). Estos resultados sostienen la idea de que no hay rearrreglos o

deleciones cromosómicas extensos en el gen **RE**, aún en los tumores **RE**-negativos, donde la incidencia de cambios cromosómicos es muy grande (349-351).

El estudio que realizamos fue llevado a cabo utilizando biopsias recogidas en quirófano recientemente. Por lo tanto, carecemos del conocimiento de la futura evolución de las pacientes. Por otra parte, como se discutió anteriormente, la amplificación del oncogen **neu** ha sido asociada a estadios avanzados de la enfermedad y a mal pronóstico para las pacientes (117).

Analizamos un grupo de tumores respecto del contenido del oncogen **neu** y del gen **RE** simultáneamente, y el resultado mostró que en todos los tumores **RE**-positivos que presentaron amplificación para **RE** había más de una copia del oncogen **neu**. El grupo analizado es pequeño como para extraer conclusiones definitivas, pero estaría mostrando la coamplificación de ambos genes, a pesar de su diversa localización cromosómica, ya que el gen **RE** se encuentra en el cromosoma 6 (155) y el **neu** en el 17 (352).

II.B.- Análisis del gen RPg

Con la intención de estudiar la estructura del gen del RPg analizamos ADNs provenientes de diferentes fuentes: placenta, líneas celulares de cáncer de mama con diversos niveles de expresión de RE y RPg, tejidos de útero -otro órgano blanco de las hormonas esteroideas- como endometrio, miometrio y una patología uterina benigna, un fibroma. En todos los casos se encontró una sola copia del gen y una estructura general común.

Posteriormente analizamos una serie de tumores mamarios para observar si aparecía alguna alteración génica que pudiera asociarse a una alta expresión o a ausencia de la misma. Sin embargo, en todos los casos analizados se observó una sola copia de estructura general conservada, con una excepción: en un tumor encontramos un fragmento génico adicional para las enzimas Eco RI y Hind III.

Descartamos que se tratara de un polimorfismo nuevo, tal vez presente en esta región geográfica y probablemente ausente en E.E.U.U. y Europa -ya que no había sido informado hasta el presente- pues esta alteración fue característica de las células tumorales, y se encontró ausente en ADN extraído de linfocitos circulantes de la misma paciente.

La estructura del gen del RPg es compleja. El marco de lectura correspondiente a la forma más grande del receptor contiene 2799 nucleótidos, que codifican para 933

aminoácidos. El gen es de mayor tamaño; nuestros resultados indican que contiene por lo menos 11,2 kb -lo que corresponde a la suma de los fragmentos de restricción obtenidos para Hind III- y su análisis en pollo reveló un gen completo de 38 kb, con ocho exones (353).

Estudios llevados a cabo con ADNs de linfocitos de individuos normales revelaron la existencia de un polimorfismo para la banda de menor peso molecular para la enzima Hind III (354): un 79% presentó un fragmento de 2.8 kb y un 21% de 2.5 kb, pero se desconoce si posee alguna significación. La paciente que presentó la alteración génica pertenece al primer grupo.

El origen de la banda adicional detectada no fue determinado con precisión, sólo podemos asegurar que contiene secuencias codificantes de la proteína, pues la sonda usada corresponde al ADNc del RPg. El hecho de que las bandas que aparecen normalmente también estén presentes puede ser indicio de que la alteración génica - translocación, duplicación de un fragmento de ADN, etc.- involucra a uno solo de los alelos del gen del RPg. La disminución de intensidad de las bandas comunes parece confirmar esta hipótesis, pues reflejaría la pérdida de uno de los dos alelos normales.

Cabe destacar que este tumor presentó diversas alteraciones en genes localizados en diferentes cromosomas. El gen **RE**, ubicado en el cromosoma 6 (155), presentó 1.6 copias. El oncogen **neu**, en el cromosoma 17 (352), se halló presente con una amplificación de 9 veces respecto de placenta. Finalmente, el gen del RPg, que se encuentra en el cromosoma 11 (178), posee un fragmento adicional.

Es interesante notar que este tumor en una paciente con un grado de avance de la enfermedad correspondiente al

estadio III, es particularmente agresivo, con una alta velocidad de crecimiento y resistente a tratamientos posteriores por quimioterapia.

El tumor es positivo para ambos receptores hormonales, pero a bajo nivel, aunque es necesario tener en cuenta que se trata de una paciente premenopáusica (35 años de edad), y que el dosaje realizado comprende sólo los receptores libres, por lo que seguramente han sido subestimados, debido a la existencia de hormona endógena ocupando moléculas de receptores.

Podemos concluir que las alteraciones genómicas del RPg no son eventos frecuentes pero pueden jugar un rol en la expresión de este receptor, así como de sus características fenotípicas en algunos tumores mamarios.

III.- Estudio de la regulación hormonal del crecimiento celular y la expresión genica en cancer de mama

Aunque el estudio de biopsias de tumores mamarios humanos brinda la posibilidad de analizar y describir alteraciones presentes en las células cancerosas, ya sea a nivel de ácidos nucleicos o proteínas de oncogenes, receptores hormonales, etc., la limitada manipulación que puede realizarse impide llevar a cabo experimentos para estudiar la regulación de la expresión génica por las hormonas esteroideas.

Este tipo de estudio reviste gran importancia, pues la falta de éxito de tratamientos contra cáncer de mama con antihormonas se debe a que las células adquieren la capacidad de multiplicarse independientemente de la acción hormonal. Por lo tanto, estudiar los mecanismos de inducción y la aparición de hormonoindependencia en las células tumorales puede colaborar en el diseño de terapias más efectivas.

Con esta orientación, hemos realizado experimentos *in vitro*, utilizando líneas celulares establecidas en cultivo en forma permanente, a partir de células provenientes una efusión pleural metastásica de tumor mamario (MCF-7 (223)).

Aunque rutinariamente se suplementa el medio de cultivo de estas líneas celulares con un porcentaje de suero fetal, para realizar el estudio de la regulación hormonal es

necesario diseñar un medio libre de suero, ya que contiene concentraciones fisiológicas de hormonas y otros factores de crecimiento (355).

Una de estas líneas celulares, MCF-7 (223), ha sido crecida en un medio químicamente definido (medio ID), donde experimentó ciertas modificaciones respecto de su crecimiento en medio suplementado con suero: las células necesitaron insulina como único factor de crecimiento, y a alta densidad no fueron estimuladas por EGF, trombina o FBS (222). El análisis ultraestructural reveló que estas células crecidas en medio ID poseen un complejo de Golgi bien desarrollado con sáculos distendidos, "coated pits" y vesículas en la membrana plasmática, indicando una probable actividad secretora (285). Esto puede indicar que las células están sintetizando y secretando factores de crecimiento autócrinos que reemplazan a los presentes en el suero (E₂, EGF, PDGF, trombina, etc.). En estas condiciones, es probable que proteínas normalmente reguladas hormonalmente comiencen a estarlo por caminos alternativos.

Nosotros hemos demostrado que luego de un período de cultivo en el medio ID el crecimiento celular no es estimulado por E₂. Curiosamente, los niveles de RE son mayores en estas células cuando crecen en medio ID que en presencia de suero. Observaciones similares fueron realizadas por otros investigadores, cuando la células MCF-7 fueron crecidas por un período de tiempo largo en presencia de suero charcolizado -deprivado de esteroides- (356). Nuestros resultados mostraron que ni el estradiol ni el tamoxifeno alteran la velocidad de crecimiento celular en las mismas condiciones.

En contraposición a estos resultados, cuando las células fueron transferidas a medio ID por sólo 3 días se observó el

comportamiento esperado: el E₂ induce el crecimiento celular y el tamoxifeno lo inhibe. El efecto inhibitor de este antagonista en ausencia de hormona ha sido descrito previamente (357).

Por otra parte, la expresión de pS2, proteína normalmente inducida por el E₂, se encuentra aumentada en medio ID y fue suprimida por este antagonista, que se une a la moléculas de RE libres presentes en medio ID, y no fue alterado por el agregado de hormona.

