



Sciacca, Marianela

Desarrollo de un modelo intraductal de cáncer de mama para el estudio de procesos biológicos determinantes en la transición in situ-invasora y la respuesta a nuevos compuestos antitumorales



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Sciacca, M. (2025). *Desarrollo de un modelo intraductal de cáncer de mama para el estudio de procesos biológicos determinantes en la transición in situ-invasora y la respuesta a nuevos compuestos antitumorales. (Tesis de posgrado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes, Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/5019>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Desarrollo de un modelo intraductal de cáncer de mama para el estudio de procesos biológicos determinantes en la transición *in situ*-invasora y la respuesta a nuevos compuestos antitumorales

TESIS DOCTORAL

Marianela Sciacca

marianelasciacca@gmail.com

Resumen

Argentina es uno de los países con mayor incidencia y mortalidad de cáncer de mama en la región de Latinoamérica, lo cual deja en evidencia la necesidad de determinar nuevos blancos moleculares para mejorar las terapias existentes. La producción exacerbada de óxido nítrico (NO) es utilizada por la célula tumoral como factor de supervivencia, de manera que la inhibición de la NO sintasa inducible (iNOS) surge como un posible blanco terapéutico antitumoral.

Las líneas celulares iNOS positivas (LM3, LMM3 y MDA-MB-231) mostraron ser sensibles a la inhibición de la producción de NO, en parte por la inhibición de la vía molecular de MAPK. A su vez, la inhibición del NO contribuyó a estimular la proliferación y la activación de fibroblastos junto con un incremento de linfocitos citotóxicos, en paralelo con una disminución en la velocidad de crecimiento de los tumores iNOS positivos. Por lo tanto, la inhibición de iNOS en la patología mamaria podría considerarse como un nuevo tratamiento complementario a las terapias convencionales.

Otra estrategia necesaria en el abordaje de la enfermedad es la detección precoz y la comprensión de los mecanismos moleculares asociados al proceso de progresión temprana. En la actualidad, las evidencias sugieren que los carcinomas *in situ* (DICS) son los precursores de los carcinomas infiltrantes (IDC), pero aún no es posible predecir cuáles de ellos o en qué momento progresará hacia estadios más avanzados.

El modelo celular LM38 consta de tres líneas celulares: LM38-LP formada por una población epitelial (EPI) y otra mioepitelial (MEP), LM38-HP (EPI) y la LM38-D2 (MEP). La línea celular LM38-LP fue la única capaz de formar tumores intraductales, lo que sugiere una cooperación intercelular que podría conferir una ventaja para la formación y progresión del tumor. En el modelo intraductal singénico se evidenció una tendencia a un aumento en el reclutamiento de los linfocitos CD4+ y CD8+ en el estadio invasor. Además, *in vitro*, la línea mixta LM38-

LP presento mayor capacidad de sobrevivencia, de invasión y migración que las líneas LM38-D2 y LM38-HP. Evaluamos la importancia de factores solubles que podrían mediar la cooperación entre las poblaciones celulares, proponiendo al TGF- β 1 como uno de los factores involucrados en este diálogo.

A partir de la expresión diferencial de la metaloproteasa de membrana de tipo 1 (MT1-MMP) en el modelo intraductal y un posterior análisis bioinformático, emergió SPARC como uno de los genes candidatos involucrados en la progresión temprana del cáncer de mama. En pacientes, a partir de la observación de la expresión de SPARC por inmunohistoquímica en 3 cohortes diferentes pudimos inferir que SPARC sólo interviene en la progresión temprana del cáncer de mama y no en estadios avanzados. A su vez dilucidamos que la vía molecular de TGF- β media el mecanismo molecular a través del cual SPARC y MT1-MMP inducen el proceso de invasión temprana. In vivo, el tratamiento con el inhibidor de TGF β RI, Galunisertib, disminuyó la proporción y tamaño de los tumores en estadio invasor comparado con el grupo control. Estos resultados sugieren que SPARC está involucrado en la progresión tumoral temprana a través de un mecanismo dependiente de la activación de la vía molecular de TGF- β , sugiriendo TGF β RI como un blanco terapéutico para pacientes positivos para SPARC.

En conclusión, se obtuvo un buen modelo murino que simula la progresión tumoral en humanos, que puede utilizarse como herramienta para identificar mecanismos asociados a esta transición. iNOS, SPARC y TGF- β RI surgieron como potenciales blancos terapéuticos y posibles biomarcadores de progresión de cáncer de mama para mejorar el tratamiento de la patología mamaria.

Palabras clave: cáncer de mama, NO, iNOS, blanco molecular, fibroblastos, DCIS, IDC, modelo intraductal, EPI, LEP, TGF- β , MT1-MMP, SPARC.

Abstract

In Latin America, Argentina ranks among the countries with the highest incidence and mortality rates of breast cancer. In this context, it becomes necessary to identify new molecular targets to improve existing therapies. Tumor cells use the overproduction of nitric oxide (NO) as a survival strategy; therefore, the inhibition of inducible NO synthase (iNOS) emerges as a possible therapeutic target.

iNOS-positive cell lines (LM3, LMM3, and MDA-MB-231) were sensitive to the inhibition of NO production, in part due to the inhibition of the MAPK signaling pathway. In addition, NO inhibition contributed to stimulating fibroblast proliferation and activation, in parallel with a decrease in tumor growth rate of iNOS-positive tumors and an increase of CD8⁺ T cells recruitment. Therefore, iNOS inhibition could be considered as a new complementary treatment in breast cancer.

Early detection is one of the strategies used to combat breast cancer therefore, it is necessary to understand the molecular mechanisms associated with early stages of the disease. Current evidence suggests that carcinomas in situ (DCIS) are the precursors of invasive carcinomas (IDC), but predicting this transition remains a challenge.

The cellular mouse model LM38 is composed of LM38-LP (MEP and EPI), LM38-HP (EPI) and LM38-D2 (MEP). Only the LM38-LP cell line was able to develop DCIS tumors after intraductal injections, suggesting that bi-cellular interactions could confer an advantage for tumor formation and progression. The IDC tumors showed an increase in CD4+ and CD8+ lymphocytes recruitment compared to DCIS stages. Moreover, LM38-LP cell line demonstrated higher survival, invasive, and migratory capacities compared to the LM38-D2 and LM38-HP cell lines. We proposed TGF-B1 as one of the factors that could be involved in the interaction between EPI and MEP populations.

Based on a differential expression of the membrane metalloprotease type 1 (MT1-MMP) and a subsequent bioinformatic analysis, SPARC emerges as one of the candidate genes involved in early breast cancer progression. After the analysis of SPARC expression by immunohistochemistry in 3 different cohorts of patient samples, we inferred that SPARC might be a relevant gene in early progression, whose function would be lost in more advanced stages. We also found that the TGF-B molecular pathway mediates the molecular mechanism through which SPARC and MT1-MMP induce early invasion process. In vivo, the TGFBR1 inhibitor Galunisertib, decreased both, the proportion and the size of invasive tumors compared to the control group. This data suggests that high expressions of SPARC and MT1-MMP under TGFBR1 modulation are essential for the in situ to invasive transition in breast cancer and, TGFBR1 emerges as a therapeutic target for patients with positive SPARC early tumors.

To sum up, we were able to develop a relevant intraductal murine model which can be employed to evaluate different key mechanisms during the in situ to invasive transition of breast cancer. iNOS, SPARC and TGF-BRI were identified as potential therapeutic targets and possible biomarkers of breast cancer progression to improve the existing treatment.

Key words: breast cancer, NO, iNOS, molecular target, fibroblasts, DCIS, IDC, intraductal model, EPI, LEP, TGF-B, MT1-MMP, SPARC.



