



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INSTITUTO DE NUTRICION Y
TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS
UNIVERSIDAD DE CHILE

*Vías de señalización implicadas en la acción
antiproliferativa de un ciclopéptido (cP) derivado de
 α -fetoproteína (AFP) en células MCF7 en cultivo*

MEMORIA DE TÍTULO

ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

Por

ELMER RODRIGO ANTILEO IBARRA



DIRECTOR DE TESIS: DR. WALTER SIERRALTA
PATROCINANTE: DRA. MARGARITA CARÚ

DICIEMBRE 2007
SANTIAGO-CHILE

UCH-FC - Biotecnología
A629
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

*Vías de señalización implicadas en la acción
antiproliferativa de un ciclopéptido (cP) derivado de
 α -fetoproteína (AFP) en células MCF7 en cultivo*

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

ELMER RODRIGO ANTILEO IBARRA

Dr. Walter Sierralta
Director de Memoria de Título

Dra. Margarita Carú
Patrocinante



Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. María Rosa Bono

Dr. Mario Rossemblat

Santiago de Chile, Diciembre 2007.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INSTITUTO DE NUTRICION Y
TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS
UNIVERSIDAD DE CHILE



*Vías de señalización implicadas en la acción
antiproliferativa de un ciclopeptido (cP) derivado de
 α -fetoproteína (AFP) en células MCF7 en cultivo*

MEMORIA DE TÍTULO

ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

Por

ELMER RODRIGO ANTILEO IBARRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. WALTER SIERRALTA
PATROCINANTE: DRA. MARGARITA CARÚ

DICIEMBRE 2007
SANTIAGO-CHILE

AGRADECIMIENTOS

"Mientras los ríos corran al mar, hagan sombra a los valles los montes y haya estrellas en el cielo, debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre agradecido"

Agradezco en primer lugar a Dios y a mis padres Berta y Oscar por darme la oportunidad de realizar todos mis anhelos. A mis padres agradezco por apoyarme en la gran travesía de lograr pertenecer al selecto grupo de científicos chilenos. Estoy inmensamente agradecido por todo lo que me han entregado, por un lado el gran amor y la constante preocupación por mí, han permitido que ha medida que transcurre el tiempo mi amor por ellos y, por todo lo que me han dado, crezca día tras día. Por otro lado las enseñanzas y valores que he recibido de parte de ellos me han ayudado a ser persistente y obstinado en todas las metas que me planteo. También no puedo dejar de dar agradecimientos a mis queridos hermanos Lixzy, Yurie, Valeska y Jano, por la constante preocupación y atención hacia su hermanito menor.

Referente al tema profesional, quisiera agradecer cariñosamente al tutor de esta tesis, Dr. Walter Sierralta L., quien depositó toda su confianza en mí para realizar esta memoria de tesis, enseñándome técnicas, herramientas y recetas fundamentales para el análisis de los maravillosos sistemas celulares, y que amablemente me entregó gran parte de los fundamentos necesarios como para poder crecer y desarrollarme como un ente científico.

En el fondo, los científicos somos gente con fortuna: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida....Lee Smolin. Físico Teórico.





INDICE DE MATERIAS

INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
RESULTADOS.....	17
1. Análisis de efecto inhibitorio de cP sobre la proliferación de cultivos celulares MCF7 en presencia de suero.....	17
1.1. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con STT, estimuladas con EGF y/o E2.....	17
2. Efecto inhibitorio de cP sobre la proliferación de células MCF7 en ausencia de suero.....	20
2.1. Proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con EGF y/o E2.....	20
2.2. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con E2.....	22
3. Efecto de la presencia de HSA en la acción antiproliferativa de cP sobre células MCF7 cultivadas en medio libre de suero.....	24
3.1. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo, estimuladas con E2 en presencia o ausencia de HSA.....	24

3.2. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero y HSA, estimuladas con EGF.....	26
4. Efectos de la adición posterior de STT sobre proliferación de células MCF7 en medio libre de suero.....	28
4.1. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7, en medio con sucedáneo de suero con o sin HSA, estimuladas con E2 y su posible recuperación con STT.....	28
5. Análisis del rol de AFPR en la acción antiproliferativa de cP sobre proliferación de cultivos celulares MCF7 libres de suero.....	30
5.1. Efecto de SFB y STT sobre la acción antiproliferativa de cP en células MCF7 crecidas en medio libre de suero y estimuladas con E2.....	30
5.2. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con SFB y adición de suero anti-AFP.....	32
5.3. Determinación de la presencia y distribución de AFPR en extractos de proteínas de células MCF7 mediante dot blot.....	35
5.4. Inmuno Blot.....	35
5.5. Tests de inmunofluorescencia para observar el efecto de cP sobre la expresión de AFPR en el tiempo.....	36
5.6. Análisis por inmuno-microscopía electrónica de transmisión (MET) de cambios en la expresión y distribución de AFPR en células MCF7 estimuladas con cP.....	37
6. Análisis de una vía alternativa a AFPR para la acción antiproliferativa de cP en cultivos celulares MCF7 libres de suero.....	39
6.1. Efecto de cP sobre la proliferación de MCF7 en medio con sucedáneo de suero con o sin HSA, estimuladas con TGF α y/o E2.....	39
6.2. Test de inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal contra HER2 (EGFR2). Efecto de un estímulo constante de EGF en presencia y ausencia de cP.....	42
6.3. Inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal contra HER2 (EGFR2). Efecto de un estímulo de corta duración de EGF en presencia y ausencia de cP.....	46

6.4. Tests de inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal contra la forma activada de MAPK. Efecto de un estímulo de corta duración de EGF en presencia y ausencia de cP.....48

6.5. Inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal contra PKCd. Efecto de un estímulo de corta duración de EGF en presencia y ausencia de cP.....50

DISCUSIÓN.....53

CONCLUSIONES.....59

REFERENCIAS.....62



INDICE DE FIGURAS

Figura 1A. Estructura primaria, dominios y subdominios de AFP.....	2
Figura 1B. Estructura ciclopéptido.....	4
Figura 2. Organización y función de EGFR-Raf-Ras-MAPK.....	6
Figura 3. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con STT, estimuladas con E2, en presencia o ausencia de cP.....	18
Figura 4. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con STT, estimuladas con EGF, en presencia o ausencia de cP	19
Figura 5. Curva de proliferación de MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con EGF y/o E2.....	21
Figura 6. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con E2 en presencia o ausencia de cP	23
Figura 7. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero conteniendo HSA, estimuladas con E2 en presencia o ausencia de cP	25
Figura 8. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero y HSA, estimuladas con EGF en presencia o ausencia de cP	27
Figura 9. Curva de proliferación en medio con sucedáneo de suero, con o sin HSA, de células MCF7 estimuladas con E2 en presencia o ausencia de cP y su posible recuperación con STT	29
Figura 10. Curva de proliferación de células MCF7, en presencia de E2 con o sin cP en medio libre de suero y estimuladas con SFB y STT	31
Figura 11. Curva de proliferación de células MCF7 en presencia o ausencia de cP en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con SFB y con adición de suero antiAFP.....	33
Figura 12. Inmunoreactividad de AFPR después de estímulo con cP.....	36
Figura 13. Análisis por MET del efecto de cP sobre la expresión de AFPR en células MCF7.....	38

Figura 14. Cross-talk entre vía de señalización de Estrógeno y EGF.....	39
Figura 15. Curva de proliferación de MCF7 en medio con sucedáneo de suero con o sin HSA, estimuladas con TGF α y/o E2 en presencia o ausencia de cP	41
Figura 16. Inmunoreactividad de HerBb2 después de un estímulo constante de EGF en presencia o ausencia de cP.....	43
Figura 17. Inmunoreactividad de HerBb2 después de un estímulo constante de EGF en presencia o ausencia de cP (Observación al 100x).....	45
Figura 18. Inmunoreactividad de HerBb2 después de un estímulo de corta duración de EGF en presencia o ausencia de cP.....	47
Figura 19. Inmunoreactividad de MAPK después de un estímulo de corta duración de EGF en presencia o ausencia de cP.....	49
Figura 20. Principal mecanismo de modulación del arresto del ciclo celular.....	50
Figura 21. Inmunoreactividad de PKCd después de un estímulo de corta duración de EGF en presencia o ausencia de cP.....	52
Figura 22. Intermediarios involucrados en el mecanismo de acción antiproliferativa de cP.....	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo.....	11
Tabla 2. Inhibición de la proliferación de MCF7 por presencia de cP, cultivadas en medio con SFB y estimuladas con E2.....	18
Tabla 3. Inhibición de la proliferación de MCF7 por presencia de cP, cultivadas en medio con SFB y estimuladas con EGF.....	19
Tabla 4. Proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con EGF y/o E2.....	21
Tabla 5. Inhibición de la proliferación de MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero y estimuladas con E2.....	23

Tabla 6. Inhibición de la proliferación de MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero con y sin HSA.....25

Tabla 7. Inhibición de la proliferación de MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero con HSA y estimuladas con EGF.....27

Tabla 8. Inhibición de la proliferación de MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero y recuperación celular con STT.....29

Tabla 9. Inhibición de la proliferación de MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con SFB, STT y/o E2.....31

Tabla 10. Inhibición de la proliferación de MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero, en presencia de SFB, S.conejo con/sin E2 y adición suero anti-AFP33

Tabla 11. Inhibición de la proliferación de MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero con HSA, estimuladas con TGFa y/o E2.....41



ABREVIATURAS

AFPR : Receptor de alfafetoproteína

BSA : Albúmina sérica de bovino

cP : ciclopéptido

D-MEM : Medio mínimo de Dulbecco tipo Eagle

EGF : Factor de crecimiento epidemal

E2 : Estradiol (2nM)

HAES : almidón polihidroxilado al 3%

HER2 : Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal, equivalente a EGFR2

HSA : Albúmina sérica humana

ITS : Insulina, Transferrina, Selenio

MEM-E : Medio mínimo esencial tipo Eagle

p-MAPK : Proteína quinasa activada por mitógeno fosforilada

PBS : Tampón fosfato salino

PKCd : Proteína quinasa C (d)

SFB : Suero fetal bovino

STT : Suero tratado de ternera

TGF α : Factor transformante del crecimiento (α)

RESUMEN

El cáncer mamario, neoplasia maligna caracterizada por la multiplicación desordenada e incontrolada de las células en algún sitio de la glándula mamaria, es mortal si no se atiende en forma oportuna. La alfa-fetoproteína (AFP), glicoproteína sintetizada por el feto y presente en el plasma de embarazadas, es un factor capaz de reducir significativamente el riesgo de cáncer mamario en mujeres embarazadas. Un ciclononapéptido (cP), diseñado en base a la secuencia de aminoácidos que determinan la actividad protectora de AFP, detiene la proliferación de células tumorales humanas en cultivo, inhibe la acción uterotrónica de estradiol y bloquea el desarrollo de tumores mamaros estrógeno-dependientes xeno-implantados en ratones inmunodeficientes. En esta tesis, empleando la línea celular MCF7 como modelo de célula tumoral mamaria, se analizó en un sistema libre de suero, los efectos antagónicos de cP frente a diferentes estímulos mitogénicos, El objetivo fundamental del trabajo fue elucidar los mecanismos por los cuales el cP desencadena su efecto inhibitorio sobre la proliferación.

Los experimentos realizados en esta tesis señalan que la presencia del cP no afecta la expresión ni distribución del receptor de AFP (AFPR), sugiriendo que la acción del ciclopéptido no involucra unión a este receptor. Con el fin de evaluar una vía alternativa al AFPR, se analizó la expresión del factor de crecimiento epidermal 2 (EGFR2 o HER2) frente a estímulo constante como a pulsos de EGF; en ambas condiciones, el cP disminuyó considerablemente la expresión de este receptor, señalando que el mecanismo inhibitorio del cP se relacionaría con la vía de señalización de HER2. En estas condiciones EGF aumentó la expresión de quinasas reguladas por señal extracelular - ERK1/2- (MAPK), comprobando una relación entre la activación de EGFR y la vía de MAPK. Determinamos que el cP provocó, a tiempos tempranos de estimulación, una menor activación nuclear de MAPK, indicando que cP interfiere con la modulación de factores transcripcionales. Con el objeto de asociar

nuestros resultados con el arresto del ciclo celular, se analizó la expresión de proteína quinasa C δ (PKC δ), bajo idénticas condiciones, se observó que la presencia del cP logró estimular la expresión de esta proteína quinasa, indicando que existe una relación entre la inhibición de la proliferación por presencia de cP y la extensión del ciclo celular a través de un aumento en la expresión de PKC δ , lo que a la postre causa una disminución en el tiempo en el número de células MCF7 en cultivo.

ABSTRACT

Mammary cancer is a malign neoplasy characterized by an unordered and uncontrolled cell multiplication in the mammary gland, being mortal if not treated opportunely. The glicoprotein alpha-fetoprotein (AFP), that is sintetized by the fetus and present in the plasma of pregnant women, significantly reduces the risk of mammary cancer in this group of women.

A cyclopeptide (cP), designed on an eight aminoacid sequence of the site with protector activity of the AFP, stops proliferation of tumor cells in culture, inhibits the uterotropic action of estradiol and blocs the growth of estrogen-dependent mammary tumors xenografted in to immunodeficient mice.

In this thesis, using the cell line MCF7 as a mammary tumor cell model, the antagonic effects of cP were analyzed, as opposed to different mitogenic stimuli on cell proliferation were analized. The main objective of this work was to elucidate the mechanisms by which cP exerts its inhibitory action on cell proliferation.

The experiments done in this thesis indicate that the presence of cP does not affect the expression nor the distribution of the AFP receptor (AFPR), suggesting that the action of the cyclopeptide does not involucrate union to this receptor.

To evaluate an alternative pathway to AFPR, the expression of HerBb2 in response to constant stimuli and to EGF pulses was analyzed. In both conditions cP considerably diminished the expression of this receptor, indicating that the inhibitory mechanism of the peptide would be related to the HER2 signalling pathway. In this conditions EGF enhanced the expression of ERK1/2 (MAPK), proving demonstrating a relation between EGFR activation and the MAPK pathway. In the presence of cP a lower nuclear activation of MAPK was seen, indicating that it interferes with the modulation of transcriptional factors. To associate our results with cell cycle arrest, the expression of PKC δ under the same conditions was analyzed, finding that cP

stimulated the expression of this protein and indicating a relation between the inhibition of proliferation by cP and the extension of the cell cycle through an increase in PKC δ expression. As a consequence of this there is a diminution in the number of MCF7 cells in culture.

INTRODUCCIÓN

En nuestros días, el cáncer de mama ocupa un lugar preponderante a nivel mundial como causa de enfermedad y muerte en mujeres adultas. En algunos países tiene una alta incidencia, mientras que en otros se presenta en forma algo más esporádica. En todo caso, es un tipo de cáncer que de detectarse en forma temprana, puede ser detenido en su progresión. Sus signos y síntomas comienzan con abultamiento en la mama, sangramiento o flujo en el pezón, la mama se ve enrojecida e inflamada, cambiando su forma y contornos. En la actualidad, el agente tamoxifeno es ampliamente usado para el tratamiento de cánceres de mama que responden a estrógeno y ha suministrado significativos beneficios a mujeres con dicha enfermedad (Fisher B. y col. 1989). Sin embargo, existen problemas conectados con el uso clínico de dicho agente, debido a que no todos los tipos de cáncer de mama son sensibles a la droga y, peor aún, un porcentaje considerable de mujeres cuyos tumores responden inicialmente a tamoxifeno, experimentan recurrencia durante el tratamiento debido a que aparentemente el tumor ha adquirido resistencia a la droga (Fisher B. y col. 1998). Otro de los efectos no deseados es el incremento de la incidencia de cáncer uterino en pacientes que son tratadas con tamoxifeno.

La alfa-fetoproteína (AFP) es una glicoproteína de 590 aminoácidos producida durante el embarazo por el saco vitelino y el hígado fetal, constituyendo la principal proteína presente en el plasma fetal durante la gestación (Crandall B. y col. 1981), además se encuentra en niveles elevados en el suero de las mujeres embarazadas. El nivel de la proteína en la circulación del feto es muy alto (1-10 mg/ml), y disminuye abruptamente después del parto. Al término del segundo mes postparto, sólo cantidades trazas de AFP se detectan en la circulación del infante, siendo sustituida completamente por la albúmina sérica (HSA) (Dudich E. y col. 1998). Durante el embarazo, la alteración de los niveles normales de AFP en la circulación materna indica complicación en el embarazo, por lo que se considera a AFP como un marcador

del bienestar fetal. A excepción del embarazo, sólo ciertos tumores hepáticos y testiculares producen altas concentraciones de alfa-fetoproteína, por lo cual se la reconoce como indicador clínico temprano de tumores en humanos (Abelev y col. 1963; Tartarinov y col 1963; Brock y Sutcliffe. 1972). AFP tiene un peso molecular de alrededor de 69 kDa y tiene un 39% de homología en la estructura primaria con la seroalbúmina (Savickiene J. y col. 1999).

Se ha propuesto que la estructura terciaria de AFP contiene al menos tres dominios, basados sobre su patrón de uniones disulfuros (Morinaga T. y col. 1983). Mediante herramientas de biología molecular se ha analizado la molécula de AFP en sus dominios y subdominios (Fig. 1A).