Aunque se sabe que es necesaria la formación del complejo hormona-receptor para lograr la unión a secuencias de ADN específicas e inducir la expresión de ciertos genes (358), podemos especular que alguna alteración en el RE haya hecho posible que éste actúe per se, en la producción de pS2. Sin embargo, es interesante notar que realizamos el análisis del gen RE presente en las células MCF-7 en medio ID no hallando alteraciones en su estructura -resultado no mostrado-. Además, otra proteína normalmente inducida por E₂, la 52K, fue muy pobremente secretada al medio ID conteniendo rojo de fenol y estuvo ausente en el medio ID libre del indicador de pH. En contraste con reportes previos (359), la insulina no fue capaz de inducir la secreción de 52K, probablemente porque algún otro componente del suero es necesario para producir dicha inducción (360). Además continuó siendo inducible por suero, pues al pasar las células por 24 horas a un medio suplementado con 10% de FBS su expresión se incrementó 8 veces. EL mRNA de la enzima DHFR se encontró presente en medio ID en cantidades comparables a las expresadas por las MCF-7 en medio FBS. Es interesante notar que existen reportes previos que indican que el estradiol presente en el suero es un inductor de dicha expresión (361).

Se ha demostrado que la transfección de células MCF-7 con el oncogen **Ha-ras** provoca la pérdida de dependencia de E2 del crecimiento celular (362) y que el patrón de proteínas de secreción es análogo (363). Como se cree que este oncogen actúa en la transmisión de señales transcripcionales y de crecimiento (286), decidimos analizar la expresión del **Ha-ras** en las células crecidas en medio ID. Hallamos niveles elevados de los ARNms del **Ha-ras**, similares a los presentes en medio con suero.

Se cree que la expresión de la proteína **ras** se halla regulada por EGF (364). Teniendo en cuenta que dicho factor está presente en el suero y ausente en medio ID, la alta expresión del oncogen hallada en ambas condiciones de crecimiento celular indicaría que las células utilizan algún camino alternativo para su inducción en el medio definido.

Es posible que el **Ha-ras** actúe mediando la inducción de la expresión de pS2, pues es sabido que este gen posee secuencias regulatorias que responden a la oncoproteína p21 (288), y que en algunos casos una alta expresión de una protooncoproteína puede actuar como mecanismo de activación (289).

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que las transformaciones fenotípicas observadas en la línea celular MCF-7 cuando es crecida en un medio definido con insulina como único factor de crecimiento están acompañadas de alteraciones a nivel de la regulación hormonal por E2 y que parecen existir más de un camino de acción para la acción del RE como transactivador génico, porque en medio ID una vía sufre un "bypass" y algunas proteínas (pS2, DHFR) se vuelven independientes de la presencia de E2, mientras que otras (52K) continúan siendo reguladas por la hormona.

Es posible que algunos tumores tratados con terapia antihormonal que se vuelven resistentes luego de un periodo

de respuesta utilicen un mecanismo de adaptación similar al observado en las células cultivadas en ausencia de E₂. Probablemente otros factores autócrinos actúen en la transmisión de señales transcripcionales y de crecimiento.

Nosotros mostramos aquí fuertes evidencias que confirman la existencia de un mecanismo de regulación hormonal complejo y que las células mamarias de carcinoma humano son capaces de adaptarse rápidamente a crecer en ausencia de factores de crecimiento exógenos.

"Yo no tengo una personalidad; yo soy un cocktail, un conglomerado, una manifestación de personalidades.

En mí, la personalidad es una especie de forunculosis anímica en estado crónico de erupción; no pasa medio hora sin que me nazca una nueva personalidad.

Desde que estoy conmigo mismo, es tal la aglomeración de las que me rodean, que mi casa parece le consultorio de una quiromántica de moda. Hay personalidades en todas partes: en el vestíbulo, en el corredor, en la cocina, hasta en el W.C.

¡Imposible lograr un momento de tregua, de descanso!
¡Imposible saber cuál es la verdadera!

Aunque me veo forzado a convivir en la promiscuidad más absoluta con todas ellas, no me convenzo de que me pertenezcan.

¿Qué clase de contacto pueden tener conmigo -me pregunto- todas estas personalidades inconfesable, que harían ruborizar a un carnicero? ¿Habré de permitir que se me identifique, por ejemplo, con ese pederastro marchito que no tuvo ni el coraje de realizarse, o con este cretinoide cuya sonrisa es capaz de congelar una locomotora?

El hecho de que se hospeden en mi cuerpo es suficiente, sin embargo, para enfermarme de indignación. Ya que no puedo ignorar su existencia, quisiera obligarlas a que se oculten en los repliegues más profundos de mi cerebro. Pero son de una petulancia... de un egoísmo... de una falta de tacto...

Hasta las personalidades más insignificantes se dan unos aires de transatlántico. Todas, sin ninguna clase de excepción, se consideran con derecho a manifestar un desprecio olímpico por las otras, y naturalmente, hay peleas, conflictos de toda especie, discusiones que no terminan nunca. En vez de contemporizar, ya que tienen que vivir juntas, ¡pues no señor!, cada una pretende imponer su voluntad, sin tomar en cuenta las opiniones y los gustos de las demás. Si alguna tiene una ocurrencia, que me hace reír a carcajadas, en el acto sale cualquier otra, proponiéndome un paseito al cementerio. Ni bien aquella desea que me acueste con todas las mujeres de la ciudad, ésta se empeña en demostrarme las ventajas de la abstinencia, y mientras una abusa de la noche y no me deja dormir hasta la madrugada, la otra me despierta con el amanecer y exige que me levante junto con las gallinas.

Mi vida resulta así una preñez de posibilidades que no se realizan nunca, una explosión de fuerzas encontradas que se entrechocan y destruyen mutuamente. El hecho de tomar la menor determinación me cuesta un tal cúmulo de dificultades, antes de cometer el acto más insignificante necesito poner tantas personalidades de acuerdo, que prefiero renunciar a cualquier cosa y esperar que se extenúen discutiendo lo que han de hacer con mi persona, para tener, al menos, la satisfacción de mandarlas todas juntas a la mierda."

Referencias

- 1.- Spandidos D.A. y Siminovitch L. (1978). *Cell* **13**, 651-656.
- 2.- Knudson A.G. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 820-828.
- 3.- Varmus H.E. (1982). *Cancer Surveys* **1**, 309-317.
- 4.- Hayward W.S., Neel G.B. y Astrin S.M. (1981). *Nature (London)* **290**, 475-480.
- 5.- Payne G.S., Bishop J.M. y Varmus H.E. (1982). *Nature (London)* **295**, 209-212.
- 6.- Cooper G.M. (1982). *Science (Washington DC)* **218**, 801-812.
- 7.- Weinberg R.A. (1981). *Biochem. Biophys. Acta* **651**, 25-29.
- 8.- Shih C., Padhy C., Murray M. y Weinberg R.A. (1981). *Nature* **290**, 261-265.
- 9.- Shih C., Shilo B.-Z., Goldfarb M.P., Perucho M. y Weinberg R.A. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 5714-5719.
- 10.- Cooper G.M. y Neiman P. (1980). *Nature (London)* **287**, 656-659.
- 11.- Krontiris T.G. y Cooper G.M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 1181-1187.
- 12.- Lane M.-A., Sainten A. y Cooper G.M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 5185-5189.
- 13.- Perucho M., Goldfarb M., Shimizu K., Lama C., Fogh J. y Wigler W. (1981). *Nature (London)* **27**, 467-470.
- 14.- DeFeo D., Gonda M.A., Young H., Chang E.H., Lowy D.R y Scholnick E.M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3328-3332.
- 15.- Ellis R.W., DeFeo D., Shih T.Y., Gonda M.A., Young H.A., Tsuchida N., Lowy D.R. y Scholnick E.M. (1981). *Nature (London)* **292**, 506-511.
- 16.- Shih T.Y., Weeks M.O., Young H.A. y Scholnick E.M. (1979). *J. Virol.* **31**, 546-556.