Universidad
Nacional
de Quilmes

TESIS DOCTORAL

Desarrollo de un modelo intraductal de cáncer de mama para el estudio de procesos biológicos determinantes en la transición *in situ*-invasora y la respuesta a nuevos compuestos antitumorales

Lic. Marianela Sciacca

Directora: Dra. Catalina Lodillinsky

Directora asociada: Dra. Ana María Eiján

Tutora: Dra. Georgina Cardama

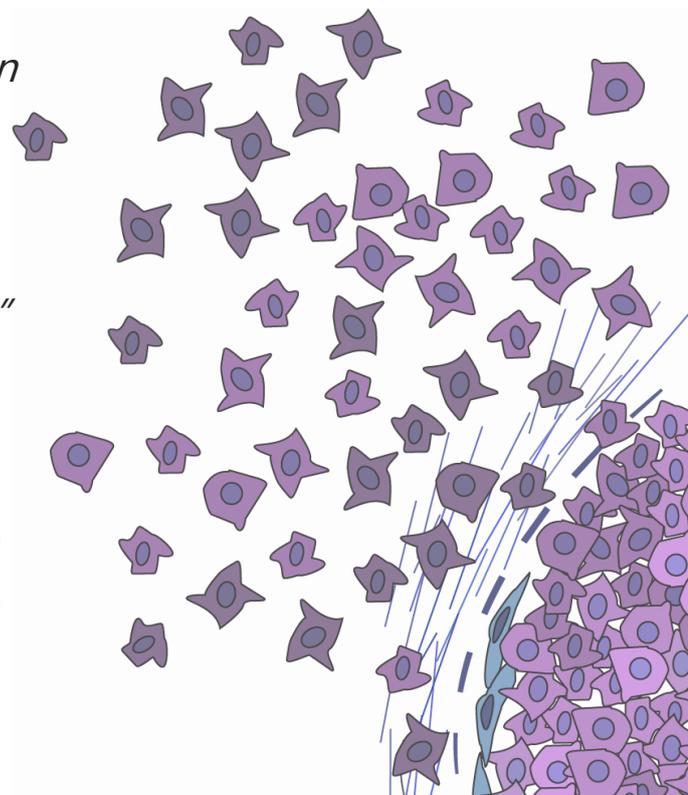
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"



.UBAROFFO
Instituto de Oncología
Ángel H. Roffo



2024



Universidad Nacional de Quilmes

Departamento CyT



Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencia y Tecnología de
la Universidad Nacional de Quilmes

**“Desarrollo de un modelo intraductal de cáncer
de mama para el estudio de procesos
biológicos determinantes en la transición *in
situ*-invasora y la respuesta a nuevos
compuestos antitumorales”**

Lic. Marianela Sciacca

Directora: Dra. Catalina Lodillinsky

Directora asociada: Dra. Ana María Eiján

Tutora: Dra. Georgina Cardama

*Realizado en el Departamento de Inmunobiología, Área de
Investigación del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”*

2024

Agradecimientos	10
Abreviaturas	15
Presentaciones científicas	17
Publicaciones con referato	18
INTRODUCCIÓN	19
Conceptos generales del cáncer	19
Características distintivas del	21
cáncer	27
Cáncer de mama	27
Glándula mamaria	27
Epidemiología, incidencia y mortalidad	29
Factores de riesgo	30
Clasificación del cáncer de mama según análisis histopatológico	31
Terapias dirigidas y la clasificación molecular del cáncer de mama	32
Diagnóstico, clínica y tratamiento	34
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	35
Transición <i>in situ</i> - invasor	37
Modelos murinos	39
Tipos de modelos	39
Líneas celulares de cáncer de mama de origen murino	41
Líneas celulares mamarias LMM3, LM3 y LM2	41
Modelo LM38	41
Líneas celulares de cáncer de mama de origen humano	43
MDF10DCIS.com	43
Óxido nítrico en cáncer de mama	43
Inhibidores del NO	45
Microambiente asociado al tumor	46
Línea murina de fibroblastos embrionarios	47
Biomarcadores en cáncer	47
Selección de genes candidatos	48
COX2	49
CLCA2	49
SPARC	50

La vía de TGF-B1 en cáncer y sus inhibidores	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
Hipótesis general	54
Objetivo general	54
Hipótesis y objetivos particulares	55
METODOLOGÍA	56
Ensayos de cultivo celular	57
Mantenimiento de líneas celulares	57
Ensayos de viabilidad celular	57
Producción de NO	58
Citometría de flujo	58
PCR cuantitativa en tiempo real	59
Ensayo Western blot	60
Medición de la actividad enzimática	61
Medición de la capacidad adhesiva	62
Medios condicionados	62
Tratamiento con ARNsi	63
Ensayo de migración 2D	63
Ensayo de migración 3D	63
Experimentación in vivo	64
Inyección de células tumorales mamarias dentro de la almohadilla grasa de glándulas mamarias de ratón	64
Inoculación de células tumorales mamarias dentro del conducto galactóforo de glándulas mamarias de ratón	65
Técnicas histológicas	65
Análisis histológicos y determinación de la infiltración linfocitaria (TILs)	66
Inmunomarcaciones	66
Ensayo de inmunofluorescencia en células de cultivo	66
Inmunofluorescencia de cortes de tumores murinos	67
Purificación celular, análisis transcriptómico y selección de genes diana	68
Muestras de tejido humano	70
Análisis de datos de expresión génica	70
Análisis estadístico	70
CAPÍTULO 1: LA INHIBICIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO DISMINUYE EL CRECIMIENTO TUMORAL EN CONJUNTO CON LA ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS	72
Caracterización de un modelo celular murino de cáncer de mama en relación al NO	73
Efecto de la modulación de NO sobre la viabilidad celular	75
Efecto de la modulación del NO en líneas celulares humanas	77
El L-NAME redujo el crecimiento de tumores iNOS positivos	78

La activación de fibroblastos asociados a tumor frente al tratamiento con L-NAME	84
Conclusiones parciales capítulo 1	87
CAPÍTULO 2A: DESARROLLO DE UN MODELO INTRADUCTAL SINGÉNICO. ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS EPI Y MEP EN LA PROGRESIÓN DE ESTADIO IN SITU A INVASOR.	88
Desarrollo del modelo intraductal	89
Caracterización de los tumores intraductales de LM38-LP	92
Rol de la componente EPI y MIO en mecanismos clave de la progresión tumoral	94
Identificación de factores solubles involucrados en el diálogo celular	98
TGF-B1 como factor clave en el diálogo celular	100
Conclusiones parciales capítulo 2a	105
CAPÍTULO 2B: UTILIZACIÓN DEL MODELO INTRADUCTAL COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE SPARC COMO ACTOR CLAVE EN LA PROGRESIÓN TEMPRANA EN CÁNCER DE MAMA	106
Selección de los genes candidatos	108
SPARC en muestras de pacientes	110
Evaluación del rol funcional de SPARC en los procesos de invasión	114
SPARC y la vía molecular de TGF-B como actores claves en el proceso de progresión tumoral	116
Efecto de la inhibición del TGFBR1 a la migración e invasión	121
Efecto In vivo de la inhibición del TGFBR1	122
Conclusiones capítulo 2b	126
DISCUSIÓN	128
El NO como actor pro tumoral en cáncer de mama	129
NO y microambiente	132
Establecimiento de un modelo intraductal singénico para el estudio de cáncer de mama de progresión temprana	134
TGF-B1 como mediador del dialogo entre EPI y MEP	136
Identificación de nuevos blancos moleculares en la progresión temprana del cáncer de mama	137
CONCLUSIÓN	142
BIBLIOGRAFÍA	145

*“Science and everyday life cannot and should not be separated.
Science, for me, gives a partial explanation of life”*

— Rosalind Franklin

Agradecimientos

Este es el cierre de una etapa, pero es el inicio de otra. Son muchos años de trabajo que se plasman en unas ciento setenta páginas pero que en realidad no reflejan todas las horas de vida invertidas para llegar a esta meta. Fueron muchos intentos fallidos, muchas repeticiones, muchos fines escribiendo, mucha ansiedad en presentaciones, que cobran valor al ver todo lo que fui logrando a lo largo de estos años, lo cual no podría haber sucedido sin todo el apoyo que recibí, y del que voy a estar eternamente agradecida.

En primer lugar, quiero agradecer a la educación pública, a mi querida Universidad Nacional de Quilmes (UNQUI). Fue mi hogar durante mis estudios de grado, lugar donde me forme tanto de manera profesional como humana. Tener una universidad pública en la provincia me dio acceso a un título universitario, que quizás no podría haber sido factible de otra manera. La UNQUI continuó siendo mi casa de estudio en mi formación de post grado, dándome la oportunidad de seguir especializándome en mi profesión. Hice mi tesis de grado y doctorado en el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, institución de prestigio en cuanto al tratamiento e investigación del cáncer. Doctorado que fue factible gracias a ser beneficiada por una beca doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a los subsidios otorgados por las distintas entidades estatales de financiamiento a la investigación. Gracias es lo mínimo que puedo decirle a la educación pública por mi formación superior y espero reeditarle todo lo otorgado a través de mi producción como profesional. Instituciones y organizaciones estatales que le abren la puerta a que personas como yo, de clase media e incluso a sectores de la sociedad más segregados económicamente, donde la educación pública es una puerta de ascenso social y una forma de integración. Espero desde lo más profundo de mi ser que la educación pública siga siendo lo que es para la mayoría de los argentinos, un orgullo nacional. La financiación de la educación y la ciencia no es un gasto sino el puente hacia un país más próspero, que es el fin último que todos deseamos para nuestra nación.