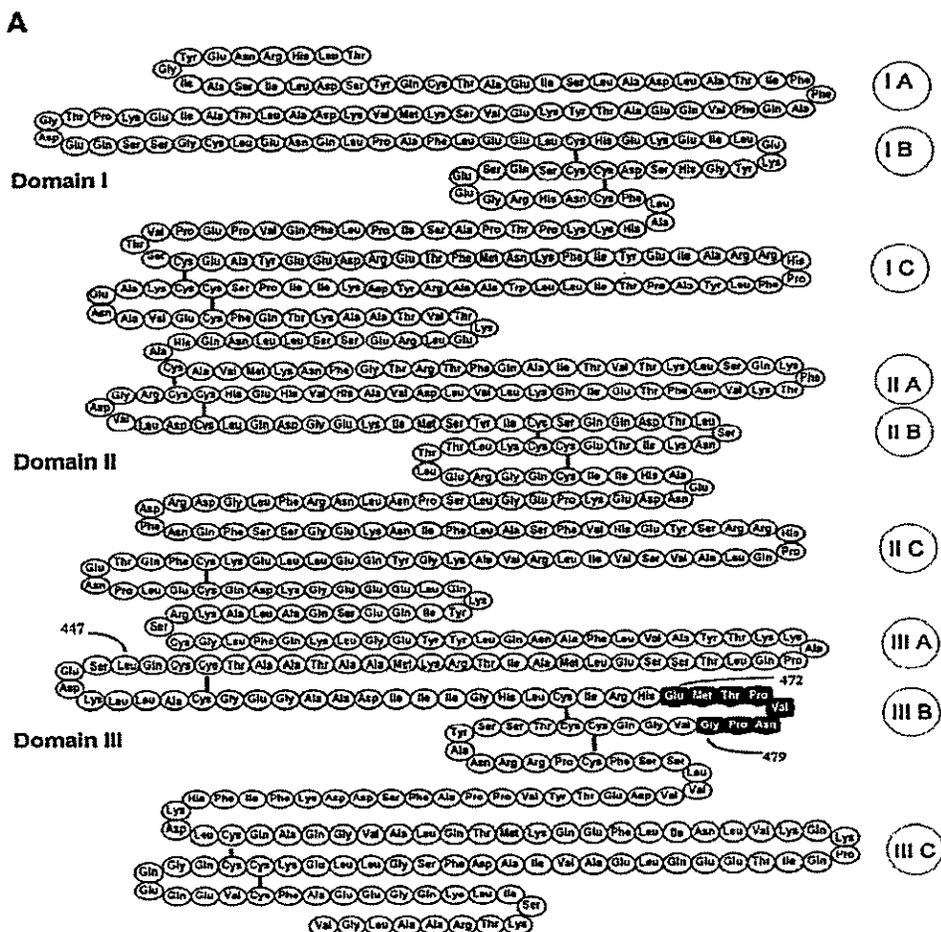


Figura 1A. Estructura primaria, dominios y subdominios de AFP.

Estudios de unión con curvas de saturación tipo Scatchard en células de cáncer de mama humano (MCF7), han sugerido la presencia de un receptor específico de superficie para AFP. Estos análisis revelaron la presencia de por lo menos dos sitios de unión de alta afinidad, con K_d de 10^{-8} y 10^{-9} M, con 2,000 y 135,000 sitios por célula, respectivamente (Villacampa M. y col. 1984).

Las funciones de la proteína parecen estar relacionadas con cambios conformacionales que son inducidos por la unión de varias moléculas (Deutsch H. y col. 1991). Una novedosa función para la AFP fue descubierta al incubar soluciones de ésta con estradiol (Allen S. y col. 1993, Jacobson H. y col. 1990, Mizejewski G. y col. 1983): se determinó que el esteroide induce un cambio conformacional en la proteína (Festin S. y col. 1999), como se evidenció por un cambio en el espectro UV. Se piensa que este cambio está relacionado con la re-exposición de amino ácidos aromáticos en la estructura terciaria (Jacobson y col. 1989). Se observó también en ratón inmaduro que el crecimiento uterino estimulado por estrógeno, se inhibe cuando la AFP tanto de ratón (rAFP) como de humano (hAFP), se agrega previamente a la administración de estradiol (E2) (Mizejewski G. y col. 1983; 1985). Se propuso que sólo una porción de la molécula de AFP está involucrada, ya que el bolsillo de unión a estrógeno se localiza en el tercer dominio de AFP. El cambio conformacional generaría en la proteína un mayor efecto inhibitorio del crecimiento que el mostrado por la proteína no tratada (Mizejewski G. y col. 1983, Festin S. y col. 1999). La acción inhibitoria del crecimiento ejercida por AFP se ha encontrado en cáncer de mama (Jacobson H. y col. 1990) y en útero de ratón inmaduro (Allen S. y col. 1993), efecto que depende de la unión previa al ensayo, del estrógeno y la proteína. Las propiedades de AFP transformada se podrían relacionar con la observación epidemiológica de que AFP otorgaría protección contra el cáncer de mama a las mujeres que han parido, protección que se manifiesta hasta muchos años después del episodio fértil (Albrektsen G. y col. 1995, Melbye M. y col. 2000, Richardson B. y col. 1998).

Debido a que la inducción de la actividad inhibitoria de AFP requiere E2, es razonable pensar que esta actividad depende del bolsillo en una región de la proteína que une al estrógeno. Se determinó que estradiol se une al dominio III AFP (Festin S. y col. 1997; 1999). Basados en estas observaciones, se produjeron péptidos que contienen el subdominio activo del dominio III, empleando síntesis peptídica en fase sólida. Se elaboró primero un péptido de 34 residuos de aminoácidos (LSEDKLLACGEGAADIIGHL CIRHEMTPVNPGV) de 3573Da (equivalentes a los amino ácidos 447 al 480), el cual mostró actividad inhibitoria (Mizejewski G. y col. 1996). El péptido sintético fue evaluado en diferentes bioensayos, incluyendo determinaciones enzimáticas basadas en procesos dependientes de estrógeno. Los bioensayos incluyeron dos modelos in vivo relativos a crecimiento uterino de roedores y sistemas de cultivo de células de cáncer de mama humano (T47D y MCF-7). Posteriormente se informó que un ciclónapéptido, derivado de los amino ácidos 472 al 479 de la AFP (Fig. 1B), correspondiente a la región carboxilo terminal del péptido de 34 residuos de aminoácidos, contiene la secuencia mínima requerida para expresar la actividad antiproliferativa y antitumorigénica que expresa la proteína completa.

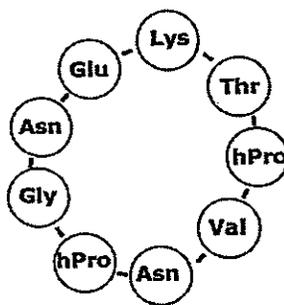


Fig 1B. 9mer, ciclo péptido (cP)

Figura 1B. Estructura del ciclopéptido (cP) utilizado en esta tesis.

Mesfin y col. sintetizaron primero la forma lineal del péptido, EMTPVNPG, demostrando que esta es la secuencia mínima necesaria con actividad oncostática (Mesfin F. y col. 2000). La ciclación de esta molécula produjo una molécula con gran actividad, sin efectos negativos (sin toxicidad) y muy estable (Mesfin F. y col. 2001).

En nuestro laboratorio, usando cultivos de células MCF-7 y ZR-75-1 de cáncer de mama humano (Sierralta y col. 2006) hemos demostrado que bajas concentraciones del ciclopéptido (cP) inhiben la proliferación estradiol-dependiente. Asimismo se ha observado que el cP aminora el crecimiento de tumores mamarios de células humanas con receptores de estrógenos (ER+), xenoinplantados en ratones inmuno-deprimidos (DeFreest L. y col. 2004), incluso cuando las células tumorales implantadas eran resistentes a tamoxifeno (Bennett J. y col. 2002). Además, el cP inhibe el crecimiento uterino inducido por tamoxifeno o por estrógeno, "efecto antiuterotrófico" (Bennett J. y col. 2002, Mesfin F. y col. 2000; 2001). A diferencia de la situación con alfa-fetoproteína, el cP no requiere tratamiento con estrógeno antes de su aplicación en sistemas biológicos.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, G Protein Coupled Receptors) constituyen la mayor superfamilia de receptores de superficie. El descubrimiento de que algunas mutaciones de GPCRs que los activan de manera constitutiva se relacionan con ciertas formas de neoplasia, sugirió el potencial oncogénico de los GPCRs. En muchos casos los efectos oncogénicos se ejercen a través del control de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, extracellular signal-regulated kinases), enzimas pertenecientes a la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, mitogen-activated protein kinases). La cascada de señalización de ERK1/2 ha mostrado ser un regulador crítico de la proliferación, diferenciación, homeostasis, función neuronal y fisiología celular. En muchos casos, la activación de ERKs por GPCRs se asemeja a la señalización empleada por los receptores con actividad tirosina quinasa para factores de crecimiento, como son el

receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor) o el receptor para el factor derivado de plaquetas (PDGF, platelet-derived growth factor).

La expresión y actividad del receptor de crecimiento epidermal (EGFR, también llamado ERBB o HER) se ha relacionado con la migración, invasión, y metástasis celular (Kondapaka S. y col. 1997). La unión de EGF o de TGF α al dominio extracelular de EGFR provoca activación de la tirosina quinasa citoplasmática, experimentando autofosforilación y produciendo el reclutamiento de efectores río abajo, incluyendo vías de señalización PI3-K, Ras-Raf- proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK; ERK 1/2), y proteína quinasas C (PKC), entre otras (Hackel P. y col. 1999, Sweeney C. y col. 2001). Todas estas vías están involucradas en la regulación de la proliferación celular mediada por EGFR, la secreción de proteasas, y la migración celular (Genersch E. y col. 1998, Kondapaka S. y col. 1997) (Fig. 2).

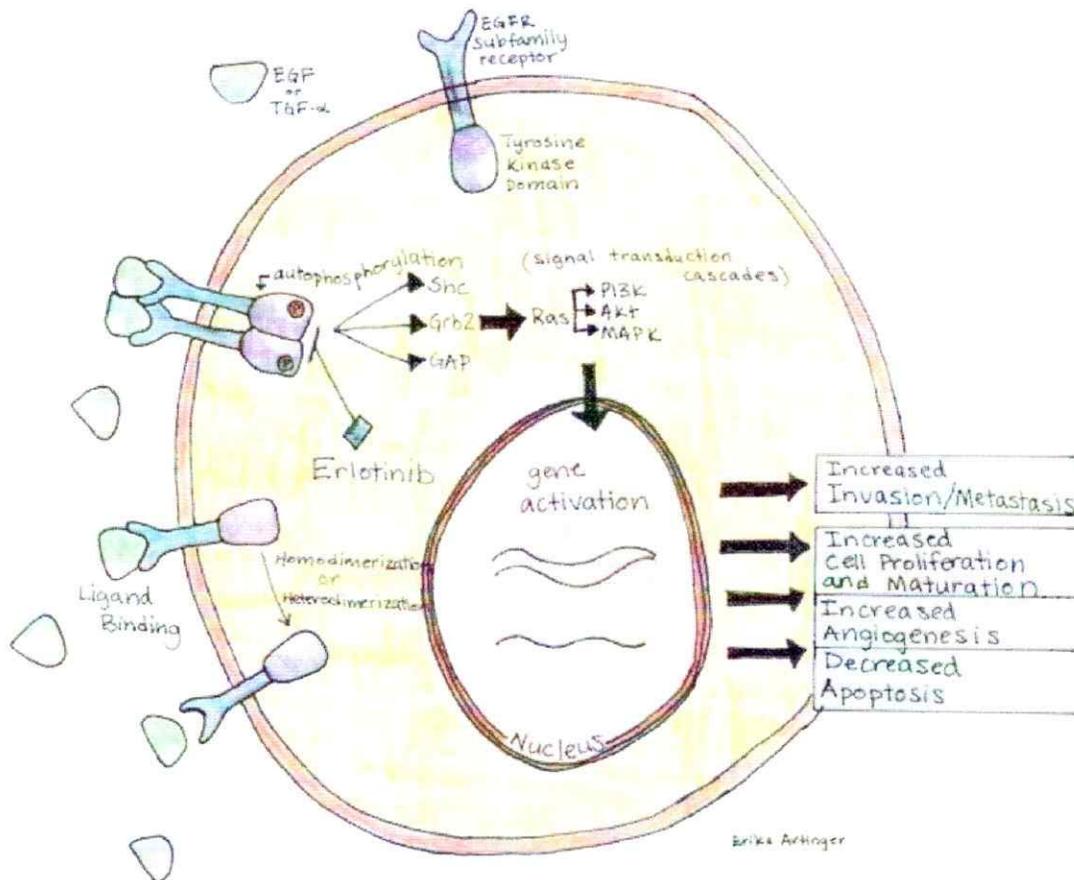


Figura 2. Organización y función de EGFR-Raf-Ras-MAPK.

La proliferación celular maligna de mama es atribuible en parte a la actividad aberrante de las vías de transducción de señales que promueven el crecimiento. Las PKC son isoformas de la familia serina/treonina kinasa con amplia distribución tisular y que participan en diversas vías de transducción de señales, regulan importantes procesos celulares como proliferación, diferenciación, y apoptosis. La sobre-expresión y el aumento en la actividad de PKC ha sido sujeta a estudios comparativos de cáncer de mama humano (O'Brian C. y col. 1989, Gordge P. y col. 1996). Un mecanismo por el cual PKCs influye en la regulación es a nivel de la transición G1/S modulando los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Se ha demostrado que PKC δ regula las transiciones G1/S y G2/M (Black J. y col. 2000, Gavrielides M. y col. 2004), sugiriendo un alto nivel de complejidad en la regulación de eventos río abajo de ésta. La sobre-expresión de PKC δ ha sido asociada con inhibición de la proliferación, arresto del ciclo celular, aumento de la diferenciación, y apoptosis acelerada en varias líneas celulares. (Mischak H. y col. 1993, Harrington E. y col. 1997, Savickiene J. y col. 1999).

El objetivo central de esta tesis fue estudiar los mecanismos mediante los cuales el ciclopéptido ejerce su acción antiproliferativa en células tumorales estrógeno-dependiente en cultivo. Para ello se usó la línea celular MCF7 como modelo de célula tumoral mamaria. También fue parte de esta tesis evaluar el rol que juega el receptor de alfafetoproteína (AFPR) en la acción antiproliferativa del cP. Este receptor tiene afinidad compartida por su ligando AFP y para albúmina. Dado que seroalbúmina es uno de los factores presentes en mayor proporción en el suero, se procedió a adaptar las condiciones de cultivo para MCF7, utilizando medios de cultivo libres de suero. Como no se observó participación de AFPR en la acción antiproliferativa de cP, se analizaron vías alternativas de acción, en especial la vía de señalización de HER2 (EGFR2), que está íntimamente relacionada con la cascada de señalización de MAPK y además involucra la vía de señalización de PKC. Pusimos especial énfasis en PKC δ , la que es capaz de causar un arresto del ciclo celular, necesario para manifestar la acción antiproliferativa de cP sobre células tumorales mamarias MCF7.

HIPÓTESIS

Basándose en la información presentada, se postula que:

En células estrógeno-dependientes, un ciclopéptido que posee actividad anti-oncótica, actuaría mediante unión a un receptor de membrana, desencadenando una cascada intracelular de señales que interrumpen la proliferación celular y por lo tanto el crecimiento de tumores mamarios estrógeno-sensitivos, similares a los xenoimplantados en animales con inmunodeficiencia.

OBJETIVO CENTRAL

Empleando cultivos de células MCF7, lograr dilucidar la ruta inicial empleada por el ciclopéptido en su acción antiproliferativa, de manera que a mediano plazo este compuesto pueda ser aplicado en estudios pre-clínicos.

OBJETIVOS ADICIONALES

Analizar el posible rol que juega el receptor de alfafetoproteína (AFPR) en la acción antiproliferativa o antimitogénica de cP sobre células MCF7 en cultivo.

Debido a que AFPR tiene afinidades tanto por su ligando AFP como por albúmina y dado que seroalbúmina es un factor presente en alta proporción en el suero, se deberá reformular las condiciones de cultivos para MCF7, utilizando medios de cultivo libres de suero.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Anticuerpos

Anti-AFPR, ratón IgG 2A, Abcam, ab 8276-100

Anti-AFP, ratón IgG 1-kappa, Zymer Laboratories, 18-0003

Anti-HER2 (Neu 9G6) de ratón, Santa Cruz Biotechnology, SC-08

Anti-MAPK (p44,p42) de conejo, USBiological, C5120155

Anti-PKC δ de ratón, Transduction Laboratories, P36520.

Anti-IgG de ratón, molécula completa, conjugado a FITC, Santa Cruz Biotechnology, SC-2010

Anti-IgG de conejo, conjugado con Cy2, Jackson Laboratories, 111-225-144.

2. Factores y Hormonas

Albúmina de suero de bovino (pH 7.0), Winkler BM-0150

Estreptomina, Laboratorio Bestpharma 20001105

Factor de crecimiento epidermal recombinante, Sigma E-4127

Insulina, Transferrina, Selenio (ITS), Gibco 41400-045

Penicilina G. Sódica, Laboratorio Chile 22866

Suero Fetal Bovino (SF), Gibco BRL 1600-044

4. Medios

Dulbeco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)/ Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma-Aldrich D2906

Minimum Essential Medium Eagle (MEM-E), Sigma M-3024

5. Enzimas

Tripsina de páncreas de bovino 1:250 (EC 3.4.21.4), Sigma T-0646

6. Tampones biológicos

PBS: 15mM KH₂PO₄, 81mM Na₂HPO₄, 1,4M NaCl, 27mM KCL, pH 7,4.

TBS: 0,14M NaCl, 2,68mM KCL, 25mM Tris base, pH 8.

7. Reactivos Químicos

Acetato de uranilo

Acetona p. a., Merck, 100014

Ácido clorhídrico fumante 37% p. a., Merck 113386

Acrilamida, Sigma A-9099

Azul de bromofenol, USB, US12370

Bis-benzimida (Hoechst 33342) Trihydrochloride, Sigma B-2261

Citrato de plomo, Eastman 11534

Cloruro de Sodio (NaCl), Merck 101540

Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma D-5879

3,3' diaminobenzidina, Sigma D-5905

Etanol absoluto, p. a. Merck 1.00983

Formaldehído 37%, Merck 6404

Glicina, Sigma G-7126

Glutaraldehído, 25% Sigma G-5882

Hidróxido de Potasio (KOH), Merck 105021

Hidróxido de Sodio (NaOH), p. a., 106495

L-glutamina, Sigma G-3126

LR-Gold, London Resin Company Ltd 14371

Marcadores de P.M. de proteínas preteñidos, Amersham RPN800

Medio de Montaje acuoso con agente anti-fading, Biomeda, M01

Metanol, TCL

Negativos Kodak 4489

Peróxido de benzoilo, Sigma B-5907

Paraformaldehído, Merck 104005

Piruvato, sal de sodio, Sigma P-2256

ProteoExtract (Subcellular Proteome Extraction Kit), Calbiochem 539790

Tris (Trizma), Sigma T-1503

Western Lightning chemiluminescence, kit de detección. Perkin Elmer, NEL103

8. Otros:

HAES, poli-hidroxi-etil almidón 6%, Fresenius Kabi Deutschland GmbH.

Insertos bicamerales Transwell, Costar MC 3460

PDVF, membranas para inmunoblots, BioRad, Cat. 162-0176

1. Cultivos Celulares**1.1 Tipo celular****MCF-7**

Es una línea celular de cáncer de mama que mantiene las características del epitelio diferenciado original incluyendo su capacidad de unir estradiol a través de receptores intracelulares de estrógeno (Brooks y cols 1973) (Levenson y Jordan 1997).