- 17.- Capon D.J., Seeburg P.H., McGrath J.P., Hayfick J.S., Edman U., Levinson A.L. y Goeddel D.V. (1983). *Nature* **304**, 507-511.
- 18.- Shih C. y Weinberg R.A. (1982). *Cell* **29**, 161-170.
- 19.- Shimizu K.M., Goldfarb M., Perucho M. y Wigler M. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 383-387.
- 20.- Reddy E.P., Reynolds R., Santos E. y Barbacid M. (1982). *Nature (London)* **300**, 149-153.
- 21.- Littlefield J.W. (1982). *Science (Washington DC)* **218**, 214-218.
- 22.- Scher C.D. y Siegler R. (1975). *Nature (London)* **253**, 729-735.
- 23.- Goubin G., Goldman D.S., Luce J., Neiman P.E. y Cooper G.M. (1983). *Nature (London)* **302**, 114-116.
- 24.- Hall A., Marshall C.J., Spurr N.K., y Weiss N.A. (1983). *Nature (London)* **303**, 396-399.
- 25.- Newbold R.F. y Overell R.W. (1983). *Nature (London)* **304**, 648-651.
- 26.- Cooper G.M., Okenquist S. y Silverman L. (1980). *Nature (London)* **284**, 418-423.
- 27.- Hayward W.S., Neel B.G. y Astrin S.M. (1981). *Nature (London)* **290**, 475-480.
- 28.- Land H., Parada L.F. y Weinberg R.A. (1983). *Nature (London)* **304**, 596-601.
- 29.- Compere S.J., Baldacci P. y Jaenisch R. (1988). *Biochem. Biophys. Acta* **948**, 129-149.
- 30.- Cory S.J. y Adams J.M. (1988). *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 25-48.
- 31.- Hannahan D. (1989). *Science (Washington DC)* **246**, 1265-1275.
- 32.- Sinn E., Muller W., Pattengale P., Tepler I., Wallace R. y Leder P. (1987). *Cell* **49**, 465-475.
- 33.- Waterfield M.D., Scrace G.T., Whittle N., Stroobant P., Johnsson A., Wasteson A., Westermark B., Heldin C.-H., Huang J.S. y Deuel T.F. (1983). *Nature (London)*. **304**, 35-40.

- 34.- Burgess W.H. y Maciag T. (1989). *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 575-606.
- 35.- Peters G., Kozak C. y Dickson C. (1984). *Mol. Cell. Biol.* **4**, 375-380.
- 36.- Doolittle R.F., Hunkapiller M.W. y Hood L.E. (1983). *Science (Washington DC)* **221**, 275-278.
- 37.- Vennstrom B. y Bishop J.M. (1982). *Cell* **28**, 135-139.
- 38.- Gill G.N., Bertics P.J. y Santon J.B. (1987). *Mol. Cell. Endocrinol.* **51**, 169-186.
- 39.- Downward J., Yarden Y., Mayes E., Scrace G., Totty N., Stockwel P., Ullrich A., Schlessinger J. y Waterfield M.D. (1984). *Nature (London)* **307**, 521-527.
- 40.- Frankel A.E., Gilbert J.H., Porzig K.T., Scolnick E.M. y Aaronson S.A. (1975). *J. Virol.* **30**, 821-824.
- 41.- Chabot B., Stephenson D.A., Chapman V.M., Besmer P. y Bernstein A. (1988). *Nature (London)* **335**, 88-89.
- 42.- Geissler E.N., Ryan M.A. y Housman D.E. (1988). *Cell* **55**, 185-192.
- 43.- Schechter A.L., Stern D.F., Vaidyanathan L., Decker S.J., Drebin J.A., Greene M., Weinberg R.A. (1984). *Nature (London)* **312**, 513-516.
- 44.- Hunter T. y Sefton B.M. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 1311-1315.
- 45.- Collet M.S, Purchio A.F. y Erikson R.L. (1980). *Nature (London)* **285**, 167-169.
- 46.- Levinson A.D., Oppermann H., Varmus H.E. y Bishop J.M. (1980). *J. Biol. Chem.* **225**, 11973-11980.
- 47.- Rudd C.E., Trevillyan J.M., Dasgupta J.D., Wong L.L. y Schlossman S.F. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 5190-5194.
- 48.- Witte O.N., Dasgupta A. y Baltimore D. (1980). *Nature (London)* **283**, 826-831.
- 49.- Ven W.J.M. v.d., Reynolds F.H., y Stephenson J.R. (1980). *Virology* **101**, 185-197.

- 50.- Barbacid M. y Lauver A.V. (1981). *J. Virol.* **40**, 812-821.
- 51.- Neil J.C., Ghysdael J. y Vogt P.K. (1981). *Virology* **109**, 223-228.
- 52.- Feldman R.A., Hanafusa T. y Hanafusa H. (1980). *Cell* **22**, 757-765.
- 53.- Pawson T., Guyden J., Kung T.-H., Radke K., Gilmore T. y Martin S.G. (1980). *Cell* **22**, 767-776.
- 54.- Naharro G., Dunn C.Y. y Robbins K. C. (1983). *Virology* **125**, 502-507.
- 55.- Kawai S., Yoshida M., Segawa K., Sugiyama H., Ishizaki R. y Toyoshima K. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6199-6203.
- 56.- Curran T. y Teich N.M. (1982). *J. Virol.* **42**, 114-118.
- 57.- Spurr N.K., Solomon E., Janson M., Sheer D., Goodfellow P.N., Bodmer W.S., y Vennstrom (1984). *EMBO J.* **3**, 159-162.
- 58.- Tabin C.J., Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg R.A., Papageorge A.G., Scolnick E.M., Dhar M., Lowy D.R. y Chang E.H. (1982). *Nature* **300**, 143-149.
- 59.- Taparowsky E., Suard Y., Fasano O., Shimisu K., Goldfarb M. y Wigler M. (1982). *Nature (London)* **300**, 762-765.
- 60.- Capon D.J., Chen E.Y., Levinson A.D., Seeburg P.H. y Goeddel D.V. (1983). *Nature* **302**, 33-36.
- 61.- Temeles G.L., Gibbs J.B., D'Alonzo J.S., Sigal I.S., Scolnick E.M. (1985). *Nature* **313**, 700-703.
- 62.- Gibbs J.B., Sigal I.S., Poe M., Scolnick E.M. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 5704-5708.
- 63.- McGrath J.P., Capon D.J., Goeddel D.V. y Levinson A.D. (1984). *Nature (London)* **310**, 644-749.
- 64.- Sweet R.W., Yokoyama S., Kamata T., Feramisco J.R., Rosenberg M. y Gross M. (1984). *Nature* **311**, 273-275.
- 65.- Manne V., Bekesi E. y Kung H.F. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 376-380.

- 66.- Der C.J., Finkel T. y Cooper G.M. (1986). *Cell* **44**, 167-176.
- 67.- Walter M., Clark S.G. y Levinson A. (1986). *Science* (Washington DC) **233**, 649-652.
- 68.- Westaway D., Papkoff J., Moscovici C. y Varmus H.E. (1986). *EMBO J.* **5**, 301-309.
- 69.- George D.L., Glick B., Trusko S. y Freeman N. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **83**, 1651-1655.
- 70.- Neel B.G., Jhanwar S.C., Chaganti R.S.K. y Haywood W.S. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **79**, 7842-7849.
- 71.- Lohuizen M. v., Verbeek S., Krimpenfort P., Domen J., Saris C., Radaszkiewicz T. y Berns A. (1989). *Cell* **56**, 673-682.
- 72.- Mayer B.J. y Hanafusa H. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2638-2642.
- 73.- Ballard D., Walker W.H., Doerre S., Sista P., Molitor J.A., Dixon E.P., Peffer N.J., Hannink M. y Green W.C. (1990). *Cell* **63**, 803-814.
- 74.- Damm K., Thompson C. y Evans R.M. (1989). *Nature* **339**, 593-597.
- 75.- Kousarides T. y Ziff E. (1989). *Cancer Cells* **1**, 71-76.
- 76.- Baluda M.A., Perbal B., Rushlow K.E. y Papas T.S. (1983). *Folia Biol.* **29**, 18-26.
- 77.- Ito Y. (1980). En *Viral Oncology* (ed. G. Klein), 447. Raven Press. New York.
- 78.- Flint S.J. (1980). En "Molecular biology of tumor viruses", segunda edición: "DNA tumor viruses" (ed. J. Tooze), 547. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 79.- Goubin G., Goldman D.S., Luce J., Neiman P.E. y Cooper G.M. (1983). *Nature (London)* **302**, 114-117.
- 80.- Klein G. (1983). *Cell* **32**, 311-315.
- 81.- Nusse R., Van Ooyen A, Westaway D., Fung Y.K., Varmus H.E. y Moscovici C. (1984). En "Cancer cells. Oncogenes and

viral genes". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 342.

82.- Taub R., Kirsch I., Morton C. y Lenior G. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 7837-7840.

83.- De Klein A., Kessel A. G. v., Grosveld G., Bartram C.R., Hagemeijer A., Bootsma D., Spurr N.K., Heisterkamp N., Groffen N. y Stephenson J.R. (1982). Nature (London) **300**, 765-770.