Quiero continuar agradeciendo a mi directora de tesis Catalina, mi guía en el camino de la investigación y quien supo inculcar en mi la pasión por descubrir. Gracias por estar siempre disponible (hasta los fines de semana cuando había alguna fecha límite), por creer que siempre podía un poco más y darme la oportunidad de crecer profesionalmente. Gracias Ana por codirigirme, por tu franqueza, disposición y aportar un enfoque alternativo a mi línea de trabajo.

Esta tesis conto con la colaboración de varios profesionales. Comenzando con el Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” quiero agradecer al personal del departamento de bioterio por siempre mostrarse disponibles a colaborar en los ensayos *in vivo*. En particular a Pao que me formo inicialmente en el manejo de animales y fue de gran ayuda en varios experimentos junto con Mari y Marini. Agradecer también al departamento de patología por su colaboración en el procesamiento de las muestras murinas y de pacientes, haciendo especial énfasis en Pilar, José, Lina, Fernanda y Gisella.

Agradecer también a nuestros colaboradores del Centro De Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, en especial a Ezequiel Lacunza por todo su tiempo y dedicación en los análisis bioinformáticos. A nuestros colaboradores del *Institut Curie* de Francia por el aporte del modelo xenogénico y las muestras de pacientes. A el laboratorio CellCoMLab de la *University Medical Center Hamburg-Eppendorf* por recibirme durante mi estadía; en particular a Pablo, gracias por el tiempo dedicado, por el optimismo, por preocuparte no solo por cuestiones laborales sino también de índole humana. Gracias al hermoso grupo que me recibió Tami, Javi, Mari, Anna, David, Subhajit, Johan y Lisa que me hicieron sentir como en casa. Me llevo un hermosos recuerdo de una experiencia que me hizo crecer tanto en lo profesional como en lo personal.

Gracias a todos los investigadores del área de investigaciones de Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” por sus aportes Alejandro, Gabriel, Mariana, Andrea, Marianela, Mariana, Laura, Stella, Giselle, Marta, Marisol, Patricia, Moni y Marce. A Mirta por llevar adelante la parte administrativa del área y siempre encontrar soluciones. A los técnicos: Dari, Leo, Lucho y Seba por contribuir en el día a día. Gracias a los becarios con los que compartí en doctorado y que siempre fueron de gran apoyo en este camino. Gracias a Rosi, Silvi, Aldi Schey, Diego, Dani, Vero, Lu y Tati.

Quiero agradecer al grupo de trabajo del cual formo parte por ser de apoyo durante toda la tesis. A Denu por tus abrazos, tus risas, por tu generosidad y por tu escucha y a su medio pomelo Yani, por siempre estar y por enseñarme con tanto cariño y dedicación. A Edu por las historias y compartir tu principio de lucha popular. Gracias Elsi por tu cariño, inocencia y sabiduría. Gracias Caro por tu franqueza y tus charlas. Gracias Nai por tu sinceridad, tus risas, por compartir lo que ser escorpiana representa y por mostrarme lo lindo que se siente enseñar, un orgullo haber podido acompañarte en tu tesis de grado.

Gracias a los viejos Roffos (yo también soy de los viejos, no me excluyo) por ser el sostén de todos estos años, grandes amigos que me llevo de esta etapa de mi vida. Le quiero agradecer a Maca, mi hermana de doctorado, por toda su ayuda como profesional y sobre todo personal; por las charlas eternas, por las mil anécdotas, por llorar y reír juntas, en resumen, por ser quien sos. Te adoro con el alma (a vos y ahora a Iru también) y gracias por elegirme para ser parte de sus vidas. A Ima por ser ese ser que derrocha optimismo, por esas ocurrencias que solo vos podés tener; tenerte como amigo y compañero hizo que nunca faltaran risas en el doctorado y en la vida. Gracias Aldi y Ju por los días de escritura a los cuales sobrevivíamos a costa de buena comida, gracias por la catarsis y por compartir el último tramo codo a codo. Gracias Lizcha por siempre estar para todo, por la sinceridad que te caracteriza y por las arepas y mouse de maracuyá inolvidables. Gracias Andy por tu elocuencia, por el toque ácido que le agregan al grupo. Agus y Flor gracias por compartir su amistad por fuera de lo laboral, por esas juntadas que sanan el alma de tanta risa.

Afectos por fuera de lo profesional a los que les quiero dar las gracias, porque soy quien soy por tenerlos a ellos en mi vida. Gracias a Pame por ser mi hermana postiza desde el secundario, aunque no nos veamos tan seguido por la vida adulta y las distancias, siempre que nos vemos es como si no pasara el tiempo y sé que siempre vas a estar ahí para darme un hombro en el cual apoyarme. Gracias a Mariel y Marianita por estar siempre presente en casi toda mi vida, mis queridas amigas desde los 3 añitos. Gracias a mis amigos de la facu por las juntadas catárticas: Lau, Caro, Lu, Male y Lei; que lindo es ver como cada uno formo su camino. Un regalo que me dio la cursada de postgrado: Machi, gracias por tu amistad. Gracias Meli mi querida profe de inglés por su

paciencia y disposición, me ayudaste a sobrellevar la traba mental que tenía con el inglés, casi te diría disfrutándolo.

Finalmente, a uno de los pilares fundamentales de mi vida, gracias a mi familia. Gracias mamá, papá y Ro, por hacer que sea quien soy hoy, por darme siempre el amor y apoyo; sé que siempre estuvieron y van a estar ahí para ser el soporte de mi vida, los amo. A todos mis tíos, primos y abuelos, algunos que me miran desde el cielo, gracias por ser parte de mi vida.

Solo puedo decir gracias, gracias y más gracias. Este no es un punto final, es un punto y seguido de lo que vendrá.

Abreviaturas

- AKT:** Gen de la proteína quinasa B
- Alfa-SMA:** Actina de musculo liso alfa
- BRCA:** Gen de cáncer de mama
- CAF:** Fibroblastos asociados a cáncer
- CAM:** Moléculas de adhesión celular
- CLCA2:** Accesorio 2 del canal de cloruro
- DAPI:** 4'-6-diamino-2-fenilindol diclorohidrato
- DCIS:** Ductal carcinoma *in situ*
- DETA NO:** Dietilentiamina/óxido nítrico
- DMEM:** Medio Eagle modificado de Dulbecco
- Ecad:** E-cadherina
- EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- EMT:** Transición epitelio mesénquima
- eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial
- EPI:** Epitelial
- ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares
- FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos
- H&E:** Hematoxilina y eosina.
- HER2:** Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
- IDC:** Carcinoma ductal infiltrante
- IHQ:** Inmunohistoquímica
- iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible
- IP:** Yoduro de propidio
- KI-67:** Marcador de proliferación Ki-67
- L-NAME:** N L-NG-Nitroarginina Metil Ester
- MAPK:** Quinasa activada por mitógenos
- MEP:** Mioepitelial
- MMP:** Metaloproteasa

MT1-MMP: Metaloproteasa de membrana de tipo 1

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

NK: Células *Natural Killer*

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NO: Óxido nítrico

PARP: poli (ADP ribosa) polimerasa

PBS: Tampón fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PDL1: ligando 1 de muerte celular programada

PET-CT: Tomografía por emisión de positrones

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

PTGS2: Prostaglandina Endoperoxidasa sintasa 2

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Ras: Proteína oncogénica 21

RE: Receptor de estrógenos

ROS: Especies reactivas del oxígeno

RP: Receptor de progesterona

RPMI: Medio del Roswell Park Cancer Institute

SCID: Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida

SFB: Suero fetal bovino

siNT ARN: ARN de interferencia corto no dirigido

SMAD: *Small Mothers Against Decapentaplegic*

SNP: SNP

SPARC: Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TFG-B: Factor de crecimiento transformante beta

TGFBRI: Receptor I de crecimiento transformante beta

TIL: Linfocitos infiltrantes de tumor

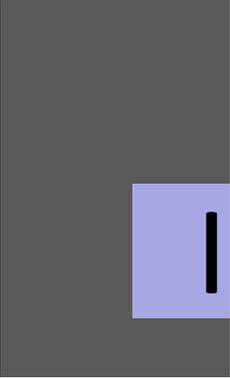
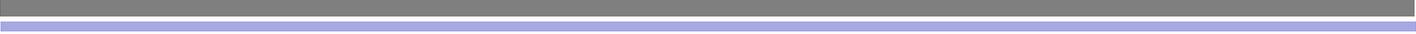
Presentaciones científicas