Reaccionan en inmunocitoquímica e inmunohistoquímica con anticuerpos de citoqueratina (CK) 17, 18 y 19, mucina y el antígeno específico de superficie (ESA).

Fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC).

1.2. Condiciones de cultivo.

El medio de cultivo utilizado para cada tipo celular es indicado en la tabla 1. Las células son sembradas a densidades variables (aprox. 7000 células/cm²), como se indica en cada caso y según el experimento realizado.

El medio de cultivo se cambia cada 3 días, previo lavado con PBS. Las células son cultivadas en incubador a 37°C, con atmósfera controlada conteniendo 5% de CO₂.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo.

Tipo Celular	Medio base	% y origen de Suero	Otros suplementos*	Características generales de las células
MCF-7	D-MEM F12 Ham	10% suero fetal bovino (SF) Sigma	HAES 3% ITS	Forma redonda fibroblastoide, crecimiento aislado y en clusters. ~40 µm de diámetro
MCF-7	MEM-E	10% suero fetal bovino (SF) Sigma	Piruvato 1mM, Glutamina 2mM	Forma redonda, crecimiento en clusters. ~40 µm de diámetro.

*Todos los medios son suplementados con penicilina y estreptomina 0,1% v/v

1.3. Subcultivo de células

Para subcultivar células que han alcanzado niveles cercanos a confluencia, las células se liberan de la placa mediante un tratamiento suave (por 7 a 10 minutos a 37°C) con una solución de tripsina-EDTA en PBS (0.25% tripsina, 70mM EDTA). El efecto de tripsina-EDTA se bloquea por adición de dos volúmenes de medio de cultivo completo. Tras centrifugar a 500x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, el pellet se resuspende en el medio correspondiente y las células se siembran a las densidades indicadas en cada caso.

1.4. Recuento y viabilidad celular

El número de células se determina mediante recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer). Las células son teñidas con azul tripán, lo que permite reconocer células vivas (refringentes) de células muertas (teñidas de azul).

2.0 Curva de proliferación de células MCF7 en presencia de estímulos mitogénicos y cP.

Células MCF7 son sembradas en baja densidad (entre 6800 y 7900 células/cm²) usando D-MEM F12 Ham o MEM-E sin rojo fenol como medio de cultivo, con antibióticos, 10% SFB. Tras 96 horas, se determina el porcentaje de células adheridas, a través del conteo de células de un set de pozos (tiempo 0) y comparándose con el número inicial de células sembradas.

Las células sembradas en medio DMEM F12 se cambiaron a medio libre de suero bovino (pero con insulina, transferrina, selenio y 3% almidón polihidroxilado) 24h antes del tratamiento con HSA (0.5%), 5%SFB, 5%STT, E2 (2nM final), EGF (5ng/ml), TGF α (10ng/ml) en presencia o ausencia de cP (2 μ g/ml). Al final de los experimentos, las células fueron lavadas, tripsinizadas y contadas. La viabilidad superó siempre el 93% según azul tripán. Todos los resultados provienen de determinaciones en triplicado.

3.0 Extracción diferencial de proteínas

Células MCF7 son sembradas en alta densidad (aprox. 3200 células/cm²) usando D-MEM F12 Ham 10% SFB como medio de cultivo, con antibióticos. Tras 96h, las células son cambiadas a medio libre de SFB (con insulina, transferrina, selenio y 3% almidón polihidroxilado), y mantenidas 24h en esta condición. Antes de la extracción, las células son tratadas con D-MEM F12 Ham y por 5min con buffer de lavado del kit de extracción de proteínas Proteo Extract (S-PEK Kit) de Calbiochem a 4°C. Luego, las células se tratan a 4°C consecutivamente con los tampones de extracción I, II, III y IV por 10, 30, 10 y 10min respectivamente, recolectando los sobrenadantes en tubos rotulados para después congelarlos a -20°C. Los tampones de extracción I, II, III y IV, permiten extraer proteínas presentes en las fracciones citoplasmática, de membrana y organelos, nuclear, y de citoesqueleto respectivamente.

3.1 Precipitación de proteínas de extracción con detergentes mediante acetona.

Se agregaron 8 volúmenes de acetona deshidratada fría por volumen de las alícuotas provenientes de la extracción de fracciones celulares indicada arriba, precipitando las proteínas y otras macromoléculas a -20°C por 1h, posteriormente se centrifugó a 13.000 xg por 10min a temperatura ambiente. Luego de descartar los sobrenadantes y desecar los sedimentos (vacío), se disolvieron las muestras en volúmenes pequeños de tampón A (50nM Tris pH 7,4, sin SDS)

3.4. Dot blot

Diluciones de las muestras a estudiar (1µl de extracto diluido 2, 4, 8 y 16 veces con tampón A) se aplicaron sobre membranas de Nitrocelulosa (NC). Los sitios de unión en la membrana se bloquearon con leche descremada al 5% en buffer A por 15min a temperatura ambiente, luego se incubó por 1h con anticuerpo primario anti-AFPR (1:300) diluido en solución de bloqueo. Luego de lavar exhaustivamente con

buffer A e incubar por 1h con anticuerpo secundario (Ig-G anti conejo) marcado con peroxidasa (POX) a dilución 1:2000, las membranas se lavan copiosamente con buffer A para finalmente agregar el sustrato de POX (solución de 3,3' diaminobenzidina en TBS y H₂O₂, filtrada), dejando desarrollar por 15min.

3.5. Expresión de AFPR por Western Blot

Los extractos provenientes de muestras de extracción diferencial de proteínas (procedimiento de obtención descrito en la sección anterior) fueron tratados bajo condiciones no desnaturalantes ni reductoras, para lo cual se utilizó un tampón simple (300mM Tris-HCl con 50% de glicerol y conteniendo como indicador azul de bromofenol al 0.004%). Se aplicaron 40µl de volumen de muestra por carril en un gel de poliacrilamida al 10%, efectuando la separación electroforética a temperatura ambiente, aplicando una corriente constante de 30mA, empleando el tampón simple sin indicador como tampón de corrida. La transferencia electroforética a una membrana de PDVF se efectuó a 4°C, empleando una cámara de transferencia con tampón 50mM Tris, 190mM glicina, 20% metanol, durante toda la noche y aplicando un potencial de 30V. Luego de bloquear con una solución TBS (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl) conteniendo 5% de leche descremada por una hora a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con TBS (10min cada vez) e incubó con anticuerpo primario (anti-AFPR, 1:1000) durante toda la noche a 4°C. Al continuación se lavó 3 veces con TBS (10min cada vez), se incubó con anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, conjugado a peroxidasa), lavando nuevamente con TBS. Finalmente la membrana fue revelada usando un kit de quimioluminiscencia ECL y, exponiendo a película fotográfica por 5 a 15min.

4. Inmunofluorescencia

Células MCF7 fueron sembradas en baja densidad (4200 a 5200 células/cm² aprox.) sobre cubreobjetos usando D-MEM F12 Ham 10% SFB, con antibióticos. Tras 96h de proliferación, las células fueron transferidas a medio libre de suero, conteniendo

insulina, transferrina, selenio y 3% almidón polihidroxilado. Después de 24h en estas condiciones, las células fueron estimuladas con EGF (5ng/ml) en presencia o ausencia de cP empleando exposición continua a EGF o bien pulsos de éste de corta duración (5min). A continuación las células se lavan con medio fresco (MEM F12 Ham) y fijan por 20min usando metanol absoluto a -20°C. Previo a la inmunofluorescencia indirecta, las células son lavadas con PBS (2 veces, 5min) y son bloqueadas con BPBS. Luego de incubar con anticuerpo primario por 1h a temperatura ambiente (RT) y lavar con BPBS (3 veces), se incubó con anticuerpo secundario marcado con FITC (o Cy2) por 1h a RT. Luego de lavar con BPBS (3 veces), se tiñeron los núcleos con bis-benzimida (Hoechst 33248, 1µg/ml, 1min de incubación), para finalmente montar sobre portaobjetos utilizando medio de montaje antifading (Biomeda Crystal). Las muestras son observadas bajo microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskop, utilizando parámetros fijos de la cámara ccd e iluminación y manteniendo idénticos parámetros de impresión para las imágenes presentadas.

5. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

(Por razones de fuerza mayor se paralizó el trabajo con el microscopio electrónico del INTA a partir de Julio del 2006 y hasta la fecha, se describen algunos aspectos técnicos para apoyar las imágenes que se presentan más adelante con el fin de avalar ideas en este documento y que fueran obtenidas por el tutor en el primer semestre).

Para la obtención de material a analizar en el microscopio electrónico de transmisión (MET), fue necesario fijar e incluir las muestras celulares en resinas acrílicas, para permitir obtener, incubar y teñir cortes ultradelgados, a inspeccionar y fotografiar.

Cultivos de células MCF-7 se crecen sobre Transwell a razón de 10000 céls/unidad, empleando medio con 10% SFB, dejando incubar por 96h, luego se cambia a medio STT por 24h, transcurrido ese tiempo las células son estimuladas con 2µg/ml cP por 5, 10min y 24h. Transcurridos los tiempos de incubación, los transwell se lavan 2 veces con PBS. Se fijan con 4% paraformaldehído depolimerizado, (conteniendo 0.5% glutaraldehído en PBS, pH 7.5) por 30min a temperatura ambiente y

luego se lavan 3 veces con PBS. Los transwell son deshidratados en etanol (alcohol en PBS al 10, 30, 50 y 70%; 20min en cada mezcla) y finalmente se pasa a ETOH/LR-Gold (2:1;1:1;1:2) y LR-Gold puro por 20min, y por último, se incluye en cápsulas de gelatina conteniendo LR Gold con peróxido de benzoilo (0,8%) y se deja polimerizar en frío, bajo vacío ligero. Los bloques se dejan curar durante 1-2 días a temperatura ambiente (TA) antes de cortar con un ultramicrotomo. Los cortes (70-90nm) se reciben en grillas de oro cubiertas con piroformo y se incuban de inmediato, las grillas se flotan con el lado de los cortes hacia abajo sobre gotas de 0.1M glicina en PBS (150mM NaCl, 10mm fosfato, pH 7.6) seguido por una incubación de bloqueo con 1% ovo-albúmina en PBS (15min a TA cada uno). Las grillas se transfieren a la solución del anticuerpo anti-AFPR (en 1% ovo-albúmina/PBS) en la que se incuban por 2h a TA. Luego de varios lavados con PBS, las grillas se colocan sobre gotas de anticuerpo secundario marcado con oro coloidal y diluido con ovo-albúmina/PBS y se incuban por 30min a TA. Después de lavados exhaustivos con tampón y con agua, los cortes se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Observación y Fotografiado en TEM

Las muestras fueron inspeccionadas en un Microscopio electrónico de transmisión Phillips CEM 100 trabajando a 60 u 80 kV de aceleración.

Las fotografías se obtuvieron a partir de negativos Kodak 4489 expuestos en forma automática en el microscopio, los negativos son revelados y copiados siguiendo procedimientos habituales para fotografía en blanco y negro.

RESULTADOS

1. Análisis de efecto antiproliferativo de cP sobre cultivos de células MCF7 en presencia de suero.

El objetivo central de estos experimentos fue evaluar el efecto inhibitorio de cP sobre la proliferación de células MCF7 cultivadas en un medio con suero y estimuladas con factores mitogénicos.

1.1. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con STT, estimuladas con EGF y/o E2.

En medio conteniendo 5% STT, se observa que cP provoca una disminución en la proliferación de las células MCF7 estimuladas con E2. Esta inhibición alcanza valores de 67%, 44 % a las 48h y 72h de acción, respectivamente. Esta disminución provocada por la presencia de cP en la proliferación celular estimulada por estradiol es altamente significativa (Figura 3 y Tabla 2).

También en presencia de 5% STT, cP provoca una disminución en la proliferación de las células MCF7 estimuladas con EGF. La inhibición alcanza valores de 35% y 39% a las 48 y 72h respectivamente (Figura 4 y Tabla 3).

Así, estos dos factores de naturaleza dispar estimulan la proliferación de células MCF7, presentándose un estímulo comparativamente mayor por parte de E2 que de EGF; en ambas condiciones cP tiene la capacidad de inhibir significativamente la proliferación celular estimuladas por ellos.

Tabla 2. Inhibición de la proliferación de células MCF7 por presencia de cP, cultivadas en medio con SFB y estimuladas con E2.

tiempo	Estímulo		%Inhibición	(*)p<
	E2	E2cP		
48h (n)	24533 ± 500	8033 ± 2500	67.3	0,005
72h (n)	44700 ± 1607	25200± 2309	43.6	0,001

Valores de inhibición de la proliferación de células MCF7 obtenidos en la presencia de cP poseen significancia estadística, utilizando el método de ANOVA.

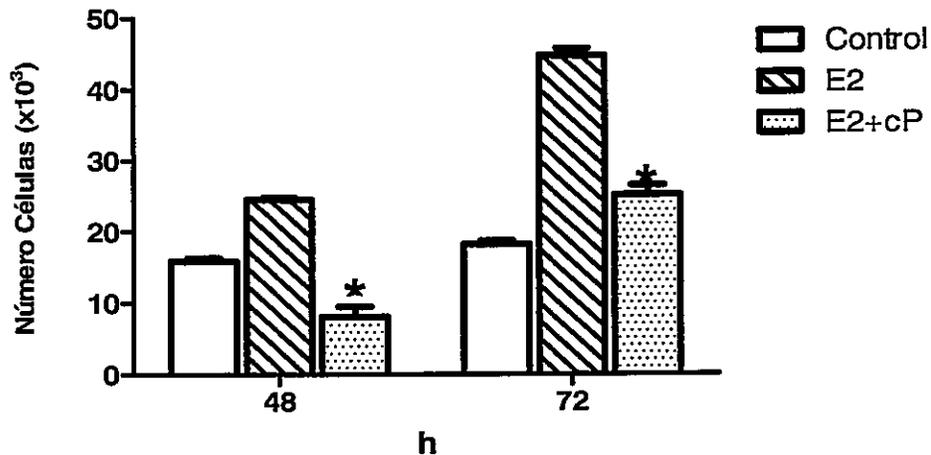


Figura 3. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con STT, estimuladas con E2, en presencia o ausencia de cP.

Se sembraron 7900 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de la estimulación con E2 y cP, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el número de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular (t=0; Input: 15967 +/- 551).

Tabla 3. Inhibición de la proliferación de células MCF7 por presencia de cP en medio con SFB y estimuladas con EGF.

Tiempo	Estímulo		%Inhibición	(*)p<
	EGF	EGFcP		
48h (n)	16533± 1803	10700± 1607	35.3	0,005
72h (n)	30533± 2179	18533± 1322	39.3	0,001

Valores de inhibición de la proliferación de células MCF7 obtenidos en la presencia de cP poseen significancia estadística, utilizando el método de ANOVA.

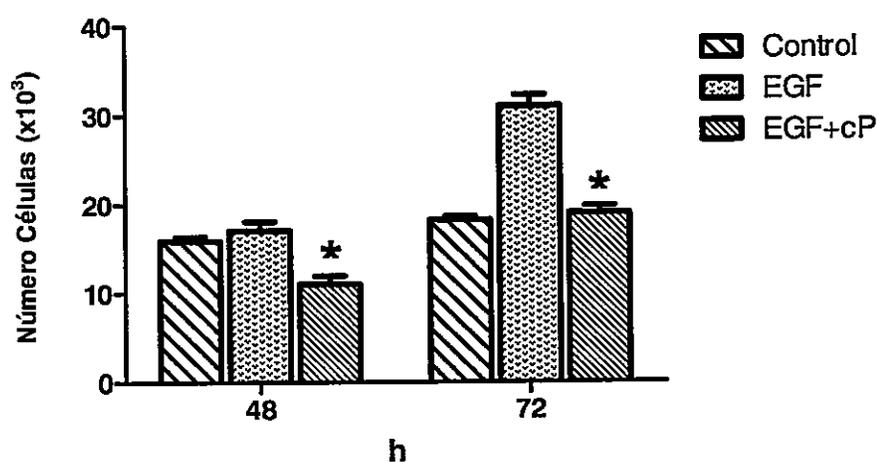


Figura 4. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con STT, estimuladas con E2, en presencia o ausencia de cP.

Se sembraron 7900 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de la estimulación con EGF y cP, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el número de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular (t=0; Input: 15967 +/- 551).

2. Efecto inhibitorio de cP sobre la proliferación de células MCF7 en ausencia de suero.

Los siguientes experimentos tienen como objeto establecer un sistema de cultivo con un sucedáneo de suero (HAES 3%= almidón polihidroxilado al 3%), para evaluar el efecto antiproliferativo de cP sobre células MCF7, estimuladas con factores mitogénicos en forma más controlada.

2.1. Proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con EGF y/o E2.

En este experimento se comparó a tiempo fijo de 48h la proliferación de células estimuladas o no con E2 y/o EGF, con el objeto de analizar el comportamiento en medio libre de suero. Se observó que respecto de la condición sin estímulo (=100%) estradiol provoca un aumento del 62% en la proliferación, EGF uno de 106% y la combinación un aumento aditivo de aproximadamente 163% (Figura 5 y Tabla 4). O sea, en el medio diseñado, los agentes mitogénicos E2 y EGF funcionan adecuadamente.

Tabla 4. Proliferación de células MCF7 en un medio con sucedáneo de suero, estimuladas con EGF y/o E2.

	Estímulo			
tiempo	Control	E2	EGF	E2 / EGF
48h (n)	22500+/-3500	36500± 2784	46333+/-4509	59167+/-2309

Valores celulares de la proliferación de cultivos MCF7 obtenidos en la presencia de E2 y/o EGF.

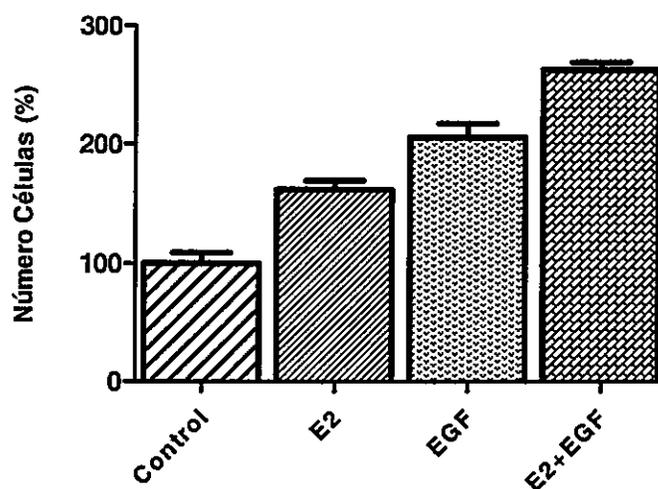


Figura 5. Curva de proliferación de MCF7 en un medio con sucedáneo de suero, estimuladas con EGF y/o E2.