84.- Schimke R.T. (1982). En "Gene amplification". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 125.

85.- Varmus H.E. (1984). Ann. Rev. Genet. **18**, 553-612.

86.- Barbacid M. (1985). En "Important Advances in Oncology" (1986) (ed. DeVita V., Hellman S. y Rosenberg S.), pp. 3-22. Philadelphia, Lippincott.

87.- Frykberg L., Palmieri S., Beug H., Graf T., Hayman M.J. y Vennstrom B. (1983). Cell **32**, 227-232.

88.- Zenke M., Munoz A., Sap J., Vennstrom B., y Beug H. (1990). Cell **61**, 1035-1049.

89.- Harris H., Miller O.J., Klein G., Worst P. y Tachibana T. (1969). Nature (London) **223**, 363-369.

90.- Harris H. (1971). Proc. R. Soc. London Ser. B **179**, 1-9.

91.- Klein G., Bregula U. y Wiener F. (1974). J. Cell Sci. **8**, 659-665.

92.- Wiener F., Klein G. y Harris H. (1974). J. Cell. Sci. **15**, 177-183.

93.- Stanbridge E.J. (1987). Adv. Viral Oncol. **6**, 83-90.

94.- Klinger H.P. (1982). Cytogenet. Cell. Genet. **32**, 68-74.

95.-Klinger H.P. y Shows T.B. (1983). J. Natl. Cancer Inst. **71**, 559-563.

96.- Sager R. (1985). Adv. Cancer Res. **44**, 43-48.

97.- Bassin R.H. y Noda M. (1987). Adv. Viral Oncol. **6**, 103-110.

98.- Sachs L. (1987). Adv. Viral Oncol. **6**, 129-141.

99.- Sager R. (1989). Science (Washington DC) **246**, 1406-1412.

- 100- Finlay C.A., Hinds P.W. y Levine A. J. (1989). *Cell* 57, 1083-1093.
- 101.- Eliyahu D., Raz A., Gruss P., Givol D. y Oren M. (1984). *Nature* (London) 312, 646-649.
- 102.- Parada L.F., Land H., Weinberg R.A., Wolf D. y Roter V. (1984). *Nature* (London) 312, 649-651.
- 103.- Finlay C.A., Hinds P.W., Tan T.H., Eliyahu D., Oren M. y Levine A. J. (1988). *Mol. Cell. Biol.* 8, 531-539.
- 104.- Herzkowitz I. (1987). *Nature* (London) 329, 219-222.
- 105.- Schuab M., Alitalo K., Klempnauer K.-H., Varmus H.E., Bishop J.M., Gilbert F., Brodeur G., Goldstein M. y Trent J. (1983). *Nature* (London) 305, 245-249.
- 106.-Seeger R.C. (1985). *N. Engl. J. Med.* 313, 1111-1114.
- 107.- Hirai H., Kobayashi Y., Mano H., Hagiwara K., Maru Y., Omine M., Mizoguchi H., Nishida J. y Takaku F. (1987). *Nature* (London) 327, 430-432.
- 108.- Liu E., Hjelte B., Morgan R., Hecht F. y Bishop J.M. (1987). *Nature* (London) 330, 186-188.
- 109.-Shih C., Padhy L., Murray M. y Weinberg R.A. (1981). *Nature* (London) 290, 261-266.
- 110.-Coussens L., Yang-Feng T.L., Liao Y.-C., Chen E., Gray A., McGrath J., Seeburg P.H., Libermann T.A., Schlessinger J., Francke U., Levinson A. y Ullrich A. (1985). *Science* (Washington DC) 230, 1132-1137.
- 111.- Semba K., Kamata N., Toyoshima K. y Yamamoto T. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6497-6501.
- 112.- Schechter A.L., Hung M.-C., Vaidyanathan L., Weinberg R.A., Yang-Feng T.L., Francke U., Ullrich A. y Coussens L. (1985). *Science* (Washington DC) 229, 976-978.
- 113.- Fukushige S.I., Matsubara K.-I., Yoshida M., Sasaki M., Suzuki T., Semba K., Toyoshima K. y Yamamoto T. (1985). *Mol. Cell Biol.* 6, 955-958.
- 114.- King C.R., Kraus M.H. y Aaronson S.A. (1985). *Science* (Washington DC) 229, 974-976.

- 115.- Bargmann C.I., Hung M.C. y Weinberg R.A.(1986). Cell 45, 649-455.
- 116- Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A. y McGuire W.L. (1987). Science (Washington DC) 235, 177-182.
- 117.- Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J. Stuart S.G., Udove J., Ullrich A. y Press M.F. (1989). Science (Washington DC) 244, 707-712.
- 118.- Gaunt R. (1975). En "Handbook of physiology: Endocrinology", Greep R. y Astwood E., Eds. (American Physiological Society, Whashington, DC) 6, pp. 1-12.
- 119.- Krieger D.(1981). En "Endocrinology and Metabolism", Felig P., Baxter J.D., Broadus A.D., Frohman L.A., Eds. (McGraw-Hill, New York,), pp. 125-149.
- 120.- Baxter D.J. y Tyrrel J.B., ibíd. pp.385-510.
- 121.- Troen P. y Oshima H., ibíd., pp.627-668.
- 122.- Broackus M., ibíd., pp.963-1080.
- 123.- Jensen E.V. y DeSombre E.R. (1972). Annu. Rev. Biochem. 41, 203-206
- 124.- Tata J., Oppenheimer J.H., Koerner D., Schwartz, H.L. y Surks M.I. (1972). J. Clin. Endocrinol. Metab. 35, 330-333.
- 125.- Ivarie R.D. y O'Farrel J. (1978). Cell 13, 41-43.
- 126.- Krieger D., en "Endocrinology and Metabolism", P. Felig, J.D. Baxter, A.E. Broadus, L.A. Frohman, Eds. (McGraw-Hill, New York, 1981) pp.125-149.
- 127.- Baxter J.D. y Tirrell J.B. en "Endocrinology and Metabolism", P. Felig, J.D. Baxter, A.E. Broadus, L.A. Frohman, Eds. (McGraw-Hill, New York, 1981) pp. 385-510.
- 128.- Yamamoto K. (1985). Annu. Rev. Genet 19, 209-212.
- 129.- Ringold G. (1985). Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 259-262.
- 130.-Kurtz D.T. y Feigelson P. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4791-4796.

- 131.-Hager L.J. y Palmiter R.D.(1981). Nature (London) 291, 340-344.
- 132.- Parks W.P., Scolnick E.M. y Kosikowsky E.H. (1974). Science (Washington DC) 184, 158-163.
- 133.- Spindler S.R., Mellon S.H. y Baxter J.D. (1982). J. Biol. Chem. 257, 11627-11630.
- 134.- Evans R.M., Birnberg N.C. y Rosenfeld M.G. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7659-7663.
- 135.- Klein-Hitpass L., Schorpp M., Wagner U. y Ryffel G.U. (1986). Cell 46, 1053-1061.
- 136.- Chandler V.L., Maler B.A. y Yamamoto K.R. (1983). Cell 33, 489-492.
- 137.- Benoist C. y Chambon P. (1981). Nature (London), 290, 304-307.
- 138.- Banerji J., Olson L. y Schaffner W. (1983). Cell 33, 729-733.
- 139.- Seiler-Tuyns, Walker P., Martinez E., Mérillat A.M., Givel F. y Wahli W. (1986). Nucleic Acid Res. 14, 8755-8770.
- 140.- Klein-Hitpab L., Kaling M. y Ryffel G.U. (1988). J. Mol. Biol. 201, 537-544.
- 141.- Geisse S., Scheidereit C., Westphal H.M., Hynes N.E., Groner B., y Beato M (1982). EMBO J. 1, 1613-1619
- 142.- Renkawitz R., Schutz G., Ahe D. v.d. y Beato M (1984). Cell 37, 503-510.
- 143.- Martinez E., Givel F. y Wahli W. (1988). EMBO J. 6, 3719-3727.
- 144.- Jantzen H.M., Strahle U., Gloss B., Stewart F., Schmid W., Boshart M., Miksicek R y Schutz G.(1987). Cell 49, 29-38.
- 145.- Druege P.M., Klein-Hitpass L., Green S., Stack G., Chambon P. y Ryffel G.U. (1986). Nucleic Acids Res. 14, 9329-9337.
- 146.- Compton J., Schrader W. y O'Malley B.W.(1983). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 161-167.