- **Sciacca M**, Carballo MdP, Lacunza E, Cardozo NP, Rodriguez Padilla N, Marino L, Abba M, Bilbao É, R, Saez PJ, Eiján AM and Lodillinsky C. *SPARC: a potential biomarker of the transition from in situ to Invasive breast cancer*. Seleccionado para presentación oral. Buenos Aires Breast Cancer Symposium 2024. CABA, Buenos Aires, Argentina.
- **Sciacca M**, Carballo MdP, Lacunza E, Abba M, Marino L, Bilbao É R, Eiján AM and Lodillinsky C. *SPARC as a promising biomarker of breast cancer progression*. Reunión conjunta de sociedades de biociencias 2023 SAIC-SAB-AAFE-AACyTAL. Seleccionado para optar a premio Irene Faryna y Roberto Raveglia. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- **Sciacca M**, Carballo MdP, Lacunza E, Marino L, Rocca MF, Abba M, Rojas Bilbao E, Eiján AM and Lodillinsky C. *New biomarkers as putative predictors of breast cancer progression*. Poster. Reunión conjunta de sociedades de biociencias 2022 SAIC- SAI- SAFIS. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- **Sciacca M**, Carballo MdP, Lacunza E, Marino L, Rocca MF, Rojas Bilbao E, Eiján AM and Lodillinsky C. *Evaluación de la implicancia de nuevos blancos moleculares en la transición in situ – invasor de tumores de mama*. Poster. XXXV Jornadas Multidisciplinarias de Oncología del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”. CABA, Buenos Aires, Argentina.
- **Sciacca M**; Zambrano, M; Marino, L; Eiján, AM; Lodillinsky, C. *Implications of TGF-B1 in the early progression of breast cancer*. Argentina. Poster. Buenos Aires. 2021. Buenos Aires Breast Cancer Symposium BA-BCS 2021.
- **Sciacca M**; Zambrano M; Marino L; Eiján Am.; Lodillinsky C. *TGF-B1 implications on luminal myoepithelial dialogue in breast cancer*. Mini oral. Reunión conjunta de sociedades de biociencias 2020 SAIC - SAI - SAFIS. SAIC - SAI – SAFIS. CABA, Buenos Aires, Argentina

- **Sciacca M;** Belgorosky D; Zambrano M; Gomez Escalante Ji; Roca F; Langle YV; Sandes Eo; Lodillinsky C; Eiján AM. *La inhibición de la progresión del cáncer de mama por L-NAME está acompañada de la activación de fibroblastos.* Argentina. Selección para optar el premio Lustig. XXXIV Jornadas Multidisciplinarias de Oncología del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”. CABA, Buenos Aires, Argentina.
- **Sciacca, M;** Belgorosky D; Zambrano M; Gómez Escaclante J; Roca F; Langle Y; Sandes E; Lodillinsky C; Eiján AM. *Inhibition of breast tumor growth by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) is accompanied by activation of fibroblasts.* Mención a poster. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 2019. Reunión conjunta de sociedades de biociencias SAIC.SAFE.SAB.SAP 2019.

Publicaciones con referato

- Inhibition of breast tumor growth by N(G)-nitro-l-arginine methyl ester (L-NAME) is accompanied by activation of fibroblasts. **Sciacca, M;** Belgorosky, D; Zambrano, M; Gomez Escalante JI; Roca F; Langle, Y; Sandes, E; Lodillinsky, C; Eiján AM. Nitric Oxide-Biology and Chemistry. Amsterdam: Academic Press Inc Elsevier Science. 2019 Vol.93 N°. p34 - 34. ISSN 1089-8603.



Introducción



Conceptos generales del cáncer

A nivel mundial el cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia, generando una de cada seis muertes a nivel global. Es además una de las tres principales causas de muerte en personas de entre 30 a 69 años¹. Aunque si bien el cáncer parece una enfermedad ligada a la modernidad, se han encontrado restos humanos con la presencia de neoplasias, por ejemplo de osteosarcomas que datan de millones de años². Sin embargo, la presencia de tumores malignos fue avanzando conforme se incrementó la industrialización y en consecuencia la exposición a agentes carcinogénicos, demostrando la incidencia del ambiente en el desarrollo de cáncer. Afortunadamente en los últimos años, gracias a los avances tecnológicos y la detección temprana, la expectativa de vida de los pacientes se ha incrementado significativamente, pero aún existen múltiples aspectos para mejorar su detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento.

Para entender cómo se genera el cáncer, primero es necesario comprender el estado fisiológico basal. En esta condición, la célula se encuentra en el equilibrio para poder mantenerse dentro de los parámetros considerados normales. En este fenómeno denominado homeostasis, tanto las señales intracelulares como extracelulares se encuentran coordinadas y se rigen por la relación de las células con su entorno. Existen distintos parámetros que se pueden desregular y afectar genes y factores de transcripción claves, implicados en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte, que rompen con ese estado de equilibrio celular. En general, es necesaria la acumulación de dos o más mutaciones iniciadoras (*driver*) que lleven a la célula hacia el estado transformado y posiblemente maligno.

Este proceso de transformación celular requiere de múltiples pasos. En general comienza con daño genético, que pueden ser debido a errores a la hora de llevarse a cabo la división celular, daños a nivel del ADN o mutaciones patogénicas heredadas. De no ser reestablecido el estado celular normal por los distintos mecanismos de salvataje, se acumulan una serie de mutaciones, que implican la desregulación de distintas vías moleculares, por la ganancia de genes oncogénicos o por la pérdida de genes supresores tumorales y le confieren a la célula la capacidad de proliferar sin control y desarrollar

una neoplasia. Esta célula puede multiplicarse desmedidamente de manera clonal e ir seleccionándose para generar un tumor que puede ser benigno o maligno. A medida que el tumor adquiera ventajas adaptativas que le permitan invadir tejidos circundantes, el mismo evolucionará hacia un fenotipo más agresivo y posteriormente colonizará órganos a distancia, proceso se conoce como metástasis³.

Esta transformación celular continua a lo largo del desarrollo de la patología, lo cual hace del cáncer una enfermedad totalmente dinámica y que evoluciona constantemente. Esta heterogeneidad es producto de distintos tipos de cambios a nivel genético, transcripcional, epigenético y/o fenotípico⁴, y se puede clasificar en intertumoral o intratumoral. El primer caso referido a las diferencias que existen entre los tumores de paciente distintos, aunque se clasifiquen histológicamente igual. En el segundo caso, dentro del mismo tumor de un paciente es posible que se desarrollen distintas subpoblaciones de células. De estas variaciones que tiene la patología, surge la necesidad de generar terapias más personalizadas y dirigidas que generen respuestas más eficientes para cada caso.

Características distintivas del cáncer

A medida que se fue avanzando en el estudio del cáncer y en intentar comprender su biología, se pudieron identificar distintas capacidades adquiridas que son clave para el desarrollo de las células tumorales y que atraviesan a los distintos tipos de cáncer. Hanahan y Weinberg se encargaron a lo largo de estos años de clasificar estas características en procesos concretos: inestabilidad genómica y mutaciones, evasión de genes supresores de crecimiento, desregulación del metabolismo celular, angiogénesis, evasión de la apoptosis, promoción de la inflamación, señales de proliferación, replicación ilimitada, procesos de invasión y metástasis, evasión del sistema inmune, desbloqueo de la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética, microbiomas polimórficos y senescencia⁵⁻⁷. A continuación, se describirá brevemente a cada una de ellas (Figura 1).