Se sembraron 7900 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de la estimulación con EGF y/o E2, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el porcentaje de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular, el cual corresponde a 1 (t=0; Input: 22000 +/-2179).

2.2. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con E2.

En condiciones libres de suero, la presencia de 2ug/ml cP provoca un descenso en la proliferación de células MCF7 estimuladas con estradiol. La inhibición es altamente significativa y alcanza valores de 26,5% ($p < 0.005$) y 22,8% ($p < 0,001$) a las 48 y 72 h respectivamente (Figura 6 y tabla 5).

Los resultados demuestran que en este sistema libre de suero, las células mantienen la capacidad de proliferar por al menos 72h, lo que permite emplear esta condición de cultivo para determinar más acotadamente efectos mitogénicos y su inhibición.

Tabla 5. Inhibición de la proliferación de células MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero y estimuladas con E2.

Tiempo	Estímulo		%Inhibición	(*)p<
	E2	E2cP		
48h (n)	36500 ± 6171	26833 ± 1756	26.5	0,005
72h (n)	85000 ± 2000	74166 ± 2363	22.8	0,001

Valores de inhibición de la proliferación de células MCF7 obtenidos en la presencia de cP en medio sucedáneo de suero, poseen significancia estadística, utilizando el método de ANOVA.

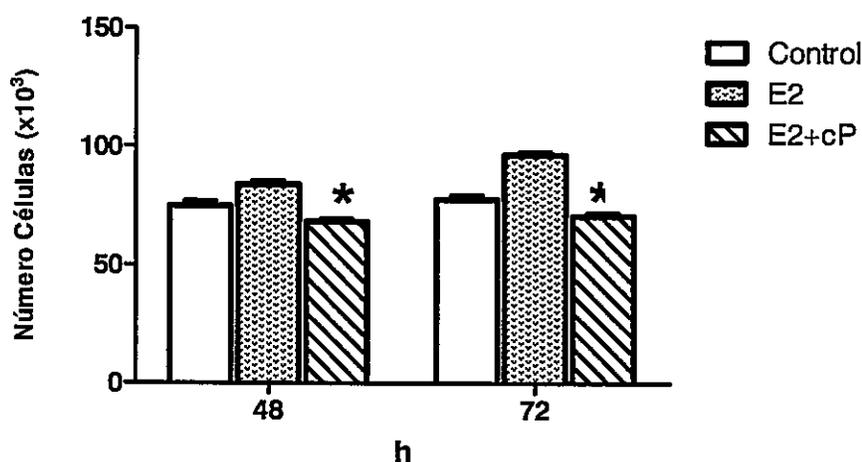


Figura 6. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con E2 en presencia o ausencia de cP.

Se sembraron 7900 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de cambiar a medio con sucedáneo de suero por 24h, luego se estimula con E2 y cP, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el número de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular (t=0; Input: 43333.3 +/- 1041).

3. Efectos de la presencia de HSA en la acción antiproliferativa de cP sobre células MCF7 cultivadas en medio libre de suero.

El siguiente grupo de experimentos tiene por objeto analizar el efecto de HSA sobre la acción cP, en un sistema con sucedáneo de suero, para evaluar el efecto de ésta última a nivel de la proliferación de células MCF7 estimuladas con factores mitogénicos.

3.1. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo, estimuladas con E2 en presencia o ausencia de HSA.

Estos experimentos se efectuaron con el propósito de determinar si cP mantiene su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular tras un estímulo con E2 en presencia o ausencia de HSA.

Se agregó HSA debido a la idea que su presencia alteraría la respuesta celular a cP, porque HSA y AFP pertenecen a una misma familia de proteínas con homología parcial y con afinidad hacia AFPR. En estos experimentos observamos que la presencia de HSA no sólo no afectó la respuesta celular a cP, sino que fue de ligero beneficio para las células al permitir alrededor de un 10% de incremento del número de células en las condiciones de estímulo y tiempos estudiados. Al aplicar cP se observó un similar y significativo efecto antiproliferativo en células estimuladas con E2 tanto en presencia como en ausencia de HSA ($p < 0,001$). (Figura 7 y tabla6).

En otras palabras, en condiciones libres de suero, la adición de HSA al 0,5% no causa alteraciones en la capacidad antiproliferativa de cP.

Tabla 6. Inhibición de la proliferación de células MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero con y sin HSA.

Tiempo	Estímulo				%Inhibición		(*)p<
	E2	E2/HSA	E2cP	E2cP/HSA	cP	cP/HSA	
48h	40666+/- 764	44000+/- 1527	30666+/- 2466	33166+/- 764	24.6	24.6	0,001
72h	51333+/- 1323	56133+/- 2566	39500+/- 2929	43583+/- 2466	23.1	23.5	0,001

(*) Para tanto cP como cP/HSA se obtuvieron niveles de significancia estadística <0,001

Valores de inhibición de la proliferación de células MCF7 obtenidos en la presencia de cP en medio sucedáneo de suero y HSA, poseen significancia estadística, utilizando el método de ANOVA.

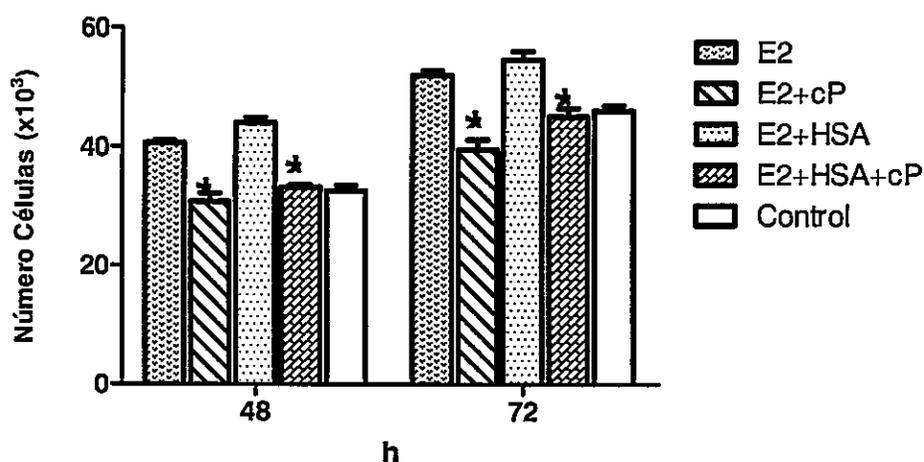


Figura 7. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero conteniendo HSA, estimuladas con E2 en presencia o ausencia de cP.

Se sembraron 6800 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de cambiar a medio con sucedáneo de suero por 24h, luego se estimula con HSA, E2 y cP, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el número de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular (t=0; Input: 16667 +/-1041).

3.2. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero y HSA, estimuladas con EGF.

Estos experimentos se efectuaron con el propósito de determinar si cP mantiene su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular frente al estímulo con 5ng/ml EGF en presencia de HSA.

La figura 8 y tabla 7 muestran que cP inhibe significativamente la proliferación de células MCF7 en medio sin suero pero con HAES y HSA. La magnitud de la inhibición en células estimuladas con EGF es de alrededor del 31% tanto a las 48 como a las 96h (32% y 31% de inhibición respectivamente; $p < 0,001$).

En otras palabras, cP es capaz de inhibir la proliferación celular, independientemente de la presencia de HSA, en células estimuladas con E2 o con EGF, esta capacidad inhibitoria no se ve alterada por la presencia de HSA en el medio libre de suero.

Tabla 7. Inhibición de la proliferación de células MCF7 por cP, cultivadas en medio sucedáneo de suero con HSA y estimuladas con EGF.

tiempo	Estímulo		%Inhibición	
	EGF/HSA	EGFcP/HSA	cP/HSA	(*)p<
48h	18000+/-1893	12334+/-2516	31.5	0,001
96h	37500+/-2021	25834+/-1443	31.3	0,001

Valores de inhibición de la proliferación de células MCF7 obtenidos en la presencia de cP en medio sucedáneo de suero y HSA, poseen significancia estadística, utilizando el método de ANOVA.

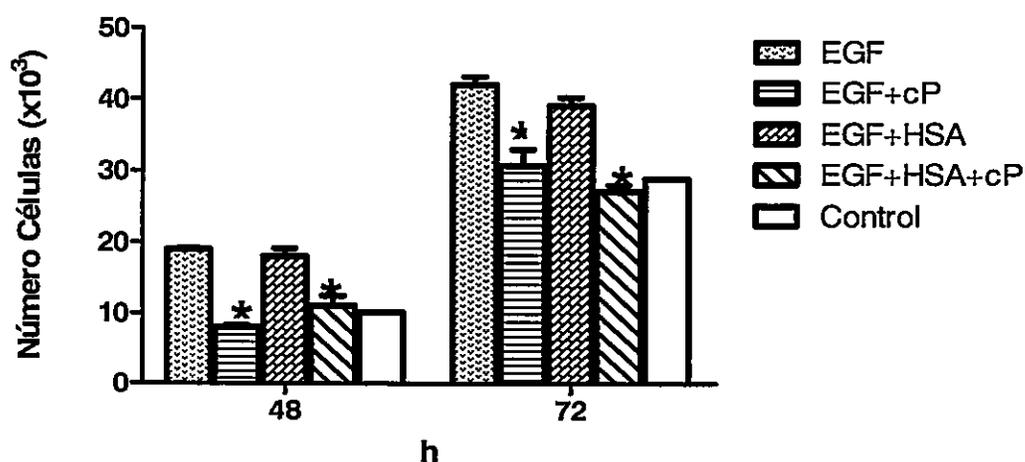


Figura 8. Curva de proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero y HSA, estimuladas con EGF en presencia o ausencia de cP.

Se sembraron 6800 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de cambiar a medio con sucedáneo de suero por 24h, luego se estimula con HSA, EGF y cP, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el número de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular (t=0; Input: 16333 +/- 2082).

4. Efectos de la adición posterior de STT sobre proliferación de células MCF7 en medio libre de suero.

Observaciones preliminares señalan que el cultivo prolongado de células en medio sin suero disminuyen su proliferación y pierden su adhesión a las placas, por ello se procedió a analizar el efecto de una adición "a posteriori" de STT.

4.1. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7, en medio con sucedáneo de suero con o sin HSA, estimuladas con E2 y su posible recuperación con STT.

El propósito de este experimento fue determinar si la adición de STT a células mantenidas en medio libre de suero por más de 96 horas tiene algún efecto sobre la proliferación frente al estímulo con E2 en presencia o ausencia de cP.

Se observó que pasados las 96 h de cultivo en medio libre de suero, hay una caída en la proliferación celular y despegamiento de las células. Asumiendo que esto se debe a la falta de factores de crecimiento no incluidos, se procedió a intentar remediar la situación por adición de STT. La adición tuvo el efecto esperado, es decir, se recuperó la proliferación y disminuyó el número de células no adheridas. Cabe mencionar que cP mostró su efectividad en todas las condiciones estudiadas, mostrando efectos inhibitorios significativos que oscilaron entre 22 y 50% (Figura 9 y Tabla 8).

En otras palabras, la adición de STT permite recuperar la viabilidad y capacidad de proliferar frente al estímulo de E2. La presencia de cP disminuye eficiente y significativamente la proliferación celular en estas condiciones.

Tabla 8. Acción inhibitoria de cP sobre la proliferación de células MCF7, cultivadas en medio con sucedáneo de suero y recuperación celular con STT.

tiempo	Estímulo				%Inhibición		(*) p<
	E2/HSA	E2cP/HSA	E2/5%STT	E2cP/5%STT	E2cP/HSA	E2cP/STT	
48h	37417+/- 354	24500+/- 1528			35.5		0,001
96h	51916+/- 1767	32417+/- 354			35.4		0,001
120h	44417+/- 1061	28166+/- 21213	56917+/- 1061	44334+/-1756	39.6	22.1	0,001
144	61500+/- 2255	30917+/- 5303	73334+/-764	38417+/-1061	49.8	47.6	0,001

(*) Para E2cP/HSA y E2cP/STT se obtuvieron niveles de significancia estadística <0,001

Valores de inhibición de la proliferación de células MCF7 obtenidos en la presencia de cP en medio sucedáneo de suero, poseen significancia estadística, utilizando el método de ANOVA.

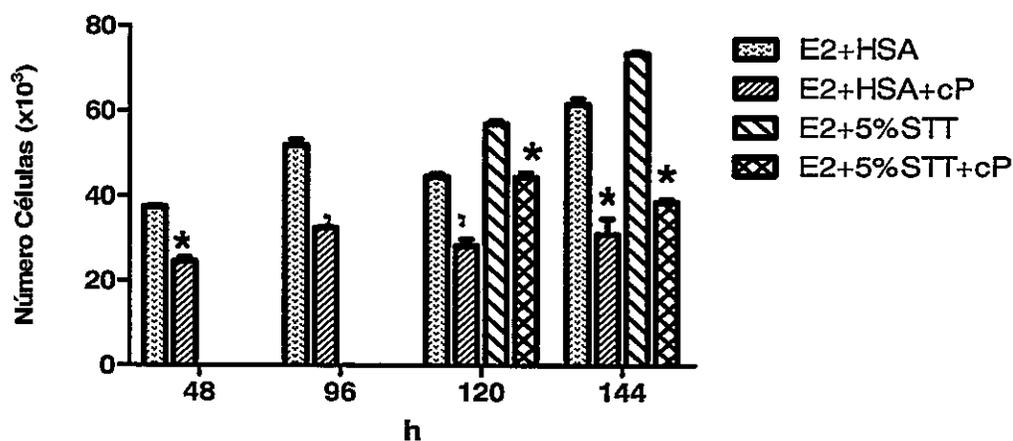


Figura 9. Curva de proliferación en medio con sucedáneo de suero, con o sin HSA, de células MCF7 estimuladas con E2 en presencia o ausencia de cP y su posible recuperación con STT.

Se sembraron 6800 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de cambiar a medio con sucedáneo de suero por 24h, luego se estimula con HSA, E2, 5%STT y cP, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el número de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular (t=0; Input: 18833 +/- 2021).

5. Análisis del rol de AFPR en la acción antiproliferativa de cP sobre proliferación de cultivos celulares MCF7 libres de suero.

Con el objeto de determinar si AFPR juega algún papel en la acción de cP, se hicieron estudios del comportamiento de este receptor frente al péptido, analizando curvas de proliferación en presencia de una fuente de AFP, análisis de inmunofluorescencia de AFPR, dot blots, Western blots e inmuno microscopia.

5.1. Efecto de SFB y STT sobre la acción antiproliferativa de cP en células MCF7 crecidas en medio libre de suero y estimuladas con E2.

En un intento por definir unión de cP a AFPR, se analizó la proliferación de células MCF7 estimuladas en cultivo con E2 en presencia o ausencia de cP y en medio con un sucedáneo de suero al que se le agregó STT o SFB. Debido a que SFB contiene elevados niveles de AFP, cualquier disminución en el grado de inhibición por cP de la proliferación celular por presencia de SFB nos indicaría que AFPR es necesario para la acción antiproliferativa de cP.

Figura 10 y tabla 9 muestran que en medio sin suero, cP es capaz de inhibir la proliferación de células estimuladas con E2 en un 32.4% a las 48h y en 43.1% a las 72h. En presencia de SFB y E2, cP alcanza un máximo de inhibición de 60.3% a las 48h, y de un 30.8% a las 72h. En presencia de STT, cP ejerce su mayor actividad a las 72h (61.3% de inhibición), en tanto que a las 48h, esta inhibición alcanza un 53.2%. Se observa un menor grado de estímulo con estradiol por efecto de STT en comparación a SFB, probablemente debido a algunos factores presentes más abundantemente en SFB (Figura 9).

En otras palabras, cP inhibe la proliferación celular inducida por estradiol en presencia de SFB o de STT. Esto nos aporta un primer indicio de que AFPR no participa en la acción antiproliferativa de cP.

Tabla 9. Inhibición de la proliferación de células MCF7 por cP, cultivadas en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con SFB, STT y/o E2.

tiempo	Estímulo						%Inhibición					
	E2	E2cP	5%SFB /E2	5%SFB /E2/cP	5%STT /E2	5%STT/E2/ cP	cPE2	(*)p<	cPSFB	(*)p<	cPSTT	(*)p<
48h	28833 +/-6364	17833 +/-1414	31083+ /-4596	12333+ /-3536	14083+ /-1061	6833+/- 1414	32.4	0,01	60.3	0,005	53.2	0,001
72h	30083 +/-1061	17333 +/-707	71333+ /-2828	48033+ /-1767	33333+ /-707	22333+/- 866	43.1	0,01	30.8	0,001	61.3	0,001

Valores de inhibición de la proliferación de células MCF7 obtenidos en la presencia de cP en medio sucedáneo de suero, poseen significancia estadística, utilizando el método de ANOVA.

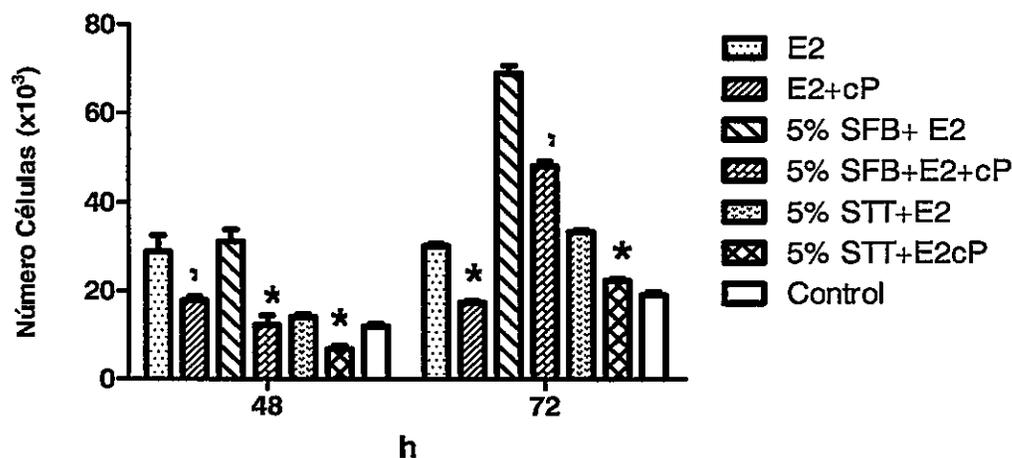


Figura 10. Curva de proliferación de células MCF7, en presencia de E2 con o sin cP en medio libre de suero y estimuladas con SFB y STT.