- 147.- Glass C.K., Franco R., Weinberg C., Albert V.R., Evans R.M. y Rosenfeld M.G. (1987). *Nature* (London) **329**, 738-741.
- 148.- Hollenberg S. M., Weinberg C., Ong E.S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E.B., Rosenfeld M.G. y Evans R.M. (1986). *Nature* (London) **318**, 635-641.
- 149.- Weinberg C., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G. y Evans R.M. (1985). *Nature* (London) **318**, 670-672.
- 150.- Debuire B. (1984). *Science* (Washington DC) **224**, 1456
- 151.- Weinberg C., Thompson C.C., Ong E., Lebo R., Gruol D.J. y Evans R.M. (1986). *Nature* (London), **324**, 641-646.
- 152.- Sap J., Muñoz A., Damm K., Goldberg Y., Ghysdael J., Leutz A., Beug H. y Vennstrom B. (1986). *Nature* (London), **324**, 635-640.
- 153.- Petkovich M., Brand N.J., Krust A. y Chambon P. (1987). *Nature* (London) **330**, 444-450.
- 154.- Giguere V., Ong E.S., Segui P. y Evans R.M. (1987) *Nature* (London) **330**, 444-450. *Nature* (London) **330**, 624-629.
- 155.- Walter P., Green S., Krust A., Bornet J.M., Jeltsch J-M, Staub A., Jensen E., Scrace G., Waterfield M y Chambon P. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7889-7893.
- 156.- Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornet J.M., Argos P. y Chambon P. (1986). *Nature* (London) **320**, 134-139
- 157.- Greene G.L., Gilna P., Waterfield M., Baker L., Hort Y. y Shine J. (1986). *Science* (Washington DC) **231**, 1150-1154.
- 158.- Krust A. Green S., Argos P., Kumar V., Walter P., Bornet J.M. y Chambon P. (1986). *EMBO J.* **5**, 891-897.
- 159.- Weiler I., Lew D. y Shapiro D. (1987). *Mol. Endocrinol.* **1**, 355-342.
- 160.- Loosfelt H., Atger M., Misrahi M., Guiochon-Mantel A., Meriel C., Logeat F., Benarous R. y Milgrom E. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 9045-9049.
- 161.- Misrahi M., Atger M., D'Auriol L., Loosfelt H., Meriel C., Fridlansky F., Guiochon-Mantel A., Galibert F. y Milgrom E. (1987). *Biochem. Biophys. Res. Com.* **143**, 740-748.

- 162.- Conneally O. (1987). *Mol. Endocrinol.*, **1**, 517-523.
- 163.- McDonnell D. P., Mangelsdorf D.J., Pike J.W., Haussler M.R. y O'Malley B.W. (1987). *Science*, **235**, 1214-1217.
- 164.- Arriza J. (1987). *Science (Washington DC)* **237**, 268-271.
- 165.- Hollenberg S.M., Girere V., Segui P. y Evans R.M. (1987). *Cell* **49**, 39-46.
- 166.- Godowski P.J., Rusconi S., Miesfeld R. y Yamamoto K.R. (1987). *Nature (London)*, **325**, 365-368.
- 167.- Giguere V., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G. y Evans R. (1986). *Cell* **46**, 645-652.
- 168.- Kumar V., Green S., Staub A. y Chambon P. (1986). *EMBO J.* **5**, 2231-2236.
- 169.- Green S. y Chambon P. (1987). *Nature (London)*, **325**, 75-77.
- 170.- Miller J., McLachlan A Klug A. (1985). *EMBO J.*, **4**, 1609.
- 171.- Freedman L.P., Luisi B.F., Korszun Z.R., Basavappa R., Sigler P.B. y Yamamoto K.R. (1988). *Nature (London)* **334**, 543-546.
- 172.- Sabbah M., Redeuilh G., Secco C. y Baulieu E.E. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 8631-8635.
- 173.- Ponglikitmongkol M., Green S. y Chambon P. (1988). *EMBO J.* **7**, 432-441.
- 174.- Green S., Kumar V., Theulaz I., Wahli W. y Chambon P. (1988). *EMBO J.* **7**, 3037-3044.
- 175.- Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., J-R Jin y Chambon P. (1987). *Cell* **51**, 941-951.
- 176.- Gronemeyer H., Govindan M.V. y Chambon P. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 6916-6925.
- 177.- Spurr N.K., Solomon E., Jansson M., Sheer D., Goodfellow P.N., Bodmer W.F. y Vennstrom B. (1984). *EMBO J.* **3**, 159-163.
- 178.- Law M.L., Kao F.T., Wei Q., Hartz J.A., Greene G.L., Zarucki-Schulz T., Connely O.M., Jones C., Puck T.T.,

- O'Malley B.W. y Horwitz K.B. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 2877-2881.
- 179.- Mangelsdorf D.J., Ong E.S., Dyck J.A. y Evans R. (1990). Nature (London) **345**, 224-229.
- 180.- Sudhof T.C., Goldstein J.L., Brown M.S. y Russel D.W. (1985). Science (Washington DC) **228**, 815-822.
- 181.- Becker P.B., Gloss B., Schmid W., Strable U. y Schutz G. (1986). Nature (London) **324**, 686-691.
- 182.- Gordon M.S. y Notides A.C. (1986). J. Steroid. Biochem. **25**, 177-181.
- 183.- Linstedt A.D., West N.B. y Brenner R.M. (1986). J. Steroid. Biochem. **24**, 677-686.
- 184.- Scharader W. T., Birnbauer M.E., Hughes M.R., Weigel N.L., Grody W.W. y O'Malley W.W. (1980). Recent. Prog. Horm. Res. **37**, 583-633.
- 185.- Gronemeyer H., Horry P. y Chambon P. (1983). FEBS Lett., **156**, 287-292.
- 186.- Horwitz K.B., Wei L.L., Sedlacek S.M. y D'Arville C.N. (1985). Recent. Prog. Horm. Res. **41**, 249-316.
- 187.- Gronemeyer H. y Govindan M.V. (1986). Mol. Cell. Endocrinol. **46**, 1-19.
- 188.- Logeat F., Pamphile R., Jolivet H., Fournier A. y Milgrom E. (1985). Biochemistry **24**, 1029-1035.
- 189.- Loosfelt H., Logeat F., Hai M.T.V. y Milgrom E. (1984). J. Biol. Chem. **259**, 14196-14202.
- 190.- Sullivan W.P., Beito T.G., Proper J., Krco C.J. y Toft D.O. (1986). Endocrinology **119**, 1549-1557.
- 191.- Ahe D.v.d., Renoir J.-M., Buchou T., Baulieu E.-E. y Beato M. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**, 2817-2821.
- 192.- Gronemeyer H., Turcotte B., Quirin-Stricker C., Bocquel M.T., Meyer M.E., Krozowski Z., Jeltz J.M., Lerouge T., Garnier J.M. y Chambon P. (1987). EMBO J. **6**, 3985-3994.

- 193.- Eul J., Meyer M.E., Tora L., Bocquel M.T., Quirin-Stricker C., Chambon P. y Groenemeyer H. (1989). *EMBO J.* 8, 83-90.
- 194.- Kastner P., Krust A., Turcotte B., Stropp U., Tora L., Gronemeyer H. y Chambon P. (1990) *EMBO J.* 9, 1603-1613.
- 195.- Klock G., Strahle U. y Schtz G. (1987). *Nature (London)* 329, 734-736.
- 196.- Beatson C.T. (1986). *Lancet* 2, 104-107.
- 197.- Manni A. (1983). *N. Engl. J. Med.* 309, 1383-1385.
- 198.- McGuire W.L. (1980). *Recent. Prog. Hormon. Res.* 36, 135-156.
- 199.- McGuire W.L. y Clark G.M. (1983). *Sem. Oncol.* 102-106.
- 200.- Wittliff J.I. (1984). *Cancer (Phila.)* 53, 630-643.
- 201.- Manni A. (1989). *J. Endocrinol. Invest.* 12, 357-372.
- 202.- Allegra J.G., Lippman M.E., Simon R., Thompson E.B., Barlock A., Green L., Hugg K.K., Do H.M.T., Aitken S.C. y Warren N. (1979). *Cancer Treat. Rep.* 63, 1271-1277.
- 203.- McGuire W.L. (1987) *Breast Cancer Res. Treat.* 10, 5-9.
- 204.- Horwitz K.B., McGuire W.L., Pearson O.H. y Segaloff A. (1975). *Science (Washington DC)* 189, 726-727.
- 205.- Clark G.M., McGuire W.L., Pearson O.H. y Marshall J.R. (1983). *N. Engl. J. Med.* 309, 1343-1347.
- 206.- Kaufman D.W., Shaphiro S., Slone D., Rosenberg L., Miettinen O.S., Stoley P.D., Knapp R.C., Leavitt J., Stoley P.D., Knapp R.C., Leavitt T.Jr., Watring W.G., Rosenshein N.B., Lewis J.L.Jr., Schottenfeld D. y Engle R.J.Jr. (1980). *N. Engl. J. Med.* 303, 1045-1047.
- 207.- Tandon A.K., Clark G.M., Channes G.C., Chirwing J.M. y McGuire W.L. (1990). *N. Engl. J. Med.* 322, 297-302.
- 208.- Masiakowski P., Breathnach R., Bloch J., Gannon K., Krust A. y Chambon P. (1982). *Nucleic Acid Res.* 10, 7895-7903.
- 209.- Brown A.M., Jeltsch J.M., Roberts M. y Chambon P. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6344-6348.