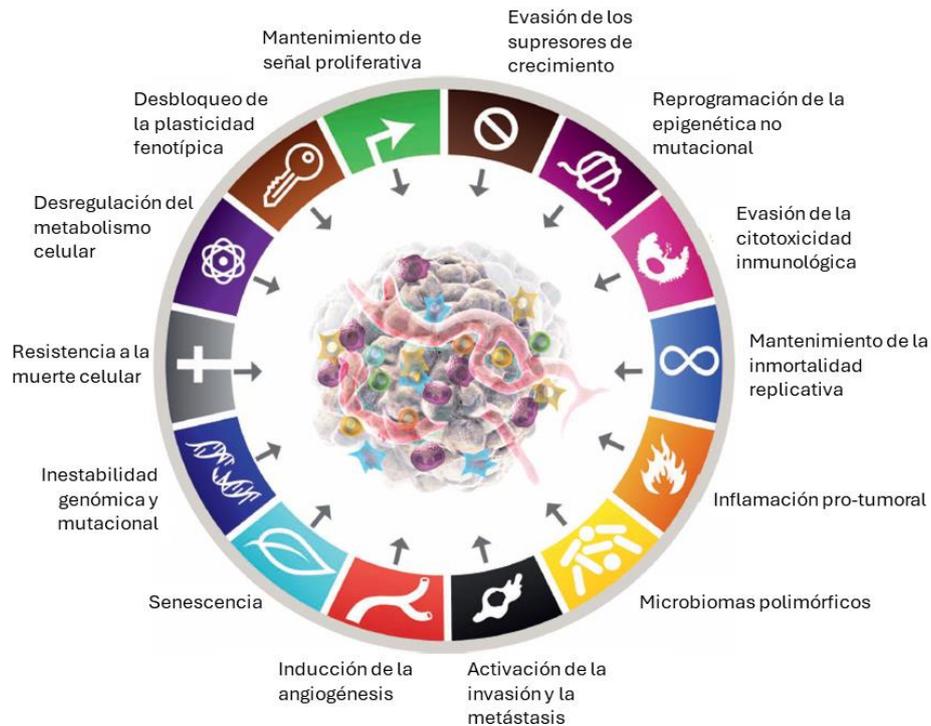


Figura 1.- Características distintivas del cáncer. Las células neoplásicas usan distintas estrategias para adquirir características que le permiten avanzar en el desarrollo de la enfermedad. Adaptado de Hanahan, 2022⁷.

Auto regulación de las señales de crecimiento

En su estado normal las células activan las señales de proliferación según los estímulos del medio. Sin la existencia de estas señales que el ambiente le brinda a la célula, no es posible que se lleve a cabo la división celular. En comparación con la célula normal, la célula tumoral pierde esta capacidad de regularse en función del medio que la rodea y puede dividirse independientemente del entorno, viéndose alterada la homeostasis celular.

Comúnmente la activación de las vías moleculares mitogénicas viene dada por alteraciones en vías extracelulares, o en intermediarios de estas señales o cambios a nivel intracelular. Un ejemplo de este tipo de alteraciones, puede ser el hecho de que la misma célula produzca los factores de crecimientos necesarios para activar sus vías proliferativas de manera cíclica⁸. Otro ejemplo es la sobreexpresión de receptores transmembrana tirosina quinasa, que hiperactiva la señal proliferativa frente a concentraciones normales de sus respectivos ligandos o la activación independiente de

ligando, por interacciones menos específicas debido al exceso de receptores que disminuye la competencia de unión⁹. Un último ejemplo es la alteración de proteínas río abajo a las vías moleculares proliferativas, que afectan la señalización normal y promueven su hiperactivación¹⁰.

Para entender y ahondar en los mecanismos que llevan a la célula tumoral a auto estimular las señales proliferativas uno tiende a simplificar las vías de abordaje, aunque lo cierto es que este proceso viene dado por una desregulación aún más compleja.

Perdida de la respuesta a señales anti proliferativas

En el contexto fisiológico normal, existen señales anti proliferativas que permiten mantener la homeostasis celular mediante el mantenimiento de la célula en un estado quiescente. Estos mecanismos pueden estar dados por el arresto celular en G0, donde la célula se mantiene quiescente o por la inducción del mantenimiento del ciclo celular en un estado más bien post mitótico, característico de las células totalmente diferenciadas.

Al inicio de la transformación tumoral, la célula comienza a evadir estas señales anti proliferativas, a través de cambios que ocurren a nivel de la regulación del ciclo celular. Estos cambios están principalmente vinculados a la transición por la fase G1, donde se censan varios parámetros que determinan si la célula va a proliferar, permanecer quiescente o entrar en el estado post mitótico. Uno de los ejemplos más conocidos de este caso es la alteración en todas sus variantes de la vía de la proteína de la retinoblastoma (pRb)¹¹. De esta manera alteraciones de la respuesta a señales anti proliferativas, señales de diferenciación celular y la maquinaria del ciclo celular tienen un rol clave en el desarrollo del cáncer.

Evasión de la apoptosis

La capacidad de un tumor de expandirse no viene solo dada por el aumento de su capacidad de dividirse sino también por su capacidad de evadir la muerte celular. La maquinaria apoptótica puede dividirse en: aquellas moléculas encargadas de censar las condiciones tanto intra como extracelulares y aquellas encargadas de efectuar el proceso de muerte. Algunos puntos donde la célula tumoral puede sufrir modificaciones

para poder evadir la apoptosis van a estar relacionados con la actividad mitocondrial, como ocurre con la familia de Bcl2, con miembros pro y anti apoptóticos. Algo similar a lo que ocurre con las proteasas intracelulares efectoras de la apoptosis, como la caspasa 8 y la 9¹².

Uno de los mecanismos más conocidos por los cuales la célula tumoral puede evadir la apoptosis involucra la pérdida de la actividad de p53, que en su estado fisiológico normal funciona de manera pro apoptótica, siendo uno de los principales sensores de daño celular¹³. La modulación aberrante de la vía PI3K-AKT/PKB ligada a sobrevivida, es otro ejemplo por el cual la célula también puede evadir la muerte programada. Todas estas modificaciones conllevan a que la célula tumoral pueda evadir la muerte celular y favorecer así su establecimiento y propagación.

Desregulación del potencial replicativo

La ganancia de una capacidad replicativa casi ilimitada es otra de las características que la célula tumoral adopta y que es parte de su biología. De esta manera, la duplicación celular desproporcionada también ayuda a hacerle frente a la alta tasa de muerte, que trae aparejada la división celular descontrolada y aberrante.

En el estado normal, en cada división celular se van acortando los telómeros de los cromosomas, que con lleva a la pérdida de protección de los mismos y tiene como desenlace la muerte celular. Para sobrellevar este freno, la célula tumoral sobre expresa la enzima telomerasa, incluso activa mecanismos de recombinación cromosómica, de manera de mantener la longitud de los telómeros y favorecer la inmortalidad de las células cancerosas¹⁴.

Angiogénesis

Los vasos sanguíneos son los encargados de transportar los nutrientes y el oxígeno que las células necesitan para llevar a cabo todas sus funciones y sobrevivir. La generación de nuevos vasos se encuentra regulada en el organismo. En el caso de la fisiología tumoral, en un principio la capacidad angiogénica se pierde pero a medida que los tumores aumentan de tamaño la misma comienza a aumentar para poder suplir de nutrientes a la masa tumoral¹⁵.

El cambio a nivel angiogénico que realiza la célula tumoral se da gradualmente en las etapas tempranas o medias de progresión, dado que es importante para promover la expansión clonal. La activación de la formación de nuevos vasos viene dada por un cambio en el balance de inductores e inhibidores angiogénicos. Los inductores más conocidos son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF1/2); mientras que dentro de los inhibidores es posible destacar a la trombospondina ^{16,17}. La desregulación de estas moléculas puede venir dada por cambios en la expresión, cambios mediados por factores de transcripción o desregulaciones a nivel de proteasas. Estos mecanismos variaran según el subtipo de la enfermedad.

Invasión y metástasis

Tanto al inicio de la progresión tumoral como conforme avanza la enfermedad, es posible que se desarrollen células cancerosas con la capacidad de invadir el tejido circundante y colonizar sitios distantes. A través del mecanismo de invasión y metástasis, la célula cancerosa es capaz de adaptarse y formar nuevos focos de la enfermedad¹⁸.

La invasión y la metástasis requieren cambios ligados a mecanismos celulares de anclaje y activación de proteasas. El primer caso involucra inmunoglobulinas e integrinas. El segundo parámetro involucra la sobreproducción de metaloproteasas (MMPs) y la disminución en la producción de inhibidores de MMPs¹⁹. La activación de proteasas y la alteración de las uniones específicas de E-cadherina, moléculas de adhesión celular (CAMs) e integrinas son cambios claves en la adquisición de la capacidad de invadir y metastatizar.