Se sembraron 6800 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de cambiar a medio con sucedáneo de suero por 24h, luego se estimula con SFB, E2, STT y cP, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el incremento de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular (t=0; Input: 17167+/- 1041).

5.2. Efecto de cP sobre la proliferación de células MCF7 en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con SFB y adición de suero anti-AFP.

Para analizar la capacidad de cP de inhibir en presencia de suero anti-AFP, se hicieron estudios de proliferación de células MCF7 a un solo tiempo (48h) en medio con un sucedáneo de suero al que se le agregó SFB y un anti-suero de conejo dirigido contra AFP.

En presencia de cP, se obtuvo una disminución en la proliferación celular de aproximadamente 21% en presencia de 5% SFB, suero control de conejo y E2. En presencia de 5% SFB, suero anti-AFP y E2 se obtuvo idéntica disminución en el número de células. En otras palabras, los dos sueros utilizados no afectaron la actividad inhibitoria de la proliferación ejercida por cP (Figura 11 y tabla 10).

La diferencia en valores absolutos de número de células en presencia del suero anti AFP y control de conejo puede deberse a la existencia de algún inhibidor en el suero de conejo de más reciente fecha (anti-AFP). Los resultados apoyan la idea que cP no requiere unirse a AFPR para actuar.

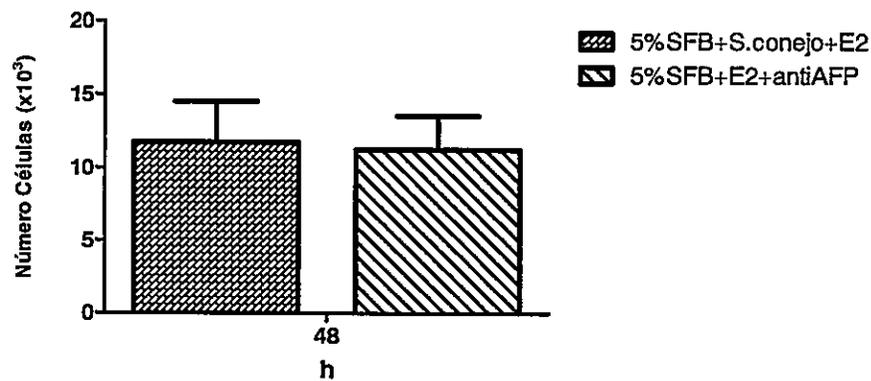
Tabla 10. Inhibición de la proliferación de células MCF7 por cP, cultivadas en medio sucedáneo de suero, en presencia de SFB, S.conejo con/sin E2 y adición suero anti-AFP.

Tiempo	Estímulo				%Inhibición		(*)p<
	SFB/S.co /E2	SFB/S.co / E2/cP	SFB/anti-AFP/ E2	SFB/anti-AFP/ E2/cP	SFB/S.co/E2/cP	SFB/anti-AFP/E2/cP	
48h	48250+/- 4596	36500+/- 500	36833+/- 1756	26833+/-1607	24.4	27	0,001

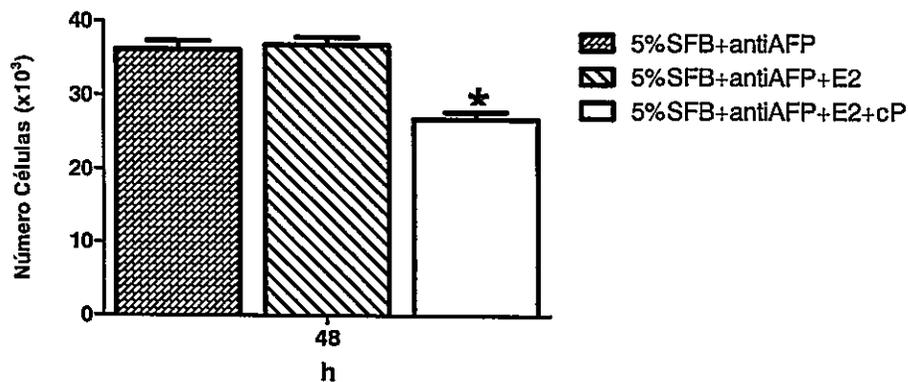
(*) Para (SFB/ S.co/E2/cP) y (SFB/anti-AFP/E2/cP) se obtuvieron niveles de significancia estadística <0,001

Valores de inhibición de la proliferación de células MCF7 obtenidos en la presencia de cP en medio sucedáneo de suero, poseen significancia estadística, utilizando el método de ANOVA.

a)



b)



c)

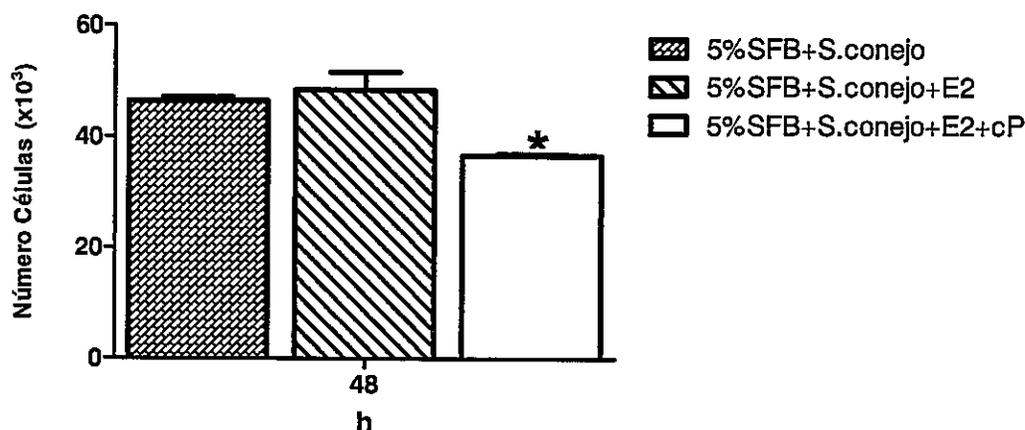


Figura 11. Curva de proliferación de células MCF7 en presencia o ausencia de cP en medio con sucedáneo de suero, estimuladas con SFB y con adición de suero antiAFP.

- a) Eficiencia de proliferación de MCF7 en distintos tipos de suero
- b) Eficiencia de inhibición de proliferación de MCF7 por cP en distintos tipos de suero (SFB y suero conejo de antiAFP), estimuladas con E2.
- c) Eficiencia de inhibición de proliferación de MCF7 por cP en distintos tipos de suero (SFB y suero conejo) estimuladas con E2.

Se sembraron 6800 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de que pasen a medio con sucedáneo de suero por 24h, luego se estimula con SFB, E2, S. conejo, antiAFP y cP, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el incremento de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular (t=0; Input: 35333+/- 3512).

5.3. Determinación de la presencia y distribución de AFPR en extractos de proteínas de células MCF7 mediante dot blot.

Para determinar la presencia y distribución de AFPR en compartimentos celulares de MCF7 y su alteración por exposición a cP, se procedió a realizar análisis de dot blot en muestras provenientes de una extracción diferencial de proteínas celulares, correspondientes a las presentes en la fracciones citoplasmática (I), de membrana y organelos (II), y nuclear (III).

Este experimento piloto de dot blot fue realizado utilizando muestras de proteínas provenientes de fracción membrana citoplasmática y organelos (BII) de células controles, para investigar la presencia de AFPR. En esta fracción se detectó presencia de AFPR en distintas diluciones realizadas de la muestra. Con esto se demostró que AFPR está presente entre las proteínas de membrana. Debido a variabilidades con el procedimiento de dot blot, procedimos a intentar la detección de AFPR mediante Western blot en condiciones no desnaturalantes, debido a que el anticuerpo disponible está dirigido contra la forma nativa del receptor (Resultados no mostrados).

5.4. Inmuno Blot

Estos experimentos se realizaron para determinar y cuantificar la presencia de AFPR en distintas fracciones celulares y además obtener evidencia sobre un rol del receptor en la acción antiproliferativa de cP.

Dado que el anticuerpo es muy específico para la forma nativa del receptor de AFP, la electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturalantes, es decir sin SDS ni β -mercaptoetanol. A pesar de todas las precauciones tomadas para evitar desnaturalación del receptor, no se logró obtener resultados satisfactorios, o sea no se observó ninguna banda correspondiente a AFPR; tal vez el proceso de electroforesis o transferencia a membrana de nitrocelulosa provocaron la desnaturalación de la forma nativa del receptor (Resultados no mostrados).

5.5. Tests de inmunofluorescencia para observar el efecto de cP sobre la expresión de AFPR en el tiempo.

Con el fin de obtener evidencia más directa de la participación de AFPR en la acción antiproliferativa de cP, se analizó su expresión por inmunofluorescencia indirecta. A ninguno de los tiempos estudiados tras adición de cP (5, 15, 20, 30 y 40min) se observan cambios en la inmunoreactividad de AFPR respecto a células control, no estimuladas (en la figura 12 se muestran los 3 primeros tiempos de estímulo). O sea, cP no ejercería acción sobre la expresión de AFPR a tiempos tempranos de estimulación. Esto es una evidencia adicional de que cP no une ni realiza su acción antiproliferativa a través de AFPR.

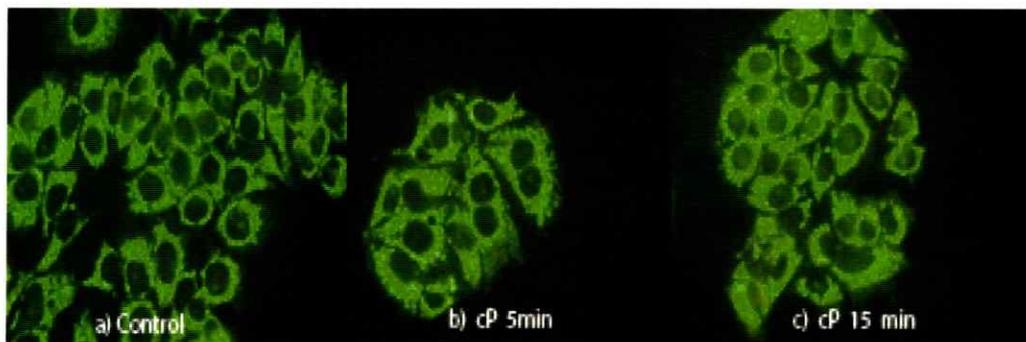


Figura 12. Inmunoreactividad de AFPR después de un estímulo con cP.

a) Células Control, sin estímulo. Células después de: b) 5min. c) 15min de agregado cP.

Observación de inmunofluorescencia dirigida contra AFPR en células MCF7, las cuales fueron sembradas en baja densidad (6800 céls/cm²) sobre cubreobjetos redondos, transcurridas 96h de incubación, se estimularon con cP por 5 y 15min, luego fueron incubadas con anticuerpo primario anti AFPR (1:50) y secundario anti IgG de ratón conjugado a FITC (1:250) como se indica en Materiales y Métodos.

5.6. Análisis por inmuno-microscopía electrónica de transmisión (MET) de cambios en la expresión y distribución de AFPR en células MCF7 estimuladas con cP.

Estos experimentos inconclusos fueron realizados por el tutor en el primer semestre de 2006 con el propósito de obtener una visión más certera del rol que juega AFPR en la acción antiproliferativa de cP.

Los datos disponibles de inmunomicroscopía electrónica de transmisión demuestran que la expresión de AFPR en MCF7 respecto de los controles no es alterada por la presencia de cP ni a los 5 y 10min ni a las 24h de estímulo. Los experimentos entregan información complementaria a los de inmunofluorescencia y las curvas de proliferación señaladas arriba, respecto de que AFPR no participa en la acción inhibitoria de la proliferación celular de cP. La figura 13 ilustra una distribución similar de partículas marcadas con oro en las condiciones con y sin cP.

Recopilando toda la información obtenida de los experimentos dirigidos hacia demostrar interacción de cP con AFPR, podemos concluir que cP parece no interactuar con este receptor para desencadenar su acción antiproliferativa de células MCF7.



Figura 13. Análisis por MET del efecto de cP sobre la expresión de AFPR en células MCF7.

Se observa marcaje con inmuno-oro del receptor de AFP en células MCF7, incubadas en presencia y ausencia de cP. Panel derecho: cP; panel izquierdo: no cP.

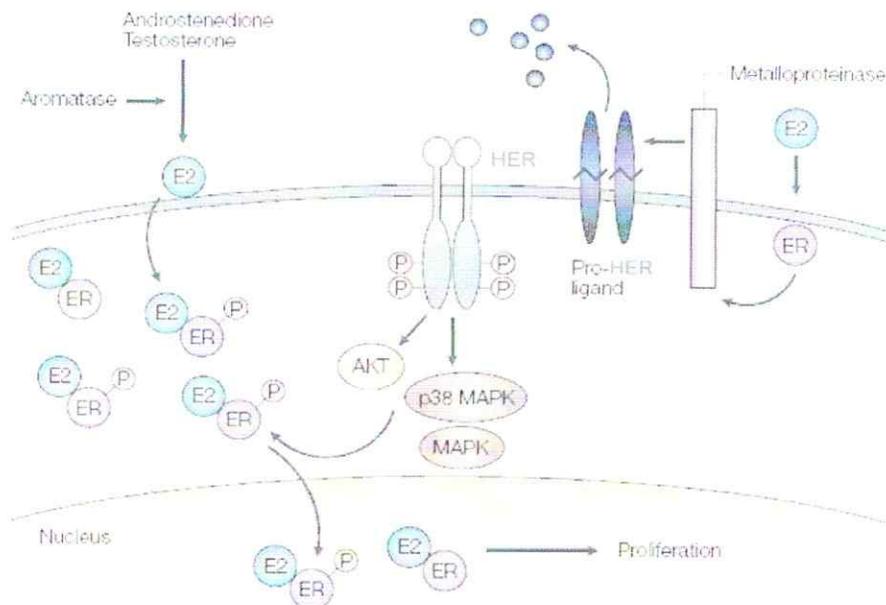
Células MCF7 son cultivadas sobre la membrana de transwells como se indica en Materiales y Métodos. Las muestras son inspeccionadas con microscopio electrónico de transmisión (Phillips CM100, operado a 60/80kV).

6. Análisis de una vía alternativa a AFPR para la acción antiproliferativa de cP en cultivos celulares MCF7 libres de suero.

Dado a que cP no parece interactuar con AFPR para desencadenar su acción antiproliferativa de células MCF7, se estudiaron vías alternativas relacionadas con la proliferación celular.

6.1. Efecto de cP sobre la proliferación de MCF7 en medio con sucedáneo de suero con o sin HSA, estimuladas con TGF α y/o E2.

Existen evidencias en la literatura acerca de un cross-talk entre E2 y EGF u otros factores de crecimiento que usan rutas similares (TGF α) a nivel de células tumorales mamarias (Aronica S.M. y col. 1994, Ignar-Trowbridge D. M. y col.1993). Por lo tanto se analizó la inhibición por cP de la proliferación de células estimuladas con E2, TGF α y combinaciones (Fig.14).



Hynes N.E. et al. Nature Rev Cancer 5,341-354 (2005).

Figura 14. Cross-talk entre vía de señalización de Estrógeno y EGF.

En la figura 15 se observa que a las 48h ocurre una proliferación celular similar cuando se estimula con E2 o TGFa y que al aplicar cP se obtiene efectos significativos de inhibición (59 y 50% respectivamente). La proliferación celular fue mayor al estimular con la combinación E2 y TGFa que con los mismos factores en forma independiente. A las 48h, en la condición E2+TGFa, cP presenta un efecto inhibitorio menor (36%) que cuando se estimuló con los factores TGFa y E2 por separado. A las 72h, se obtiene el mismo patrón de comportamiento para cada estímulo y la combinación, pero en este caso el efecto inhibitorio de cP fue menor (43,7% para estímulo E2, 25,9% para TGFa y 14,3% para E2+TGFa). Esto tal vez sea debido a que después de las 48h permanece una menor cantidad de cP en solución.

Los factores E2 y TGFa poseen similar efecto sobre la proliferación de células MCF7, su combinación provoca una mayor proliferación en comparación a la condición de estímulo individual con estos factores. cP es capaz de inhibir la proliferación (alcanzando niveles control) cuando se estimula con E2 y TGFa por separado, pero la capacidad disminuye cuando se combinan ambos factores.

Tabla 11. Inhibición de la proliferación de células MCF7 por cP, cultivadas en medio sucedáneo de suero con HSA, estimuladas con TGFa y/o E2.

tiempo	Estímulo						%Inhibición			(*)p<
	E2	E2cP	TGFa	TGFacP	E2TGFa	E2TGFacP	E2cP	TGFacP	E2TGFacP	
48h	21967 +/-1607	8967 +/-1892	2705 +/-2474	12633+/- 1040	32300+/- 866	20633+/- 1040	59.2	50.1	36.2	0,001
72h	34133 +/-3055	2163 +/-2362	34300 +/-1414	24550+/- 353	53550+/- 1607	44300+/- 1500	43.7	25.9	14.3	0,001

(*) Para E2cP, TGFacP y E2TGFacP se obtuvieron niveles de significancia estadística <0,001

Valores de inhibición de la proliferación de células MCF7 obtenidos en la presencia de cP en medio sucedáneo de suero con HSA, poseen significancia estadística, utilizando el método de ANOVA.

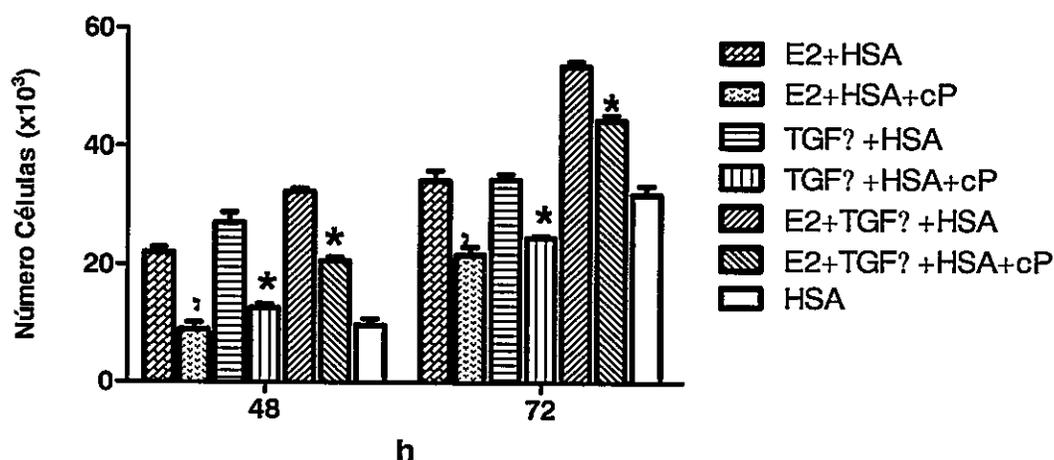


Figura 15. Curva de proliferación de MCF7 en medio con sucedáneo de suero con o sin HSA, estimuladas con TGFa y/o E2 en presencia o ausencia de cP.