- 210.- Roberts M., Wallace J., Jeltsch J.M., Berry M. y Chambon P. (1987). *Biochem. Biophys. Res. Com.* **151**, 306-313.
- 211.- Rio M.C., Bellocq J., Gairard B., Rasmussen U., Krust A., Koehl C., Calderoli H., Schiff V., Renaud R. y Chambon P. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9243- 9249.
- 212.- Rio M.C., Bellocq J.P., Daniel J.Y., Tomasetto C., Lathe R., Chenard M.P., Batzenschlager A. y Chambon P. (1988). *Science (Washington DC)* **241**, 705-708.
- 213.- Schuartz L.H., Koerner F.C., Edgerton S.M., Sawicka J.M., Rio M.C., Belloq J.P., Chambon P. y Thor A. (1991). *Cancer Res.* **51**, 624-628.
- 214.- Cavailles V., Augereau P., Garcia M. y Rochefort H. (1988). *Nucleic Acid Res.* **16**, 1903-1919.
- 215.- Chambon M., Cavalié-Barthez G., Veith F., Vignon F., Hallowes R. y Rochefort H. (1984). *Cancer Res.* **44**, 5733-5743.
- 216.- Henry J.A., McCarthy A.L., Angus B., Weatley B.R., May F.E.B., Nicholson S., Cairns J., Harris A.L. y Horne C.H.W. (1990). *Cancer* **65**, 265-270.
- 217.- Duffy M.J., Broullet J.P., Reilly D., McDermott E., O'Higgins N., Fennelly J.J., Maudelonde T., Y Rochefort H. (1991). *Clin. Chem.* **37**101-104.
- 218.- Bonadona G. (1976). *New Engl. J. Med.* **294**, 404-420.
- 219.- McGuire W.L. (1978). *Semin. Oncol.* **5**, 428-433.
- 220.- Leone L.A. (1973). *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **14**, 125-136.
- 221.- Medrano E.E., Cafferata E.G.A. y Acher F. (1987). *Exp. Cell Res.* **172**, 354-364.
- 222.- Medrano E.E., Resnicoff M., Cafferata E.G.A., Larcher F., Podhajcer O., Bover L. y Molinari B. (1990). *Exp. Cell Res.* **188**, 2-9.
- 223.- Soule H.D., Vasquez J., Long A., Albert S. y Brennan M.J. (1973). *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1409-1416.
- 224.- Brooks S.C., Locke E.R. y Soule H.D. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 6251-6253.

- 225.- Darbre P., Yates J., Curtis S. y King R.J.B. (1983). *Cancer Res.* **43**, 349-354.
- 226.- Siebert K., Shafie S.M., Triche T.J., Whang-Peng J.J., O'Brien S.J., Toney J.H., Huff K.K. y Lippman M.E. (1983). *Cancer Res.* **43**, 2232-2239.
- 227.- Cailleau R., Young R. y Reeves W.J.Jr.(1974). *Cancer Res.* **34**, 801-809.
- 228.- Cilleau R., Young R., Olive M.y Reeves W.J.Jr.(1974). *J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 661-674.
- 229.- Jeltsch J.M., Roberts M., Schatz C., Garnier J.M., Brown A.M.C. y Chambon P. (1987). *Nucleic Acids Res.* **15**, 1401-1414.
- 230.- Jakowlev S.B., Breathnach A., Jeltsch J.M., Masiakowski P. y Chambon P. (1984). *Nucleic Acids Res.* **120**, 2861-2868.
- 231.- Jorgensen K.H., Thim L. y Jacobsen H.E. (1982). *Regul. Pept.* **3**, 207-211.
- 232.-Thim L., Jorgensen K.H., Jorgensen K.D. (1982). *Regul. Pept.* **3**, 221-224.
- 233.- Jorgensen K.D., Diamant B., Jorgensen K.H. y Thim L. (1982). *Regul. Pept.* **3**, 231-236.
- 234.- Thim L., Thomsen J., Christensen M. y Jorgensen K.H. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* **827**, 410-414.
- 235.- Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., Jin J.R. y Chambon P. (1987). *Cell* **51**, 941-951.
- 236.- Westley B. y Rochefort H. (1980). *Cell* **20**, 352-362.
- 237.- Capony F., Morisset M., Barret A.J., Capony J.P., Broquet P., Bignon F., Chambon M. , Louisot P. y Rochefort H. (1987). *J. Cell. Biol.* **104**, 253-262.
- 238.- Morisset M., Capony F. y Rochefort H. (1986). *Biochem. Biophys. Res. Com.* **138**, 102-109.
- 239.- Faust P.L., Kornfeld S. y Chirwin J.M. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4910-4914.
- 240.- Morisset M., Capony F. y Rochefort H. (1986).

- Endocrinology 119, 2773-2783.
- 241 - García M., Lacombe M.J., Duplay H., Cavailles V., Derocq D., Delarue J.C., Krebs B., Contesso G., Sancho-Garnier H., Richer G., Domergue J., Namer M. y Rochefort H. (1987). *J. Steroid Biochem.* 27, 439-445.
- 242- Rochefort H., Augereau P., Briozzo P, Capony F., Cavailles V., Freiss G., Garcia M., Maudelonde T., Morrisset M. y Vignon F. (1988). *Biochimie* 70, 943-949.
- 243.- Watt R.(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 6307-6311.
- 244.- Weinberg R.(1982) *Cell* 24,161-164.
- 245.- Wigler M. (1983) *Cell* 34, 581-585.
- 246.- Gutman A. y Kornblit A. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7179-7182.
- 247.- Bowman L.H., Rabin B. y Schlessinger D. (1981). *Nucleic Acid Res.* 9, 4951-4967.
- 248.- Yamamoto T., Ikawa S., Akiyama T., Semba K., Nomura N., Miyajima N., Saito T. y Toyoshima K. (1986). *Nature (London)*. 319, 230-234.
- 249.- Nunberg J.H., Kaufman R.J., Chang A.C.Y., Cohen S.N. y Schimke R.T. (1980) *Cell* 19, 355-364.
- 250.- Davis J. (1980). *Methods in Enzymology* 65, 404-405.
- 251.- Auffray C. y Rougeon F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107, 303-314.
- 252.- Southern E. (1975). *J. Mol. Biol.* 98, 503-511.
- 253.- Reed K.C. y Mann V.A. (1985). *Nucleic Acid Res.* 13, 7207-7221.
- 254.- Thomas P. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5201-5207.
- 255.- Maniatis T., Fritsch E.F. y Sambrook J. (1982). *En "Molecular Cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbor*

Laboratory eds.