Reprogramación del metabolismo energético

La célula tumoral incrementa la utilización de la vía metabólica que no utiliza oxígeno para la producción de energía, es decir, la vía de la glucólisis^{20,21}. Para ello la célula regula positivamente los transportadores de glucosa, como GLUT1²². Otro factor que estimula la vía glucolítica es el ambiente hipóxico, el cual se empieza a generar en los tumores cuando las células comienzan a proliferar y no reciben el oxígeno necesario

por la falta de acceso de los vasos sanguíneos²³. Se ha visto que las células tumorales se pueden clasificar en al menos dos subpoblaciones según el metabolismo energético, una que va a ser dependiente de glucosa y que va a producir lactato; y otra que consume el lactato de su población vecina para generar energía. Esta es otra de las características que le permiten a la célula tumoral independizarse del contexto y continuar progresando²⁴.

Evasión del sistema inmune citotóxico

Inicialmente el sistema inmune está encargado de reconocer y eliminar las células neoplásicas que se generen. Particularmente se ha observado que las células CD8+ y las células NK tienen un rol clave en erradicar el cáncer. Existen distintos mecanismos que favorecen que la célula tumoral evada al sistema inmune, algunos ejemplos son: la producción de factores inmunosupresores y el reclutamiento de células inmunes con actividad inmunosupresora como son los linfocitos T regulatorios y las células mieloides supresoras. De esta manera el balance hacia el ambiente inmunosupresor, contribuye a que la célula tumoral desarrolle todas sus características intrínsecas²⁵.

Desbloqueo de la plasticidad fenotípica

Otra de las características que identifica a la célula tumoral es la capacidad de des-diferenciarse para ganar características de célula tipo progenitora. Esto le permite a la célula adaptarse dentro del dinamismo que caracteriza a la enfermedad y continuar sobreviviendo y progresando, incluso frente a los tratamientos. Los ejemplos más comunes del desbloqueo de la plasticidad celular están dados por la des-diferenciación a estados de tipo célula progenitora, bloqueo de la diferenciación y la trans diferenciación a linajes celulares distintos²⁶.

Reprogramación epigenética

Existen cambios en el ADN que están ligados a la disposición y disponibilidad de la cromatina, que tienen un impacto directo en la expresión de genes, esta modulación se conoce como cambios epigenéticos. Esta es otra forma de reprogramar el genoma utilizada por la célula tumoral para adaptarse y progresar²⁷.

Microbiomas polimórficos

Existen distintos microorganismos simbióticos que habitan en el cuerpo humano y que sirven como barrera ante distintos patógenos. En el cáncer también se ha visto que la variabilidad polimórfica del microbioma tiene un gran impacto en la variabilidad fenotípica de la enfermedad. Inicialmente se ha descrito que determinadas bacterias pueden impactar en la proliferación tumoral. El efecto de la microbiota sobre otras características del cáncer, que estuvimos discutiendo previamente, continua en estudio²⁸.

Senescencia

La senescencia es otro de mecanismo de arresto celular usado por el organismo para mantener la homeostasis. En la patología tumoral, se ha visto que las células pueden arrestar su ciclo celular como mecanismo de resistencia frente al tratamiento con terapias oncológicas. En este estado quiescente la célula puede evadir el sistema inmune y permanecer en el paciente hasta que algún cambio en el contexto tumoral, generalmente asociado a la interacción de la célula con la matriz extracelular y la evasión del sistema inmune, propicie un entorno favorable para volver a proliferar²⁹.

Cáncer de mama

El cáncer de mama sigue siendo una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial, a pesar de los avances que se han dado a nivel del diagnóstico y el tratamiento³⁰. Su letalidad radica principalmente en la diseminación de la enfermedad y la posibilidad de recidivas. La posibilidad de sobrellevar el tratamiento que tienen algunas células tumorales, radica en la heterogeneidad de la enfermedad tanto a nivel molecular como clínico. A continuación, ahondaremos en los distintos aspectos a tener en cuenta para entender la patología mamaria.

Glándula mamaria

La glándula mamaria forma parte del aparato reproductor femenino y es el órgano encargado de producir y secretar la leche luego del embarazo. Se la clasifica como una glándula apocrina, ya que secreta minúsculas gotas de grasa que se suman a la leche materna.

La glándula mamaria está formada por piel, parénquima y estroma (Figura 2). El pezón y la aureola conforman la piel de la glándula mamaria, el primero formado principalmente por fibras musculares, mientras que la aureola situada alrededor del pezón presenta una gran cantidad de glándulas sebáceas que se activan durante el embarazo y la lactancia. El parénquima de la glándula mamaria está principalmente formado por conductos ramificados, que se irradian hacia el pezón y lóbulos secretores (Figura 3 superior derecha). Los conductos se ensanchan hacia los acinos encargados de coleccionar la leche, que se libera cuando el bebé succiona. Por su parte, el estroma va a presentar áreas fibrosas y de grasa, que se disponen en los espacios entre los lóbulos y los conductos³¹.

En cuanto a la estructura histológica de la glándula mamaria, los ductos y lóbulos van a estar formados por dos tipos celulares: las células basales y las luminales ubicadas hacia el lumen de los conductos y lóbulos se caracterizan por expresar los receptores hormonales (Figura 2 inferior derecha). Las células basales rodean a las luminales y se encargan de sintetizar y secretar los componentes de la membrana basal con la cual están en contacto. Estas células basales contienen actina que le confiere la capacidad contráctil, ayudando que la leche producida por las células luminales fluya a través de los ductos mamarios³².

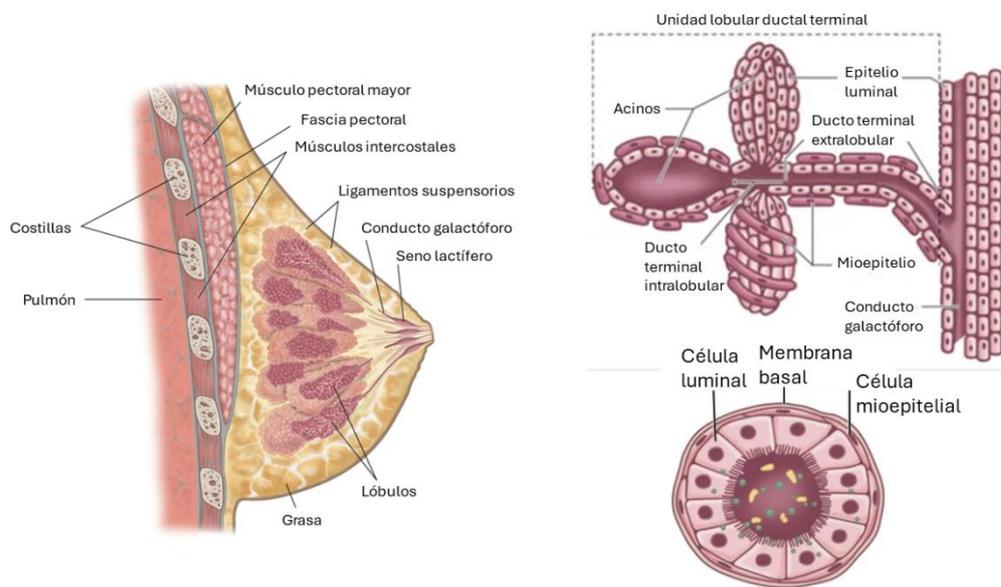


Figura 2.- Estructura de la glándula mamaria. A la izquierda se muestra una representación de la glándula mamaria femenina modificada de Encyclopedia Britannica, 2024. Arriba a la derecha se muestra una representación de la unidad ducto-lobular terminal. Abajo en la misma línea se muestra el epitelio del ducto mamario. Ambas imágenes adaptadas de *Breast Anatomy*, Sandy C. Lee³³.

Epidemiología, incidencia y mortalidad

Se estima que a nivel mundial el cáncer de mama se ubica en el primer lugar de incidencia, con una tasa de 46.8 cada 100.000 habitantes. En cuanto a la mortalidad, es el primer tipo de cáncer en causar defunciones en mujeres, con una tasa de 12.7 cada 100.000 habitantes (Figura 2). Por su parte, Argentina es uno de los países con mayor incidencia y mortalidad de cáncer de mama en la región de Latinoamérica³⁰.

En nuestro país el cáncer de mama se ubica en primer lugar en incidencia con un porcentaje 16.8% en una población de N=130.878, con una tasa bruta de 24,4 defunciones cada 100.000 mujeres ^{34,35} (Figura 3). Si bien la tendencia en cuanto a la mortalidad entre los años 2002-2022 es a la baja a un ritmo de -1,0 % anual, la tasa bruta aún continúa siendo reamente alta³⁴. Este panorama nos da cuenta de que es necesario continuar estudiando la patología para mejorar el diagnóstico precoz y el subsecuente tratamiento de los pacientes. El abordaje local, desde una perspectiva geográfica, permite afrontar el estudio de la enfermedad teniendo en cuenta las características regionales de nuestro país y sus requerimientos específicos, otorgándole mayor precisión al tratamiento. En el presente trabajo se analizan muestras de pacientes del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” y gracias al trabajo interdisciplinario se ha podido contribuir a comprender más en profundidad la patología mamaria en un contexto autóctono.