Se sembraron 6800 céls/cm² en placa de 24 pozos, los cultivos se incubaron durante 3 días antes de cambiar a medio con sucedáneo de suero por 24h, luego se estimula con HSA, E2, TGFa y cP, según se indica en Materiales y Métodos.

Los valores graficados representan el número de nuevas células, descontado el valor inicial del número celular (t=0; Input: 22500 +/-2179.44947).

6.2. Test de inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal contra HER2 (EGFR2). Efecto de un estímulo constante de EGF en presencia y ausencia de cP.

Debido a la evidencia de una sobre expresión de HER2 en cáncer mamario agresivo (Hackel P. y col. 1999) pareció atractivo analizar la participación de este receptor en la acción inhibitoria de la proliferación celular por parte de cP, mediante inmunofluorescencia de HER2, utilizando un estímulo constante de su ligando EGF.

Un análisis visual en la figura16 muestra que tras 30min de estímulo constante de EGF habría un aumento en la inmunoreactividad de HER2, que alcanza mayor intensidad a las 24h de estímulo. En presencia de cP, tanto a los 30min como a las 24h se detecta la disminución de la inmunoreactividad de HER2. De acuerdo a diversas observaciones, la mayor acción inhibitoria de cP se observó a los 30min de acción. Efectos a nivel del otro receptor de EGF (EGFR1) no fue posible detectar por su baja expresión. A los tiempos estudiados, EGF aumentó la expresión citoplasmática de HER2, en tanto que la presencia de cP disminuyó dicha expresión.

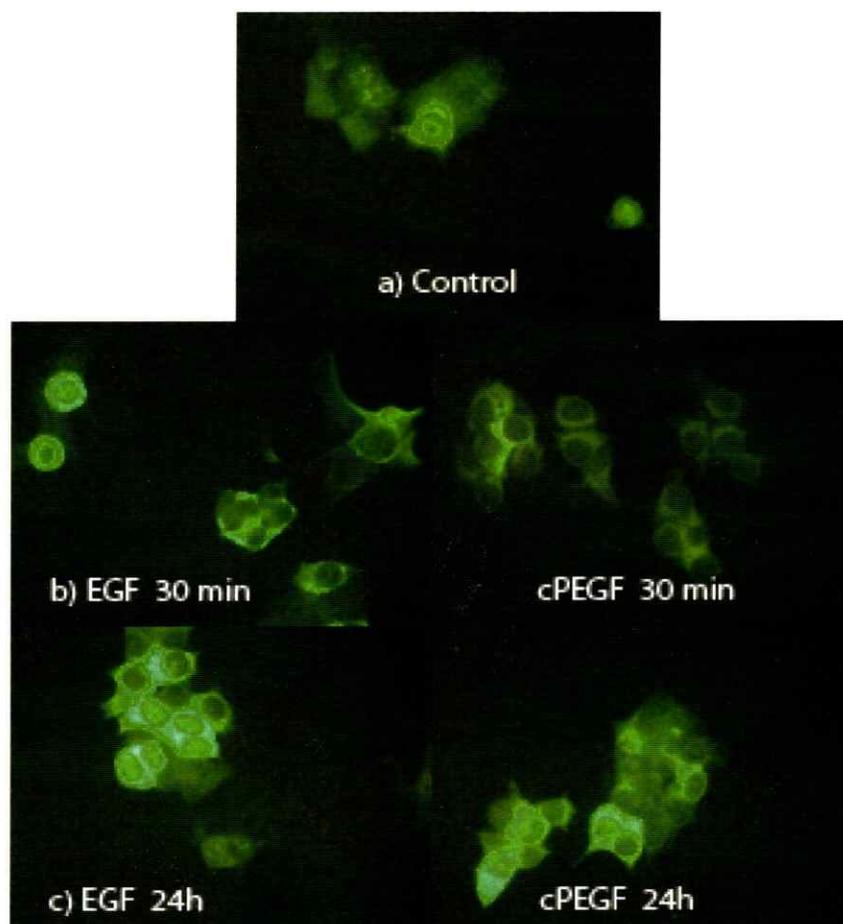


Figura 16. Inmunoreactividad de HER2 después de un estímulo constante de EGF en presencia o ausencia de cP.

Imágenes representativas de inmunofluorescencia para HER2 a distintos tiempos de estímulo con 5ng/ml EGF. a) Células Control. Células después de: b) 30min y c) 24h. Panel izquierdo EGF solo; panel derecho: EGF+cP.

Observación de inmunofluorescencia dirigida contra HER2 en células MCF7, las cuales fueron sembradas en baja densidad (6800 céls/cm²) sobre cubreobjetos redondos, transcurridas 96h de incubación, pasan a medio libre de suero por 24h, con posterior estimulación con 5ng/ml EGF, cP fue adicionado 1h de estímulo EGF, luego fueron incubadas con anticuerpo primario anti HER2 (1:100) y secundario anti IgG de ratón conjugado a FITC (1:250) como se indica en Materiales y Métodos.

Con el fin de afinar este estudio, se tomaron imágenes representativas de inmunofluorescencia para HER2 con tiempos de estímulo adicionales con EGF en presencia o ausencia de cP (0, 1, 6 y 24h), utilizando un objetivo de inmersión (100x) (Figura 17). A la hora de estímulo constante de EGF se obtiene un aumento de la inmunoreactividad de HER2, que decrece a las 6h. A las 24h de estímulo EGF se aprecia una recuperación en la inmunoreactividad de HER2. En presencia de cP se observa máxima acción inhibitoria de la inmunoreactividad del receptor a 1h de adición de EGF. A las 6h no se logra apreciar un efecto manifiesto de cP sobre HER2. Sin embargo a las 24h, cP disminuye eficientemente la inmunoreactividad de este receptor.

Luego de aplicado un estímulo constante de EGF se observa un rápido aumento en la expresión de HER2, alcanzando su máximo a 1h. La expresión disminuida a las 6h sugiere una posible internalización del receptor, que vuelve a recuperarse a las 24h. cP posee la capacidad de inhibir la expresión de HER2, en los dos tiempos.

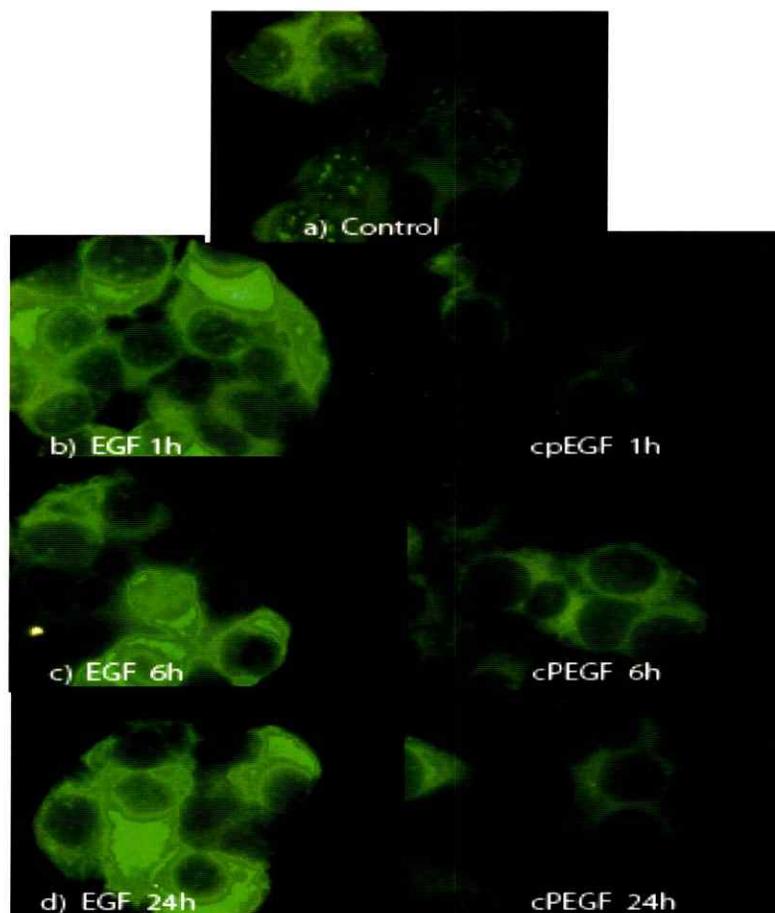


Figura 17. Inmunoreactividad de HER2 después de un estímulo constante de EGF en presencia o ausencia de cP (Observación al 100x).

Imágenes representativas de inmunofluorescencia para HER2 a distintos tiempos de estímulo con EGF con/sin cP, obtenidas utilizando un objetivo de inmersión (100x). a) Control. Células después de: b) 60min, c) 6h y d) 24h. con estímulo de 5ng/ml EGF en ausencia (izquierda) o presencia de 2ug/ml cP.

Observación de inmunofluorescencia dirigida contra HER2 en células MCF7, las cuales fueron sembradas en baja densidad (6800 céls/cm²) sobre cubreobjetos redondos, transcurridas 96h de incubación, pasan a medio libre de suero por 24h, con posterior estimulación con 5ng/ml EGF, cP fue adicionado 1h de estímulo EGF, luego fueron incubadas con anticuerpo primario anti HER2 (1:100) y secundario anti IgG de ratón conjugado a FITC (1:250) como se indica en Materiales y Métodos.

6.3. Inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal contra HER2 (EGFR2).

Efecto de un estímulo de corta duración de EGF en presencia y ausencia de cP.

Debido a que los estímulos constantes con agentes que reaccionan con receptores de la membrana plasmática pueden alterar su distribución, procedimos a determinar el efecto de un estímulo único de corta duración (5min) de EGF, en ausencia y presencia de cP, sobre la expresión de HER2.

A los 15min transcurridos desde el pulso de EGF, se observa un aumento en la inmunoreactividad de HER2, que se mantiene hasta las 24h. Cuando se aplica cP, un efecto más notorio se observa a los 15min, casi anulando la inmunoreactividad del receptor. A tiempos más largos de acción de EGF, cP ejerce también un efecto inhibitorio (Figura 18).

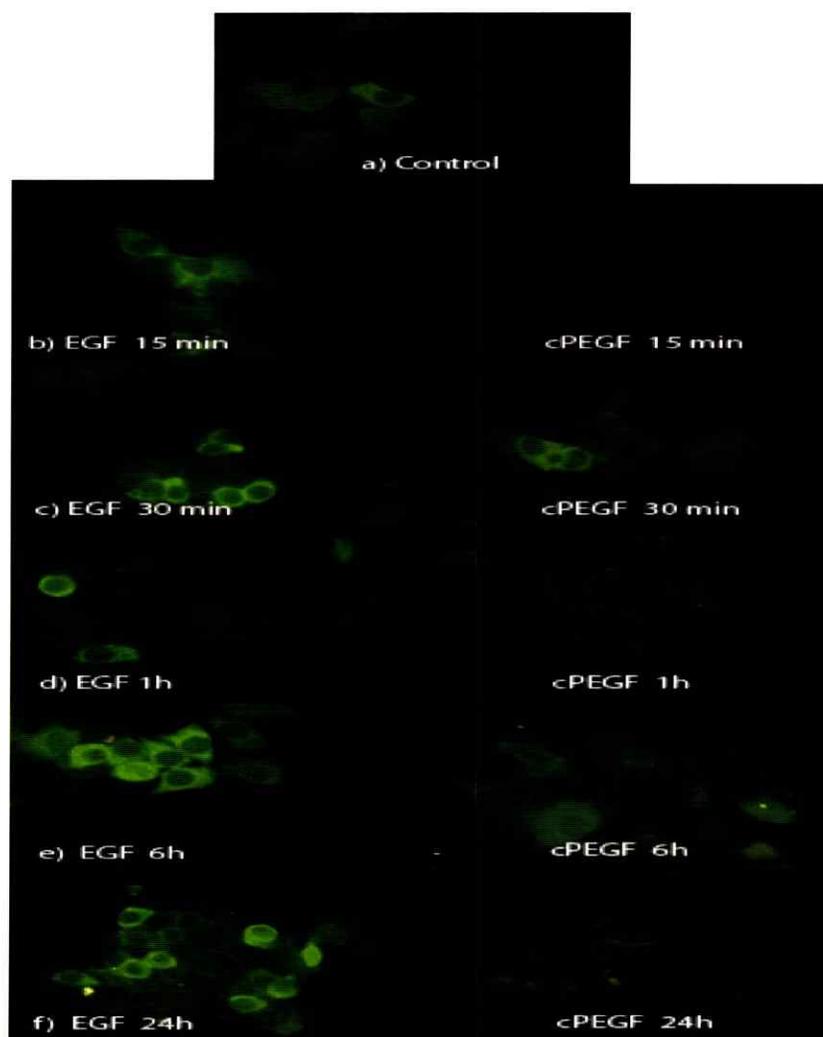


Figura 18. Inmunoreactividad de HER2 después de un estímulo de corta duración de EGF en presencia o ausencia de cP.

Imágenes representativas de fluorescencia: inmunoreactividad de HER2 estimulado con pulso de EGF en ausencia (izquierda) o presencia de cP. a) Control. Luego de: b) 15min, c) 30min, d) 60min, e) 6h y f) 24h de estímulo.

Observación de inmunofluorescencia dirigida contra HER2 en células MCF7, las cuales fueron sembradas en baja densidad (6800 céls/cm²) sobre cubreobjetos redondos, transcurridas 96h de incubación, pasan a medio libre de suero por 24h, con posterior estimulación por 5min con 5ng/ml EGF, cP fue adicionado 1h de estímulo EGF, luego fueron incubadas con anticuerpo primario anti HER2 (1:100) y secundario anti IgG de ratón conjugado a FITC (1:250) como se indica en Materiales y Métodos.

6.4. Tests de inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal contra la forma activa de MAPK. Efecto de un estímulo de corta duración de EGF en presencia y ausencia de cP.

Con el objeto de analizar la vía de transducción de señales de HER2, se analizó activación de p-MAPK frente a un estímulo de corta duración de EGF en presencia y ausencia de cP.

Se observó que al estimular células con 5ng/ml EGF, la inmunoreactividad de p-MAPK aumenta transcurridos 3, 6, 15 y 60min. El mayor aumento se alcanzó a los 6 min de estímulo y se mantuvo relativamente constante por 60min. En estas condiciones, la presencia de cP, no provocó mayor inhibición de p-MAKP, aunque se observó una menor inmunoreactividad de p-MAPK en presencia de cP a tiempos tempranos de estimulación (primeros 3 minutos en presencia de cP), tal vez el péptido rápidamente impide que MAPK active factores transcripcionales (Figura 19).

En células MCF7, el pulso de EGF tiene la capacidad de estimular la activación de MAPK a tiempos tempranos de estimulación (3min), con esto corroboramos lo señalado por otros autores (Hackel P. y col. 1999). cP parece no poseer la capacidad de inhibir la activación de MAPK en los tiempos de estímulo estudiados.

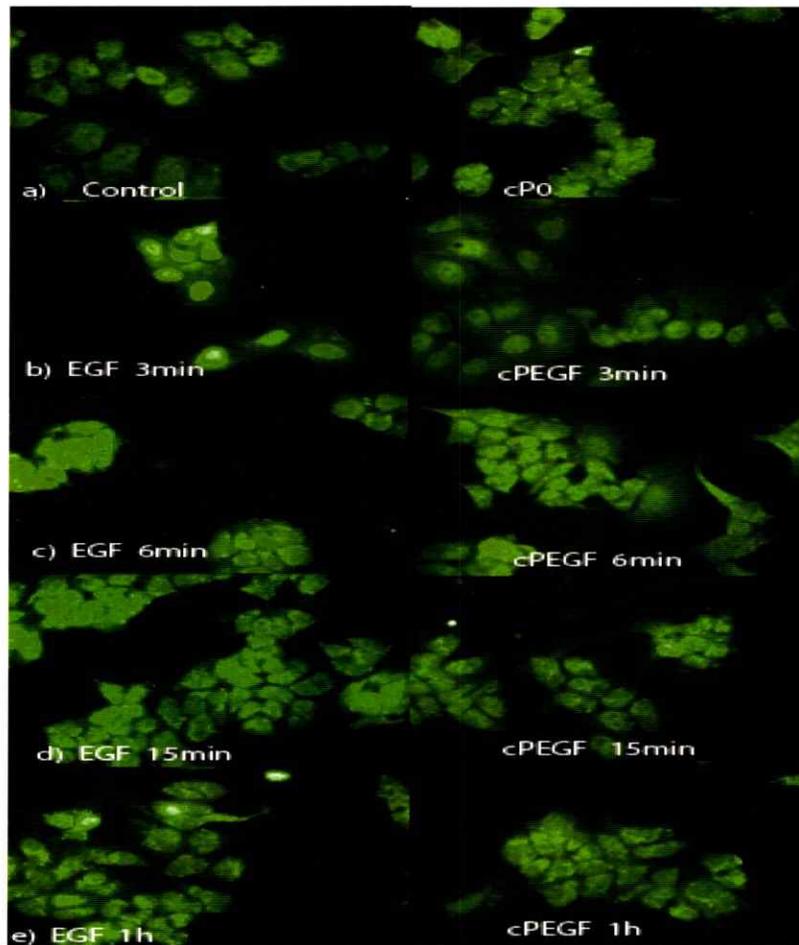


Figura 19. Inmunoreactividad de MAPK después de un estímulo de corta duración de EGF en presencia o ausencia de cP.

Inmunofluorescencia para p-ERK1/2 después de un estímulo con EGF en ausencia y presencia de cP. a) Células Control y enfrentadas a cP. Células después de: c) 3min. d) 6min. e) 15min. f) 1h con estímulo EGF (izquierda) y EGF + cP (derecha).

Observación de inmunofluorescencia dirigida contra p-ERK 1/2 (MAPK) en células MCF7, las cuales fueron sembradas en baja densidad (6800 céls/cm²) sobre cubreobjetos redondos, transcurridas 96h de incubación, pasan a medio libre de suero por 24h, con posterior estimulación por 5min con 5ng/ml EGF, cP fue adicionado 1h de estímulo EGF, luego fueron incubadas con anticuerpo primario anti MAPK (1:250) y secundario anti IgG-Cy2 de conejo (1:50) como se indica en Materiales y Métodos.