- 256.- Greene G.L., Nolan C., Engler J.P. y Jensen E.V. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **77**, 5115-5119.
- 257.- Miller L.S., Tribby I.I.E., Miles M.R., Tomita J.T. y Nolan C. (1982). Fed. Proc. **42**, 1178.
- 258.- Bayard F., Damilano S., Robel P. y Baulieu E.E. (1978). J. Clin. Endocrinol. Metabolism **46**, 635-648.
- 259.- Bayard F., Damilano S., Robel P. y Baulieu E.-E. (1978). J. Clin. Endocrinol. Metabolism. **46**, 635-647.
- 260.- Bradford M.M. (1976). Anal. Biochem. **72**, 248-254.
- 261.- Slamon D. (1984). Science (Washington DC) **224**, 256-260.
- 262.- Cooper G.M. y Neiman P.E. (1981). Nature (London) **292**, 857-858.
- 263.- Marx J.L. (1982). Science (Washington DC) **215**, 275-277.
- 264.- Watt R., Nishikura K., Sorrentino J., Rushdi A.A., Croce C. M. y Rovera G. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 6307-6311.
- 265.- Dalla Favera R., Wong-Staal F. y Gallo R.C. (1982). Nature (London) **299**, 61-63.
- 266.- Lang K.M. y Spritz R.A. (1987). Mol. Cell. Biol. **7**, 3428-3437.
- 267.- Lawn R.M., Efstratiadis A., O'Connell C. y Maniatis T. (1980). Cell **21**, 647-651.
- 268.- Taparowsky E., Shimizu K., Goldfarb M. y Wigler M. (1983). Cell **34**, 581-586.
- 269.- Murray M.J., Cunningham J.M., Parada L.F., Dautry F., Lebowitz P. y Weinberg R.A. (1983). Cell **33**, 749-757.
- 270.- Murray M.J., Cunningham J.M., Parada L.F., Dautry F., Lebowitz P. y Weinberg R. (1983). Cell **33**, 749-757.
- 271.- Martin P.M. y Sheridian P.J. (1982). J. Steroid Biochem. **16**, 215-229.
- 272.- Schader W.T. (1984). Nature (London) **308**, 17-18.
- 273.- King W.J. y Green G.L. (1984). Nature (London) **307**,

745-747.

274.- Welshons W.V., Lieberman M.E. y Gorski. A. (1984). Nature (London) 307, 747-749.

275.- McGuire W.L., Clark G.M., Dressler L.G. y Owens M.A. (1986). Natl. Cancer Inst. Monogr. 1, 19-23.

276.- Seibert K. y Lippman L. (1982). Clin. Oncol. 1, 735-794.

277.- Rose C., Thorpe S.M., Andersen K.W., Pedersen B.V., Mouridsen H.T., Blicter-Toft M. y Rasmussen B.B. (1985). Lancet 1, 16-19.

278.- Rose C., Thorpe S.M., Lober J., Daenfeldt J.L., Palshof T. y Mouridsen H.T. (1980). Recent Results Cancer Res. 71, 134-141.

279.- Thorpe S.M., Rose C., Rasmussen B.B., King W.J., DeSombre E.R., Blough R.M., Mouridsen H.T., Rossing N. y Andersen K.W. (1986). Breast Cancer Res. Treat. 7 (Suppl), 91-98.

280.- Sukumar S., Carney W.P. y Barbacid M. (1988). Science (Washington DC) 240, 524-526.

281.- Butler W.B., Kirkland W.L., Gargala T.L., Goran N., Kelsey W.H. y Berlinski P.J. (1983). Cancer Res. 43, 1637-1641.

282.- Yisraeli J., Frank D., Razin A. y Cedar H. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 4638-4642.

283.- Miejlinc F.C.P.W., Philipsen J.L.J., Gruber M. y Greert A.B. (1983). Nucleic Acid. Res. 11, 1361-1373.

284.- Jones P.A. (1986). Cancer Res. 46, 461-466.

285.- Petersen O.W., Hoyer P.E., y Deurs v.B. (1987). Cancer Res 47, 5748-5751.

286.- Barbacid M. (1987). Ann. Rev. Biochem. 56, 779-827.

287.- Katzenellenbogen B.S., Miller M.A., Mullick A y Sheen Y.Y. (1985). Breast Cancer Res. Treat. 5, 231-243.

288.- Nunez A.M., Berry M., Imler J.L. y Chambon P. (1989)

- Embo J. **8**, 823-829.
- 289.- Pulciani S., Santos E., Long L.K., Sorrentino B. y Barbacid M. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2836-2841.
- 290.-Sinn E., Muller W., Pattengale P., Tepler I., Wallace R. y Leder P. (1987). *Cell* **49**, 465-475.
- 291.- Escot C., Theillet C., Lidereau R., Spyrtos F., Champeme M.H., Gest J. y Callahan R. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4834-4838.
- 292.- Kozbor D. y Croce C.M. (1984). *Cancer Res.* **44**, 438-441.
- 293.- Cline M.J., Battifora H. y Yokota J. (1987). *J. Clin. Oncol.* **5**, 999-1006.
- 294.- Zhou D., Battifora H., Yokota J., Yamamoto T. y Cline M.J. (1987). *Cancer Res.* **47**, 6123-6125.
- 295.- Berger M.S., Locher G.W., Saurer S., Gullick W.J. Waterfield M.D., Groner B. y Hynes N.E.. (1988). *Cancer Res.* **48**, 1238-1243.
- 296.- Guerin M., Barrois M., Terrier M.J., Spielmann M. y Riou G. (1988). *Oncogene Res.* 321-31.
- 297.- Tsuda H., Hirohashi S. y Shimosato Y. (1989) *Cancer Res.* **49**, 3104-3108.
- 298.- Heintz N.H., Leslie K.O., Rogers L.A. y Howard P.L. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **114**, 160-163.
- 299.- Zeillinger R., Kury F., Czerwenka K., Kubista E. Sliutz G. Knogler W., Huber J., Zielinski C. Reiner G., Jakesz R., Staffen A, Reiner A., Wrba F. y Spona J. (1989). *Oncogene* **4**, 109-114.
- 300.- Tandon A.K., Clark G.M., Chamnes G.C., Ullrich A. y Mcwire W.L. (1989). *J. Clin. Oncol.* **7**, 1120-1128.
- 301.- Barnes D.M., Lammie G.A., Millis R.R., Gullick W.L., Allen D.S. y Altman D.G. (1988). *Br. J. Cancer* **58**, 448-452.
- 302.-Van de Vijver M.J., Peterse J.L., Mooi W.J., Wisman P., Lomans J., Calesio O. y Nusse R. (1988). *N. Engl. J. Med.*

- 319, 1239-1245.
- 303.- Varley J.M., Swallow J.E., Brammar W.J., Whitaker J.L. y Walker R.A. (1987). *Oncogene* 1, 423-430.
- 304.- Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove, J. Ullrich A. y Press M.F. (1989). *Science* (Washington DC) 244, 707-712.
- 305.- Wright C., Angus B., Nicholson S., Sainsbury J.R.C., Cairns J., Gullick W.J., Kelly P., Harris A.L. y Horne C.H.W. (1989). *Cancer Res.* 49, 2087-2090.
- 306.- Van de Vijver M.J., Van de Bersselaar R., Devilee P., Cornelisse C., Peterse J.L. y Nusse R. (1987). *Mol. Cell. Biol.* 7, 2019-2023.
- 307.- Ali L.U., Campbel G., Lidereau R. y Callahan R. (1988). *Oncogene Res.* 3, 139-146.
- 308.- Ali L.U., Campbel G., Lidereau R. y Callahan R. (1988). *Science* (Washington DC) 240, 1795-1796.
- 309.- Biunno L., Pozzi M.R., Pierotti M.A., Pilotti S., Cattoretti G. y Della Porta G. (1988). *Br. J. Cancer* 57, 464-468.
- 310.- Zhou D.J., Ahuja H. y Cline M.J. (1989). *Oncogene* 4, 105-108.
- 311.- Machotka S.V., Garrett C.T., Schwartz A.M. y Callahan R. (1989). *Cli. Chim. Acta* 184, 207-218.
- 312.- Gusterson B.A., Machi L.G., Gullik W.J., Gibbs N.M., Powles T.J., Elliot C., Ashley S., Monaghan P. y Harrison S. (1988). *Br. J. Cancer* 58, 453-457.
- 313.- Kumar R., Sukumar S. y Barbacid M. (1990). *Science* (Washington DC) 248, 1101-1104.
- 314.- Bargmann C.I., Hung M.C. y Weinberg R. (1986). *Cell* 45, 649-657.
- 315.- Dayton A.I., Selden J.R., Laws G., Dorney D.J., Finan J., Tripputi P., Emanuel B.S., Rovera G., Nowel P.C. y Croce