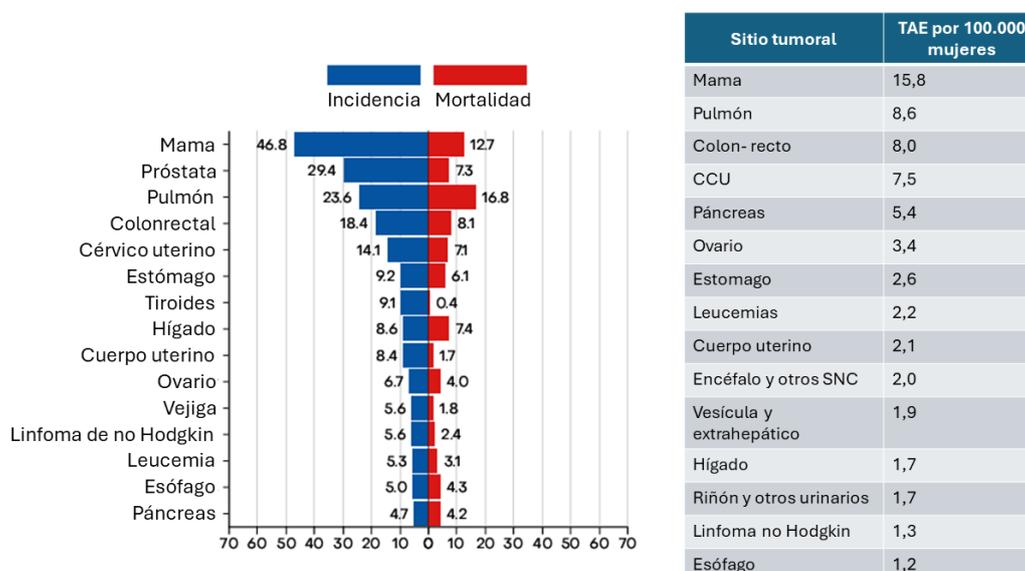


Figura 3.- Epidemiología del cáncer. A la izquierda se muestra la incidencia y mortalidad por cáncer a nivel global, según Globocan 2022³⁰. A la derecha se muestra la mortalidad por cáncer en mujeres según las tasas ajustadas por edad cada 100.000 habitantes, 2022³⁴.

Factores de riesgo

Existen varios factores que pueden contribuir al desarrollo de la patología mamaria, uno de ellos es el factor hereditario. Cerca del 5-10% de los cánceres de mama están ligados a mutaciones heredadas, comúnmente relacionadas a BRCA1 y BRCA2. Otras mutaciones menos comunes que conllevan al cáncer de mama están asociadas a los genes ATM, TP53, CHEK2, PTEN, CDH1, STK11 y PALB2. A su vez el riesgo puede aumentar según el grado de relación de la persona con el familiar que presentó cáncer previamente. A su vez si una persona tuvo cáncer de mama y la cirugía fue conservadora, tiene mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en la mama contralateral o la misma mama. Existen también factores de riesgo asociados a la etnia, por ejemplo, las mujeres caucásicas es más común que desarrollen cáncer de mama, pero las mujeres africanas y americanas tienen una mayor probabilidad de muerte a causa de esta enfermedad.

Si bien el testeo genético puede favorecer la detección temprana o prevenir el avance de la enfermedad, lo cierto es que solo es necesario en determinados casos. Sumado a ello es un análisis costoso y que no todas las coberturas médicas costean, de manera que en la actualidad y en nuestro país no es un método utilizado inicialmente como tamizaje.

Existen otros factores de riesgo no relacionados a la herencia que también tienen un rol determinante en el desarrollo de cáncer. El tratamiento previo con radio terapia, la exposición a dietilestilbestrol, factores relacionados al estilo de vida como la obesidad, el sedentarismo y el consumo excesivo de alcohol, la terapia de remplazo hormonal, no tener hijos, menarca temprana o una menopausia tardía; son otros de los factores de riesgo relacionados a la generación de cáncer de mama³⁶.

Clasificación del cáncer de mama según análisis histopatológico

El cáncer de mama se puede clasificar según su origen en carcinoma o sarcoma. El primero asociado a las células epiteliales de los ductos y lóbulos, y el segundo a las células estromales; sin embargo, un mismo tumor puede ser heterogéneo en cuanto al origen de su composición. Los carcinomas son los tumores más frecuentes y a su vez estos se pueden subdividir patológicamente según por ejemplo el grado de invasión, entre otros aspectos (Figura 4).

Según el grado de invasión en general se pueden dividir en tres grupos: no invasivos, invasivos y metastásicos. Dentro de los primeros vamos a encontrar al carcinoma ductal *in situ* (DCIS), donde la célula neoplásica va a estar confinada dentro del ducto mamario y suele considerarse una lesión pre-invasiva. En los tumores infiltrantes, la célula tumoral va a estar colonizando el estroma y las áreas circundantes. Según el tejido y las células de origen, se pueden encontrar más frecuentemente el carcinoma ductal infiltrante (IDC) generados a partir del ducto mamario, y en segundo lugar, el carcinoma lobulillar infiltrante. Ambos tienen características intrínsecas que van a determinar el abordaje y tratamiento del paciente. Por último, el cáncer de mama metastásico es el estado más avanzado en el cual se puede diagnosticar a la enfermedad, siendo los sitios más comunes de metástasis los nódulos linfáticos, pulmón, hígado, huesos y cerebro³⁷.

Subtipos histológicos

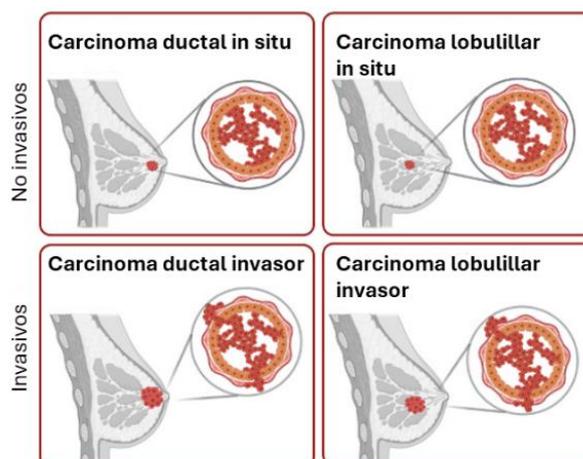


Figura 4.- Subtipos histológicos de cáncer de mama. Según la localización y estado de progresión la patología mamaria puede clasificarse en distintos grupos aquí ilustrados. Biorender.

Existen otras variantes menos frecuentes de cáncer de mama como son el cáncer de mama inflamatorio, cáncer de mama en hombres, niños y adolescentes, enfermedad de Paget, el carcinoma papilar, tumor de filoides y el angiosarcoma de mama.

Terapias dirigidas y la clasificación molecular del cáncer de mama

La heterogeneidad que caracteriza la patología mamaria ha alentado a profundizar en su clasificación, con el fin de mejorar las perspectivas de pronóstico y tratamiento de los pacientes. En la clínica generalmente la clasificación más utilizada y determinante de tratamiento se basa principalmente en la evaluación marcadores de proliferación, la expresión de receptores hormonales de estrógeno (RE), progesterona (RP) y el enriquecimiento en el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)³⁸. Continuando con el contexto clínico, en los últimos años se ha sumado la evaluación de los genes de cáncer de mama BRCA1 y BRCA2, si existe algún factor asociado a herencia en la historia familiar del paciente, y sumando a ello, con el advenimiento de las inmunoterapias, también se pueden evaluar marcadores asociados.

Más allá de los tratamientos asociados a la clínica, se ha continuado estudiando la heterogeneidad subyacente a la patología mamaria y la primera clasificación plenamente molecular fue posible con el sistema PAM50. A partir de perfiles de expresión genéticos relacionados a receptores de estrógeno, expresión de HER2 y genes asociados a la característica basal fue posible obtener la categorización que se lista a continuación³⁹ (Figura 5).