6.5. Inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal contra PKC δ . Efecto de un estímulo de corta duración de EGF en presencia y ausencia de cP.

Estudios preclínicos han mostrado que tratamiento de xeno-implantes de cáncer mamario con cP induce la fosforilación de p53 (Parikh RR y col. 2005), el cual es un principal modulador de p21Cip1. Adicionalmente se conoce que de forma natural esta fosforilación es inducida por activación de PKC δ durante los procesos de arresto del ciclo celular (Fig.20).

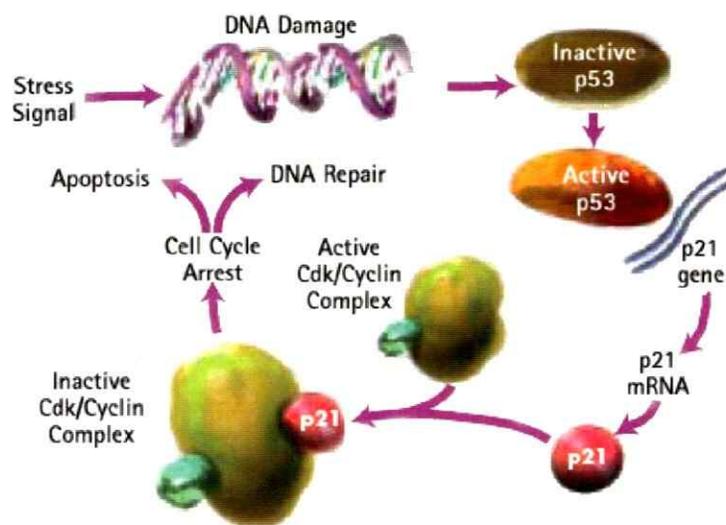


Figura 20. Principal mecanismo de modulación del arresto del ciclo celular.

Debido a que se ha demostrado que la sobre-expresión de PKC δ estaría relacionada con la inhibición de la proliferación y el arresto del ciclo celular (Mischak H. y col. 1993), (Harrington E. y col. 1997), se procedió a analizar la expresión de PKC δ en el marco de la acción antiproliferativa de cP, mediante inmunofluorescencia indirecta. Se analizó la inmunoreactividad de PKC δ frente a un estímulo de corta duración de EGF en presencia y ausencia de cP.

Luego de estimular células con 5ng/ml EGF, no se observan cambios en la inmunoreactividad de PKC δ transcurrido 3min, 6min, 15min y 1h de estimulación con EGF. En presencia de cP, se detectó una acción estimuladora en la inmunoreactividad de PKC δ , observándose máxima acción de este a los 3min de estimulación (Figura 21). O sea, EGF no poseería la capacidad de estimular la expresión de PKC δ en ninguno de los tiempos analizados. En cambio, cP tiene la capacidad de estimular la expresión de PKC δ a tiempos cortos de estimulación (3 hasta 60min).

Los resultados anteriores señalan una vía alternativa a AFPR para la acción antiproliferativa de cP, esta involucraría la vía de señalización de EGFR2, la cual está íntimamente relacionada con la cascada de señalización de MAPK y además involucraría a isoformas de las PKC, especialmente a PKC δ , que participa en el arresto del ciclo celular y que sería necesario para la acción antiproliferativa de cP sobre células tumorales mamarias MCF7.

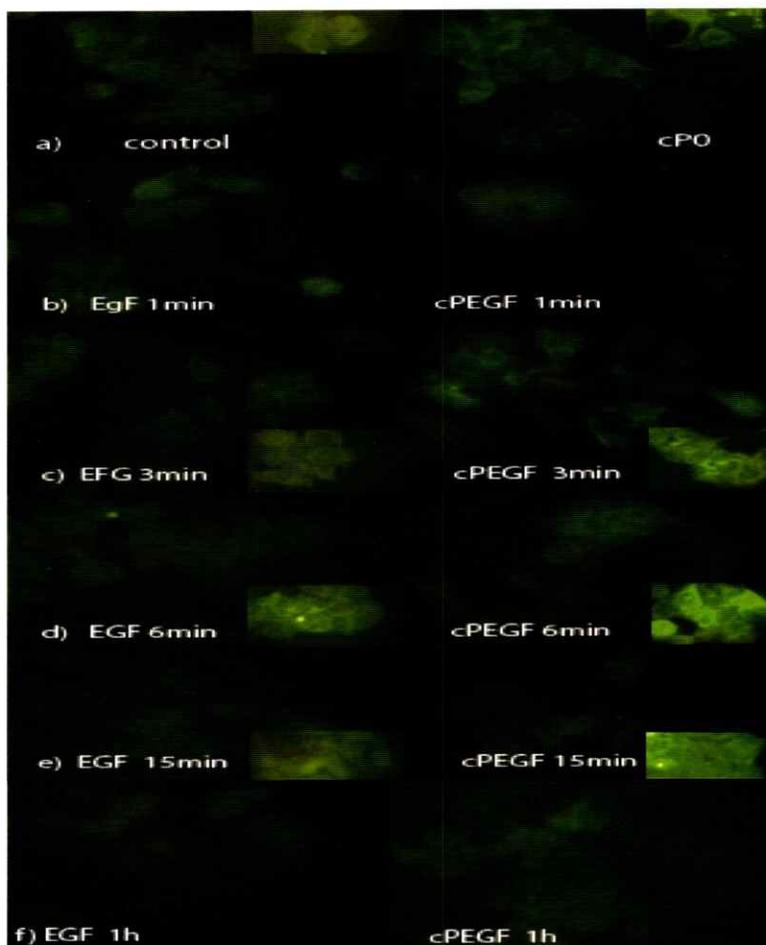


Figura 21. Inmunoreactividad de PKC δ después de un estímulo de corta duración de EGF en presencia o ausencia de cP.

Imágenes representativas de inmunoreactividad de PKC δ después de un estímulo con EGF con/sin cP). a) Células Control y tratadas con sólo cP. Células después de: b) 1min. c) 3min. d) 6min. e) 15min, f) 60min de estímulo con EGF en ausencia (izq) o presencia de cP (der). Figuras a, c, d y e muestran, adicionalmente, insertos de imágenes obtenidas utilizando un objetivo de inmersión (100x).

Observación de inmunofluorescencia dirigida contra PKC δ en células MCF7, las cuales fueron sembradas en baja densidad (6800 céls/cm²) sobre cubreobjetos redondos, transcurridas 96h de incubación, pasan a medio libre de suero por 24h, con posterior estimulación por 5min con 5ng/ml EGF, cP fue adicionado 1h de estímulo EGF, luego fueron incubadas con anticuerpo primario anti PKC δ (1:50) y secundario anti IgG de ratón conjugado a FITC (1:250) como se indica en Materiales y Métodos.

DISCUSIÓN

El objetivo central de este trabajo fue analizar la posible participación del receptor de AFP (AFPR) en la acción antiproliferativa de cP. Es conocido que AFPR une con alta afinidad a su ligando AFP pero asimismo une seroalbúmina con afinidad algo menor. Como la albúmina es la proteína más abundante del suero, hubo que modificar las condiciones habituales de cultivo de las células empleadas (línea celular MCF7), utilizando medios de cultivo libres de suero, para lo cual se adicionó, en lugar de suero, un sucedáneo como lo es el almidón hidroxilado (HAES). Se demostró que éste facilita la mantención de los factores a estudiar disueltos en el medio, evitando que las distintas moléculas sean adsorbidas por el material plástico de la placa de cultivo. Además de los factores estudiados (cP, EGF, TGF α , E2), se adicionaron al medio Insulina, Transferrina, Selenio (ITS) y antibióticos.

Analizando la acción antimitogénica de cP, se comparó el efecto a nivel de la proliferación de células MCF7 estimuladas con estradiol y cultivadas en medio con suero de ternera tratado con carbón activado (STT) con aquellas mantenidas en medio sin suero. En estas condiciones se determinó que cP inhibe mucho más eficientemente la proliferación inducida por estradiol en presencia que en ausencia de suero. Debido a que el suero es rico en factores y proteínas necesarias para el establecimiento normal de cultivos celulares, pensamos que éstos estarían influyendo de manera positiva en la acción inhibitoria de cP, en otras palabras, la interacción de cP con algunos factores presentes en el suero sería la causa del mayor efecto inhibitorio mostrado. Las curvas de proliferación de MCF7 con un estímulo de estradiol en medio sin suero, mostraron distintos porcentajes de inhibición por acción de cP, oscilando ésta entre el 25 y el 59%; de inhibición. Se determinó que esto está relacionado con el tipo de sembrado realizado, mientras más homogéneo el sembrado, mayor el efecto inhibitorio por cP (59%).

En medio libre de suero, la mayoría de los estudios de proliferación, fueron realizados dentro de 72h; se observó que después de este tiempo las células

comienzan a perder adherencia, probablemente por falta de nutrientes, aunque en algunos casos se detectó un sobre crecimiento de agregados celulares en el fondo de la placa de cultivo, lo que disminuyó considerablemente el número de células adheridas que son contabilizadas a los tiempos estudiados; la adición de STT a células creciendo en medio libre de suero por sobre 72h logró reestablecer la proliferación celular, lo que puede atribuirse a factores, proteicos u otros presentes en STT. La presencia de STT en el medio no alteró la capacidad de cP de inhibir la proliferación celular. Cabe notar que la adición simultánea de suero fetal bovino (SFB) y estradiol al medio de cultivo estimula la proliferación celular en estas circunstancias, y que la inclusión de cP logró disminuir la proliferación. La actividad antiproliferativa de cP se manifestó independiente del tipo de suero presente en el medio.

Sonnenschein y col. postularon en 1984 que los sueros de bovino y humano contienen un inhibidor de la proliferación de células sensibles a estrógeno. Ellos postularon que los estrógenos promueven la proliferación por neutralización del inhibidor presente en el suero, el cual fue en su ocasión identificado como seroalbúmina. Nuestros resultados indican que en medio libre de suero y ausencia de albúmina, el estradiol incrementa el número celular y, en estas condiciones, cP reduce significativamente la proliferación de MCF7, alcanzándose valores similares a los de controles sin esteroide. En presencia de HSA (que parece funcionar como agente de solubilización del esteroide), tanto estradiol como cP mantienen sus respectivas habilidades. La misma situación se observó cuando se estudió el efecto de EGF sobre la proliferación celular, o sea: la presencia de HAS no afectó las capacidades de EGF ni de cP. En otras palabras, en estas condiciones HSA no se comporta como un agente interferente de la proliferación celular, esto nos permite cuestionar la hipótesis de Sonnenschein acerca de inhibición por seroalbúmina de la proliferación de MCF7 en cultivo.

Sí cP actuase a nivel del receptor de AFP, la presencia de HSA (la cual muestra gran afinidad por AFPR) debería disminuir la acción inhibitoria sobre la proliferación

celular, lo que no ocurre. Este representa, a nuestro juicio, un primer indicio de que cP no estaría actuando a nivel del receptor de AFP. La proliferación estimulada con SFB (una fuente con elevados niveles de AFP) fue inhibida eficientemente por cP, lo que nos provee de un segundo indicio de que AFPR no participaría en la acción antimitogénica de cP. Cabe destacar que, además, se detecta idéntica cantidad de inhibición por cP en SFB, suero de conejo y suero conejo de anti-AFP.

Mediante "dot blot" con anticuerpos anti-AFPR fue posible demostrar presencia de AFPR en una fracción de proteínas de membrana de las células MCF7. Los anticuerpos disponibles son específicos para la forma nativa del receptor de AFP y como no nos fue posible demostrar presencia de AFPR mediante Western blot en condiciones no desnaturalantes, asumimos que la técnica empleada no permitió mantener condiciones no desnaturalantes en forma estricta. El análisis por inmunofluorescencia de la expresión de AFPR en células MCF7, empleando los anticuerpos dirigidos contra el receptor nativo, muestran que la presencia de cP en el medio no afecta los perfiles de expresión de AFPR. Tampoco usando inmunomicroscopía electrónica fue posible detectar cambios en la distribución o la expresión de este receptor a los 5,10min y 24h de estímulo con cP. Este hecho vuelve a sugerir que la acción de cP no involucraría unión a nivel de AFPR.

Los resultados resumidos arriba nos indujeron a estudiar el efecto de cP a nivel de vías de señalización que promueven la proliferación celular y así encontrar evidencias de mecanismos antiproliferativos de cP.

Se indicó anteriormente que las células MCF7 cultivadas en medio libre de suero proliferan indistintamente en presencia de EGF o E2, por lo que asumimos que estarían utilizando una vía común para ambos factores, considerando que ambos tienen un efecto mitogénico en MCF7 y que cP presenta la capacidad de inhibir ambos efectos. Esto reafirma el hecho de que existe un cross-talk entre estos factores (Aronica S.M. y col. 1994, Ignar-Trowbridge D. M. y col. 1993) que converge hacia una misma vía de señalización intracelular, la cual se ve afectada o interrumpida en

presencia de cP. El factor TGFA también forma parte de este cross-talk (Ignar-Trowbridge D. M. y col. 1993). En relación al efecto de este factor, en medio sin suero se observó que es más efectivo que E2 para estimular la proliferación celular (a las 48h de estimulación), la combinación de TGFA y E2 tiene un efecto proliferativo aún mayor. Esto se debe a que TGFA es un péptido con capacidad de unirse a los cuatro diferentes miembros de la familia EGFR; se piensa además que la activación de algunas células puede propagarse a células vecinas (Tzahar y col. 1996), por lo que el estímulo de la proliferación por TGFA podría ser más intenso que el de E2. En todo caso, cP es capaz de inhibir la proliferación celular inducida por TGFA, aunque en presencia de E2 y TGFA simultáneamente, la capacidad inhibitoria de cP a la misma concentración no es suficiente.

La evidencia de que ocurre una sobre expresión de HER2 en ciertos tumores mamarios agresivos (Hackel P. y col. 1999) nos indujo a investigar la acción inhibitoria de cP sobre la proliferación celular. Se procedió a determinar la expresión de HER2 y sus variaciones frente a un estímulo constante con EGF mediante el análisis de inmunofluorescencia indirecta. Se detectó un aumento de la expresión de este receptor luego del estímulo con EGF, especialmente visible en el citoplasma. Curiosamente, se observó una disminución en la expresión de HER2 tras 6h de estímulo con EGF, probablemente el factor adicionado causa la "down-regulation" del receptor (paso a compartimento degradativo) dentro de las 6h de estímulo. Posteriormente, a las 24h se observó una recuperación de la expresión de HER2, probablemente debido a la síntesis "de novo" del receptor. En presencia de cP, la expresión del receptor HER2 se vio considerablemente disminuida, respecto de los estímulos en ausencia de cP, a todos los tiempos analizados, exceptuando las 6h de estímulo con EGF, sugiriendo alteraciones en la importación y procesamiento del complejo EGF-receptor.

En paralelo se analizó la expresión de EGFR1 frente a las condiciones empleadas para estudiar HER2, sin embargo la reducida inmunofluorescencia de EGFR1 en MCF7 impidieron constatar variaciones notorias en la expresión.

El efecto permanente con estímulo constante de EGF puede alterar tanto la distribución como los efectos a nivel de cascadas de señalización, por ello se procedió a estudiar qué efectos tiene un estímulo de corta duración ("pulso": 5 minutos de exposición) de EGF sobre la expresión de HER2. En forma similar que con el estímulo continuado, el pulso de corta duración con EGF aumentó la expresión de HER2. El estímulo de corta duración se asemeja a la situación real a que están expuestas las células en un organismo, cuando células reguladoras efectúan la síntesis endógena de EGF, que no se produce de forma constante. Como se indicó, en todos los experimentos la presencia de cP disminuyó considerablemente la expresión del receptor HER2 en los tiempos analizados. Estos resultados reafirman, a nuestro juicio, la hipótesis de que el mecanismo de acción inhibitorio de cP estaría relacionado con alguna vía de señalización en la cual participa HER2.

Una de las vías de señalización considerada como la más íntimamente relacionada a EGF y sus receptores es la de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Hackel P. y col. 1999). Por esto, se procedió a estudiar mediante inmunofluorescencia la activación de MAPK (o sea la fosforilación de p42/44), aplicando pulsos de EGF. De esta manera fue posible observar un aumento en la actividad de MAPK a los pocos minutos de estímulo con EGF. No se logró evidenciar que cP posea capacidad de inhibir la activación de MAPK en los tiempos de estímulo analizados, lo que se podría deber a que MAPK participa en múltiples vías de señalización y no sólo las relativas a EGF. Cabe mencionar que se observó una menor intensidad de MAPK en la región nuclear a tiempos tempranos de estimulación con cP, lo que sugiere que cP estaría indirectamente impidiendo, en un cierto grado, la activación de factores transcripcionales por MAPK. Recientemente, estos resultados han sido corroborados en nuestro laboratorio, en donde mediante western blot como por inmunofluorescencia dirigida contra la forma fosforilada de ERK (p-ERK1/2), estimulada con estradiol o EGF, se detectó una clara reducción en la activación de

ERK en la presencia de cP (Antileo E, Torres C, Sierralta W., y col. 2007, manuscrito en revisión en *Oncology Reports*).

Se ha demostrado la existencia de una correlación positiva entre elevados niveles de la proteína quinasa PKC δ y la inhibición de la proliferación, el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Harrington E. y col. 1997, Savickiene J. y col. 1999). El análisis de inmunofluorescencia nos permitió determinar efectos de cP sobre PKC δ luego de un estímulo de EGF de corta duración. Se determinó que si bien no hay alteraciones en la expresión de PKC δ por efecto de EGF, en presencia de cP se observa un aumento rápido de la inmunoreactividad de la proteína quinasa. En otras palabras, cP es capaz de estimular la expresión de PKC δ en presencia o ausencia de EGF. Es sabido que EGF está involucrado con vías de señalización que promueven la proliferación celular, en tanto que PKC δ se relaciona con la acción opuesta, es decir, participa en eventos en los que hay inhibición de la proliferación, corrientemente con detención del ciclo celular. Por ello, EGF no afecta los niveles de PKC δ , en tanto que cP, provocaría, a través de la inducción de PKC δ , una disminución de la proliferación con extensión del ciclo celular y alargamiento temporal de la división celular. Como consecuencia de esto se observa, una disminución en el número de células MCF7 en los cultivos expuestos a cP.