- C.M. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**, 4495-4499.
- 316.- Spurr N.K., Solomon E., Jansson M., Sheer D., Goodfellow P.N., Bodmer W.F. y Vennstrom B. (1984). EMBO J. **3**, 159-163.
- 317.- Fukushige S., Matssubara K., Yoshida M., Sasaki M., Suzuki T., Semba K., Toyoshima K. y Yamamoto T. (1986). Mol. Cell. Biol. **6**, 955-958.
- 318.- Casy G., Smith R, McGillivray D., Peters G. y Dickson G. (1986). Mol. Cell Biol. **6**, 502-510.
- 319.- Yoshida M.C., Wada M., Satoh H., Yoshida T., Sakamoto H., Miyagawa K., Yokota J., Koda T., Kakinuma M., Sugimura T. y Terada M. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**, 4861-4864.
- 320.- Nguyen C., Roux D., Mattei M.G., de Lapeyriere O., Goldfarb M., Birnbaum D. y Jordan B.R. (1988). Oncogene **3**, 703-708.
- 321.- Nusse R., Ooyen A. v., Cox D., Fung Y.K. y Varmus H. (1984). Nature (London) **307**, 131-136.
- 322.- Dickson C., Smith R., Brookes S. y Peters G. (1984). Cell **37**, 529-536.
- 323.- Adnane J., Gaudray P., Simon M.P., Simony-Lafontaine J., Jeanteur P. y Thelliet C. (1989). Oncogene **4**, 1389-1395.
- 324.- Bonilla M., Ramirez M., Lopez-Cueto J. y Gariglio P. (1988). J. Natl. Cancer Inst. **80**, 665-671.
- 325.- Lidereau R., Callahan R., Dickson C., Peters G., Escot C. y Ali I.U. (1988). Oncogene Res. **2**, 285-291.
- 326.- Zhou D.J., Casey G. y Cline M.J. (1988). Oncogene **2**, 279-282.
- 327.- Theillet C., Le Roy X., De Lapeyriere O., Grosgeorges J., Adnane J., Rainaud S.D., Limoni-Lafontaine J., Goldfarb M., Escot C., Birnbaum D y Gaudray P. (1989). Oncogene **4**, 915-922.
- 328.- Ali I.U., Merlo G., Callahan R. y Lidereau R. (1989).

Oncogene 4, 89-92.

329.- Sato T., Tanigami A., Yamakawa K., Akiyama F., Kasumi F., Sakamoto F. y Nakamura Y. (1990). *Cancer Res.* 50, 7184-7189.

330.- Mackay J., Steel C.M., Elder P.A., Forrest A.P.M. y Evans H.J. (1988). *Lancet* 2, 1384-1385.

331.- Finlay C.A., Hinds P.W. y Levine A.J. (1989). *Cell* 57, 1083-1093.

332.- Paterson M.C., Dietrich K.D., Danyluk J., Paterson A.H.G., Lees A.W., Jamil N., Hanson J., Jenkins H., Krause B.E., McBlain W.A., Slamon D.J. y Fourney R.M. (1991). *Cancer Res.* 51, 556-567.

333.- Callahan R. y Campbell G. (1989). *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1780-1786.

334.- Maguire H.C.Jr. y Greene M.I. (1989). *Semin. Oncol.* 16, 148-155.

335.- Nishikura K., Ar-Rushdi A., Erikson J., Watt R., Rovera G. y Croce C.M. (1983). *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 4822-4826.

336.- Nembrot M., Quintana B. y Mordoh J. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 166, 601-607.

337.- Falette N.S., Fuqua S.A.W., Chamnes G.C., Cheah M.S., Greene G.L. y McGuire W.L. (1990). *Cancer Res.* 50, 3974-3978.

338.- Coleman R.T., Taylor J.E., Shine J.J. y Frossard P.M. (1988). *Nucleic Acid Res.* 16, 7208.

339.- Ponglikitmongkol M., Green S. y Chambon P. (1989). *EMBO J.* 7, 3385-3388.

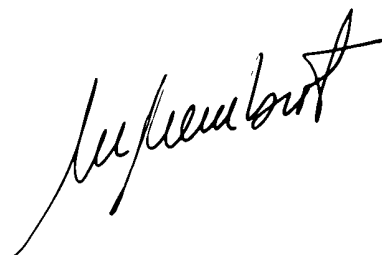
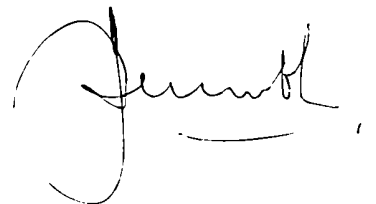
340.- Ballare C., Breavo A.I., Laucella S., Sorin I., Cerdeiro R., Loza J., Sousa Martinez F., Guman N. y Mordoh J. (1989). *Cancer* 64, 842-848.

341.- Murphy L.C. y Dotzlaw H. (1989). *Mol. Endocrinol.* 3, 687-693.

342.- Raam S., Robert N., Pappas C.A. y Tamura H. (1988). *J.*

- Natl. Cancer Inst. 80, 756-761.
- 343.- Horigome T., Golding T.S., Quarmbly V.E., Lubahn D.B., McCarthy K. y Korack K.S. (1987). *Endocrinology* 121, 2099-2111.
- 344.- Baskevitch P.P. y Rochefort H. (1985). *Eur. J. Biochem.* 146, 671-678.
- 345.- Aurucchio F., Migliaccio A., Castoria G., Rotundi A., Di Domenico M. y Pagano M. (1986). *J. Steroid Biochem.* 24, 39-43.
- 346.- Puca G.A., Abbondanza C., Nigro V., Armetta I., Medici N. y Molinari A.M. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5367-5371.
- 347.- Hill S.M., Fuqua S.A.W., Channes G.C., Greene G.L. y McGuire W.L. (1989). *Cancer Res.* 49, 145-148.
- 348.- Garcia T., Sanchez M., Cox J.L., Shaw P.A., Rps J.B.A., Lehrer S. y Schachter B. (1989). *Nucleic Acid Res.* 17, 8364.
- 349.- Dressler L.G., Seamer L.C., Owens M.A., Clark G.M. y McGuire W.L. (1988). *Cancer* 61, 420-427.
- 350.- Hedley D.W., Rugg C.A., Ng A.B.P. y Taylor I.W. (1984). *Cancer Res.* 44, 5395-5398.
- 351.- Devilee P., Thierry R.F., Kievits T., Kollury R., Hopman A.H.N., Willard H., Pearson P. y Cornelisse C.J. (1988). *Cancer Res.* 48, 5825-5830.
- 352.- Hung M.-C., Schechter A.L., Chevray P.-Y.M., Stern D.F. y Weinberg R.A. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 261-264.
- 353.- Huckaby C.S., Conneely O.M., Beattie W.G., Dobson A.D.W., Tsai M.-J. y O'Malley B.W. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8380-8384.
- 354.- Law M.L., Kao F.T., Hartz J.A., Greene G.L., Zarucki-Schultz T., Conneely O.M., Jones C., Puck T.T., O'Malley B.W. y Horwitz K.B. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 2877-2881.

- 355.- Imagawa W., Tomooka Y. y Nandi S. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 4074-4077.
- 356.- Katzenellenbogen B.S., Kendra K.L., Norman M.J. y Berthois Y. (1987). Cancer Res. **47**, 4355-4360.
- 357.- Vignon F., Bouton M.-M. y Rochefort H. (1987). Biochem. and Biophys. Res. Com. **146**, 1502-1508.
- 358.- Yamamoto K.R. (1985). Annu. Rev. Genet. **19**, 209-252.
- 359.- Cavailles V., Augereau P., Garcia M. y Rochefort H. (1988). Nucleic Acids Res. **16**, 1903-1919.
- 360.- Devleeschouwer N., Legros N., Olea-Serrano N., Paridaens R. y Leclercq G. (1987). Cancer Res. **47**, 5883-5887.
- 361.- Aitken S.C., Lippman M.E., Kasid A. y Schoenberg D.R. (1985). Cancer Res. **45**, 2608-2615.
- 362.- Kasid A., Lippman M.E., Papageorge A.G., Lowy D.R. y Gelmann E.P. (1985). Science (Washington DC) **228**, 725-728.
- 363.- Worland P.J., Bronzert D., Dickson R.B., Lippman M.E., Hampton L., Thorgeirsson S.S. y Wirth P.J. (1989). Cancer Res. **49**, 51-57.
- 364.- Kamata T. y Feramisco J.R. (1984). Nature (London) **310**, 147-150.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lippman'.A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Kasid'.