Los eventos descritos concuerdan con resultados de estudios de Parikh R. y col. (2005) que demostraron una notoria interferencia de cP en el crecimiento de tumores mamarios humanos xeno-implantados estimulados por estrógenos. Dichos autores detectaron que el tratamiento de los animales con cP provocó un aumento en la fosforilación de p53, proteína que a través de p21Cip1 y un par de polipéptidos inhibidores (Cip), inhiben diversas quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Es conocido que p53 ejecuta el control de la expresión, incluyendo la vida media de diferentes Cip. Cabe mencionar que Shanmugam M. y col. (2001) indujeron el arresto de la proliferación de MCF7 a través del aumento en los niveles de expresión de tanto

PKC δ como de p21. En la actualidad, nuestro laboratorio analiza el efecto de cP sobre la expresión de p21, con el fin de relacionar todos los antecedentes antes mencionados.

Estudios adicionales serán requeridos para determinar si otros reguladores del ciclo celular (Rb, p17, etc) están involucrados en el mecanismo de acción de cP.

CONCLUSIONES

Usando la línea celular MCF7 como modelo de célula tumoral mamaria, en este trabajo se analizó algunos aspectos de la acción antiproliferativa de un ciclopéptido (cP) capaz de inhibir la actividad de estradiol y otros factores mitogénicos. El objetivo de los estudios fue de apoyo en el esclarecimiento de los mecanismos e interacciones por los cuales cP desencadena su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, para ello realizamos experimentos usando cultivos celulares en un sistema libre de suero.

Los resultados obtenidos indican que en condiciones libres de suero, estradiol estimula la proliferación celular y que cP es capaz de anular completamente los efectos mitogénicos del esteroide sobre las células MCF7. Efectos semejantes fueron observados al reemplazar el esteroide por factores de crecimiento como EGF y TGF α ., Estradiol, EGF y cP mantienen sus respectivas capacidades en presencia de HSA. En otras palabras, HSA no interfiere en absoluto en los efectos de esas moléculas a nivel de la proliferación celular, lo que nos permite cuestionar la hipótesis propuesta por Sonnenschein y colaboradores apoyando un efecto inhibitorio de seroalbúmina de la proliferación de MCF7 en cultivo.

El hecho de la presencia de HSA (la cual posee gran afinidad por el AFPR) no altera la acción inhibitoria de cP, nos sugirió que el ciclopéptido no actuaría a nivel del receptor de AFP. Asimismo observamos que cP inhibe en forma similar la proliferación celular en presencia o ausencia de SFB (componente con elevados niveles de AFP), lo que reafirma la idea de que AFPR no participaría en la acción antiproliferativa de cP. Empleando dot blot en extractos celulares fue posible demostrar presencia de AFPR en la fracción correspondiente a proteínas de membrana. Empleando técnicas de inmunofluorescencia, no se apreció que la presencia de cP afectase la expresión de

AFPR, en tanto que, mediante inmunomicroscopia electrónica no logró detectarse cambios en la expresión o la distribución de este receptor por efecto de cP, lo que viene a reafirmar el concepto de que la acción de cP no involucraría unión a AFPR.

En medio libre de suero, las células MCF7 crecen similarmente en presencia de EGF, E2 y/o TGF α . Esto reafirma la existencia de un cross-talk entre estos factores (Aronica S.M. y col. 1994), (Ignar-Trowbridge D. M. y col. 1993) esta conversación cruzada converge hacia una vía de señalización intracelular común, la cual se ve interrumpida río abajo en presencia de cP.

Constatamos una sobre expresión de HER2 en células de cáncer mamario, analizadas mediante inmunofluorescencia indirecta. Al emplear tanto un estímulo constante como uno de corta duración (5min) con EGF recombinante humano, observamos aumento en la expresión del receptor. En ambas circunstancias, la presencia de cP disminuyó considerablemente la expresión del receptor, apoyando la hipótesis de que el mecanismo de acción inhibitorio de cP se relacionaría con la vía de señalización de HER2.

La relación entre la vía de señalización de EGF y la vía de ERK1/2 (MAPK) (Hackel P. y col. 1999), fue comprobada mediante inmunofluorescencia dirigida para MAPK, un estímulo de corta duración de EGF aumentó la activación de MAPK, cP no inhibió a MAPK, pero a tiempos tempranos de estimulación, provocó una disminución de la señal nuclear de la misma, indicando que cP estaría impidiendo la activación de algunos factores transcripcionales.

También mediante técnicas de inmunofluorescencia analizamos la rápida activación de PKC δ luego de un pulso de EGF, determinando que éste no estimuló la expresión de PKC δ , la presencia de cP logró estimular evidentemente la inmunoreactividad específica de esta quinasa, apuntando a una relación entre inhibición de la proliferación celular por cP y la extensión del ciclo celular. Así, pensamos que el aumento en la actividad de PKC δ causaría una extensión en el

tiempo de las fases del ciclo celular, provocando la disminución relativa de la proliferación de las células MCF7 en cultivo como respuesta a la presencia de cP.

Las evidencias presentadas en esta tesis describen algunos intermediarios involucrados en el mecanismo de acción un agente antiproliferativo derivado de AFP (cP), el cual en una primera instancia interactuaría con HER2, disminuyendo su actividad y heterodimerización, previniendo la transactivación de este receptor con señales río abajo, en este caso, vía de señalación de MAPK. Este fenómeno daría lugar a la activación de procesos antiproliferativos, como arresto del ciclo celular, en los cuales es de gran importancia la participación de PKC δ como modulador de la actividad de p53, el que a su vez participa en la activación de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, como lo es su principal blanco, p21Cip1, los cuales participan activamente en el arresto del ciclo celular y procesos antiproliferativos (Fig.22). La participación de todos estos ha sido comprobada, ya sea en esta tesis u en otros estudios en los cuales se ha evaluado la capacidad antiproliferativa de cP en cultivos *in vitro* y en bioensayos de xeno-implantes de células tumorales mamarias.

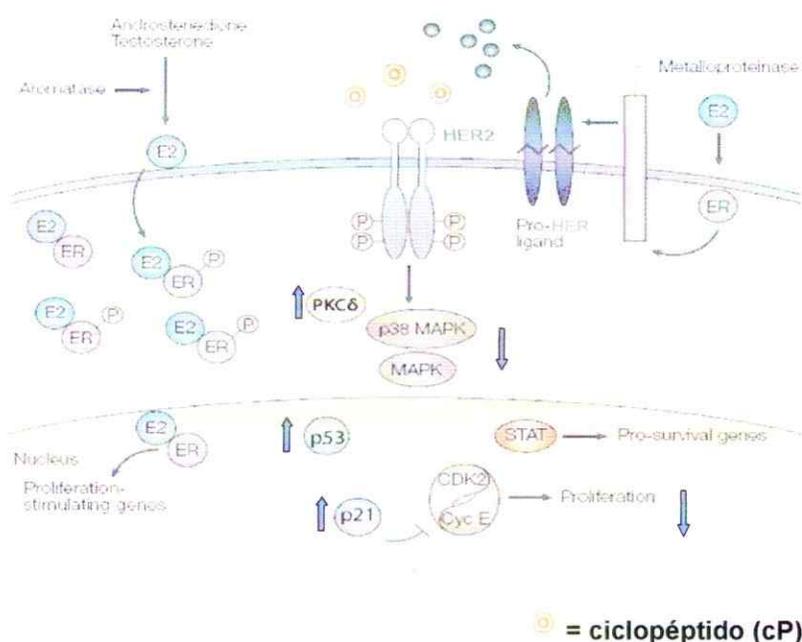


Figura 22. Intermediarios involucrados en el mecanismo de acción antiproliferativa de

REFERENCIAS

Albrektsen, G., Heuch, I. & Kvale, G. (1995) Multiple births, sex of children and subsequent breast cancer risk for the mothers: a prospective study in Norway. *Int. J. Cancer* 60, 341-344.

Aronica, S. M. & Katzenellenbogen, B. S. (1993). Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol. Endocrinol.* 7, 743-752.

Bennett JA, Mesfin FB, Andersen TT, Gierthy JF, Jacobson HI. A peptide derived from a-fetoprotein prevents the growth of estrogen-dependent human breast cancers sensitive and resistant to tamoxifen. *Proc Natl Acad Sci US A* 2002;99:2211-5.

Black, J. D. (2000). Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front. Biosci.* 5, d406-d423

Borner, C., Wyss, R., Regazzi, R., Eppenberger, U., and Fabbro, D. Immunological quantitation of phospholipid/Ca²⁺-dependent protein kinase of human mammary carcinoma cells: inverse relationship to estrogen receptors. *Int. J. Cancer*, 40: 344-348, 1987.

Bunone, G., Briand, P.-A., Miksicek, R. J. & Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 15, 2174-2183.

Crandall B.F., Alpha-fetoprotein: a review, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 15 (1981) 127-185.

Das, S. K., Tsukamura, H., Paria, B. C., Andrews, G. K. & Dey, S. K. (1994). Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mouse uterus. *Endocrinology* 134, 971-981

DeFreest LA, Mesfin FB, Joseph L, et al. Synthetic peptide derived from a-fetoprotein inhibits growth of human breast cancer: investigation of the pharmacophore and synthesis optimization. *JPept Res* 2004;63:409-19.

Deutsch, H. F. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv. Cancer Res.*, 56: 253-312. 1991

DiAgustine, R. P., Petruetz, P., Bell, G. I., Brown, C. F., Korach, K. S. & McLachlan, J. A. (1988). Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 122, 2355-2363.

Dudich E, Semenkova L, Gorbatova E, Dudich I, Khromykh L, Tatulov E, Grechko G, Sukhikh G 1998 Growth-regulative activity of human a-fetoprotein for different types of tumor and normal cells. *Tumour Biol* 19:30-40

Dudich, I., Tokhtamysheva, N., Semenkova, L., Dudich, E., Hellman, J. & Korpela, T. (1999) Isolation and structural and functional characterization of two stable peptic fragments of human a-fetoprotein. *Biochemistry* 38, 10406-10414.

Festin S.M., J.A. Bennett, P. Fletcher, H.I. Jacobson, T.T. Andersen, Anti-estrogenic activity of secreted and non-secreted forms of domain III of human alpha-fetoprotein produced in a baculovirus system, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 38 (1997) 572.

Festin S.M., J.A. Bennett, P.W. Fletcher, H.I. Jacobson, T.T. Andersen, The recombinant third domain of human alpha-fetoprotein retains the antiestrotrophic activity found in the full-length molecule, *Biochim. Biophys. Acta* 1427 (1999) 307-314.

Fisher, B., Costantino, J., Redmond, C., Poisson, R., Bowman, D., Couture, J., Dimitrov, N. V., Wolmark, N., Wickerham, D. L., et al. (1989). A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N. Engl. J. Med.* 320, 479-484.

Fisher, B., Costantino, J. & Wickerham, D. L. (1998). Tamoxifen for the prevention of breast cancer: A report from the NSABP P-1 study. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1371-1388.

Gavrielides, M. V., Frijhoff, A. F., Conti, C. J., and Kazanietz, M. G. (2004). Protein Kinase C and Prostate Carcinogenesis: Targeting the Cell Cycle and Apoptotic Mechanisms. *Curr. Drug Targets* 5, 431-443

Genersch, E., Schneider, D. W., Sauer, G., Khazaie, K., Schuppan, D., and Lichtner, R. B. Prevention of EGF-modulated adhesion of tumor cells to matrix proteins by specific EGF receptor inhibition. *Int. J. Cancer*, 75: 205 - 209, 1998.

M.Geuskens, J.M.Torres, C.Esteban, & J.Uriel. Morphological characterization of the pathway of endocytosis and intracellular processing of transferrin and alpha-fetoprotein in human T lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin (PHAEur. *J. Cell. Biol.* 50; 418-427 (1989).

Gordge, P. C., Hulme, M. J., Clegg, R. A., and Miller, W. R. Elevation of protein kinase A and protein kinase C activities in malignant as compared with normal human breast tissue. *Eur. J. Cancer* 32A: 2120-2126, 1996 (12). Jensen, E. V.&DeSombre, E. R. (1996) in *Cancer Medicine*, eds. Holland, J. F., Frei, E., Bast, R. C., Kufe, D. W., Morton, D. L. & Weichselbaum, R. R.(Williams & Wilkins, Baltimore), pp. 1049-1060.

Harrington EO, Loffler J, Nelson PR, Kent KC, Simons M, Ware JA. Enhancement of migration by protein kinase C-a and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase C-d in capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:7390-7397.

Hackel, P. O., Zwick, E., Prenzel, N., and Ullrich, A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*,11: 184 - 189, 1999.

Ignar-Trowbridge, D. M., Teng, C. T., Ross, K. A., Parker, M. G., Korach, K. S. & McLachlan, J. A. (1993). Peptide growth-factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element *Mol. Endocrinol.* 7, 992-998.

Jacobson, H.I., Bennett, J.A. & Mizejewski, G.J. (1990) Inhibition of estrogen-dependent breast cancer growth by a reaction product of a-fetoprotein and estradiol. *Cancer Res.* 50, 415-420.

Jacobson, H.I. & Janerich, D.T. (1989). Pregnancy-altered breast cancer risk: mediated by AFP? In *Biological Activities of Alpha-Fetoprotein* (Mizejewski, G.J. & Jacobson, H.I., eds), Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 93-100.

Jacobson, H.I., Marrota, D., Mizejewski, G.J., Bennett, J.A. & Andersen, T.T. (1989) Estradiol-induced changes in spectral and biologic properties of alpha-fetoprotein. *Proc. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* 17, 27.

Jacobson, H.I., Thompson, W.D. & Janerich, D.T. (1989) Multiple births and maternal risk of breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 129, 865-873.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., et al. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.

Kondapaka, S. B., Fridman, R., and Reddy, K. B. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 70: 722 – 726, 1997.

Lee, S. A., Karaszkiwicz, J. W., and Anderson, W. B. Elevated level of nuclear protein kinase C in multi-drug resistant MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, 52: 3750-3759, 1992.

Luft, A.J. & Lorscheider, F.L. (1983) Structural analysis of human and bovine a-fetoprotein by electron microscopy, image processing and circular dichroism. *Biochemistry* 22, 5971-5978.

Luttrell LM. 2005. Composition and function of g protein-coupled receptor signalsomes controlling mitogen-activated protein kinase activity. *J Mol Neurosci* 26:253-64

Melbye, M., Wohfahrt, J., Lei, U., Nürgaard-Pedersen, B., Mouridsen, H.T., Lambe, M. & Michels, K.B. (2000) a-Fetoprotein levels in maternal serum during pregnancy and maternal breast cancer incidence. *J. Natl Cancer Inst.* 92, 1001-1005.

Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaechtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF. Overexpression of protein kinase C-d and -e in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 1993; 268:6090-6096.

Mizejewski, G.J. (1995) Alpha-fetoprotein signal sequences: a proposed mechanism for subcellular localization and organelle targeting. *J. Theor. Biol.* 176, 103-113.

Mizejewski, G.J., Dias, J.A., Hauer, C.R., Henrikson, K.P. & Gierthy, J. (1996) Alphafetoprotein derived synthetic peptides: assay of an estrogen-modifying regulatory segment. *Mol. Cell. Endocrinol.* 118, 15-23.

Mizejewski, G.J. & Jacobson, H.I. (1989) AFP modification of biologic response in estrogensensitive tissue: use of in vivo and in vitro models. *Biological Activities of Alpha1-Fetoprotein*, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL.

T. Morinaga, M. Sakai, T.G. Wegmann, T. Tamaoki, Primary structures of human alpha-fetoprotein and its mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4604-4608.

- Mukku, V. R. & Stancel, C. M. (1985). Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J. Biol. Chem.* 260, 9820-9824.
- O'Brian, C., Vogel, V. G., Singletary, S. E., and Ward, N. E. Elevated protein kinase C expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue. *Cancer Res.*, 49: 3215-3217, 1989.
- Parikh RR, Gildener-Leapman N, Narendran A, et al: Prevention of n-methyl-N-nitrosourea-induced breast cancer by alpha-fetoprotein (AFP)-derived peptide, a peptide derived from the active site of AFP. *Clin Cancer Res* 11: 8512-8520, 2005.
- Richardson, B.E., Hulka, B.S., David-Peck, J.L., Hughes, C.L., Van den Berg, B.J., Christianson, R.E. & Calvin, J.A. (1998) Levels of maternal serum alpha-fetoprotein in pregnant women and subsequent breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol.* 148, 719-727.
- Ruoslahti E., Terry W.D., Alpha-fetoprotein and serum albumin show sequence homology, *Nature* 260 (1976) 804-805.
- Savickiene J, Gineitis A, Stigbrand T. Modulation of apoptosis of proliferating and differentiating HL-60 cells by protein kinase inhibitors: suppression of PKC or PKA differently affects cell differentiation and apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:698-709
- Sierralta W., Epuñan M., Reyes J., Valladares L., Andersen T., Bennett J., Jacobson H. and Pino A. A peptide derived from alpha-fetoprotein inhibits the proliferation induced by estradiol in mammary tumor cells in culture. *Oncology Reports*.2007.
- Suzuki, Y., Zeng, C.Q.Y. & Alpert, E.J. (1992) Isolation and characterization of a specific alpha-fetoprotein receptor on human monocytes. *Clin. Invest.* 90, 1530-1536.
- Toder, V., Blank, M., Gold-Geftel, L., and Nebel, L. The effect of alpha-fetoprotein on the growth of placental cells in vitro. *Placenta.* 4:79-86, 1983.
- Sweeney, C., Fambrough, D., Huard, C., Diamonti, A. J., Lander, E. S., Cantley, L. C., and Carraway, K. L., 3rd. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *J. Biol. Chem.*, 276: 22685 - 22698, 2001.
- van Oers, N. S. C., Cohen, B. L., and Murgita R. A. Isolation and characterization of a distinct immunoregulatory isoform of a-fetoprotein produced by the normal fetus. *J. Exp. Med.*, 170: 81 1-825, 1989.
- Vallette, G., Vranckx, R., Martin, M.-E., Benassayag, C. & Nunez, E.A. (1989) Conformational changes in rodent and human a-fetoprotein: influence of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 997, 302-312.
- M.J.Villacampa, R.Moro, J.Naval, C.Failly-Crepin, F.Lampreave, & J.Uriel. Alpha-fetoprotein receptors in a human breast cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122;1322-1327 (1984).
- Zizkovsky, V., Strop, P., Korcakova, J., Havranova, M. & Mikes, F. (1983) Fluorescence spectroscopy, Fluorescence polarization and circular dichroism in studies on pH dependent changes in the alphafetoprotein molecule. *Ann. NY Acad. Sci.* 417, 49-56.