- Luminal A: caracterizado por la expresión de RE y RP, son negativos para HER-2 y tienen bajos niveles de ki-67. Es uno de los subtipos más comunes, con una frecuencia del 40% respecto a todos los cánceres de mama. Se caracterizan por ser de bajo grado histológico, crecimiento lento y mejor pronóstico. La terapia antihormonal es su principal tratamiento. La mutación el PIK3K es la más frecuentemente en este caso.
- Luminal B: es el segundo subtipo más frecuente, se caracteriza también por la sobreexpresión de RE y RP, puede ser tanto HER2 negativo como positivo (LUMB/HER2) y tiene un alto ki-67. Tiene un crecimiento más rápido y en consecuencia, un peor pronóstico que el luminal A. Es el subtipo más

frecuentemente asociado a mutaciones en BRCA2⁴⁰. Responden mejor a inhibidores de aromatasas.

- Enriquecido en HER2: se encuentra en aproximadamente el 10- 15% de los casos de cáncer de mama. Este subtipo es negativo a RE y RP, mientras que tiene una alta expresión de HER2. Este grupo no se caracteriza simplemente por expresar HER2 sino que el gen esta amplificado a nivel del ADN. Estos tumores crecen más rápido que los previamente mencionados y su pronóstico es en consecuencia más desfavorable, pero cuentan con la ventaja de poder ser tratados con terapias dirigidas contra HER2.
- Tipo basal: dentro de este subtipo tenemos a los tumores triples negativos (negativos para RE, RP y HER2), con una tasa de aparición cercana al 20%. Generalmente están asociados a mutaciones germinales en BRCA1 y es el subtipo más agresivo y de peor pronóstico. En general se tratan con quimioterapia convencional, salvo aquellos que tengan mutaciones BRCA 1 y 2 que pueden tratarse con inhibidores de poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP). Adicionalmente en este grupo se sumó el subtipo bajo en claudina ⁴¹.
- Tipo Normal: se caracteriza por ser muy similar al subtipo luminal A pero con baja o nula expresión de RE y/o RP junto con bajos niveles de ki-67. A pesar de ser similares este subtipo tiene peor pronóstico que el luminal A.

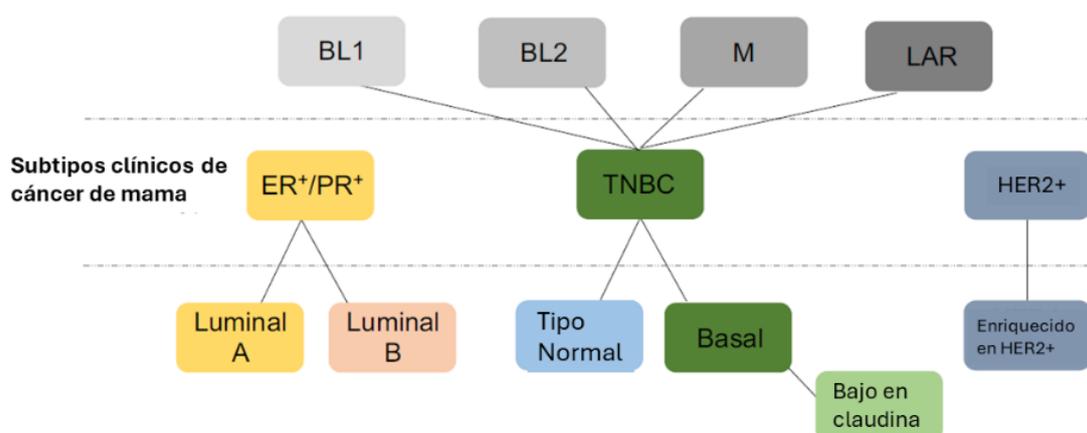


Figura 5.- Clasificación molecular del cáncer de mama. El diagrama representa las distintas clasificaciones partiendo de la clínica hacia la clasificación PAM50 e incorporando la subclasificación del subtipo TNBC. Adaptado de Turner, 2021⁴².

A su vez dentro de lo que se considera el grupo triple negativo hay una clasificación adicional planteada por Lehmann et al. Donde se pone en evidencia la heterogeneidad que presenta este grupo, en este trabajo encuentran seis subgrupos: basal tipo 1 y 2, inmuno modulado, mesenquimal, de tipo célula madre mesenquimal, y luminal con receptores androgénicos⁴³.

A pesar de estas clasificaciones, la patología mamaria es dinámica a lo largo de la enfermedad. Se ha visto que existe plasticidad dentro de los tumores que le permiten adquirir características de otro subtipo, distintas a las que tenían inicialmente. Este dinamismo dentro del tumor le confiere ventajas adaptativas y en consecuencia, resistencia al tratamiento y favorecimiento de la diseminación metastásica⁴².

Diagnóstico, clínica y tratamiento

El diagnóstico de cáncer de mama se hace en base a estudios imagenológicos. Para los casos no palpables y sin sintomatología aparente, esta es la única opción de detección. En estadios más avanzados se suma la sintomatología, imágenes y anatomía patológica. El diagnóstico por imágenes es el segundo punto importante en el diagnóstico de la enfermedad. Según la edad de la paciente y el riesgo, se podrá indicar ecografía mamaria y mamografía con sus variantes, resonancia magnética y Tomografía por Emisión de Positrones combinada con Tomografía Computada (PET-CT). Existe también asistencia por imagen para la toma de muestra, en el caso de sospecha de alguna lesión; sin embargo, la decisión final en la forma de toma de la biopsia dependerá del tipo de tumor o lesión. En la biopsia se valorarán receptores hormonales, HER-2 y marcadores de proliferación. En el caso de la sospecha de metástasis, se incluirán otros estudios explorativos por imágenes⁴⁴.

Clínicamente se va a abordar la enfermedad según el estadio de progresión en el cual se encuentre la misma. La clasificación se basa en los criterios TNM: tumor (T), nódulos (N) y metástasis (M)⁴⁵ (Tabla 1). Para ello se tiene en cuenta el tamaño y extensión del tumor primario, el número de nódulos linfáticos positivos y la presencia de metástasis. Dentro de las lesiones clasificadas como estadio 0 vamos a encontrar el DCIS y lobulillar *in situ*. Los tumores invasores se van a clasificar dentro de los estadios

1-3 según el tamaño tumoral, y número y tamaño de los ganglios afectados. Por último en el estadio 4 se incluye la enfermedad metastásica⁴⁶.

Tumor (T)	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Tumor <2 cm
	T2	Tumor 2-5 cm
	T3	Tumor >5 cm
	T4	Tumor con extensión a piel o pared torácica.
Nódulo linfático (N)	N0	Nódulo regional conservado.
	N1	Ipsilateral, afectación de los ganglios linfáticos axilares.
	N2	Afectación ganglionar axilar ipsilateral o ganglios mamarios internos ipsilaterales.
	N3	Ganglios infraclaviculares o supraclaviculares ipsilaterales, o ganglios mamarios internos ipsilaterales en combinación con ganglios axilares.
Metástasis (M)	M0	Sin metástasis a distancia.
	M1	Con metástasis a distancia.

Tabla 1.- Clasificación TMN. Simplificación del sistema de estadificación anatómica según el estado del tumor, nodo linfático y metástasis. Modificado de Katsura, 2021⁴⁷.

El tratamiento de los pacientes va a depender de cada caso en particular, pero en general puede incluir una combinación de cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapias dirigidas y terapia endocrina. La cirugía puede ser conservadora seguida de radioterapia o mastectomía con posibilidad de reconstrucción; en el caso de que no se pueda conservar tejido sano, ya sea por la extensión de la lesión o por la presencia de mutaciones en BRCA1/2, se recomienda la remoción completa de la mama. En los casos en los cuales sea necesario reducir el tamaño del tumor previo a la cirugía, se tratará al paciente con quimioterapia neoadyuvante para que el tumor pueda ser operable.

Carcinoma ductal *in situ*

Como se mencionó anteriormente el estadio DCIS es un tipo de lesión neoplásica no invasiva, que suele detectarse cuando se evidencian microcalcificaciones agrupadas por mamografía. Histológicamente se lo clasifica según el grado nuclear, que tiene en cuenta

distintas características morfológicas de los núcleos celulares, en relación con el tamaño, orientación, cromatina, nucléolo y mitosis. En cuanto al patrón histoarquitectural se puede clasificar en sólido, cribiforme, papilar, micro papilar (no comedo) y tipo comedociano o cualquier otra variante⁴⁴.

En los últimos 20 años con el advenimiento y el avance de las imágenes biomédicas la detección de estas lesiones aumento significativamente. Con una tasa de frecuencia de aparición de cerca de un 20% en relación a todos los estadios del cáncer de mama y una mortalidad asociada muy baja⁴⁸.

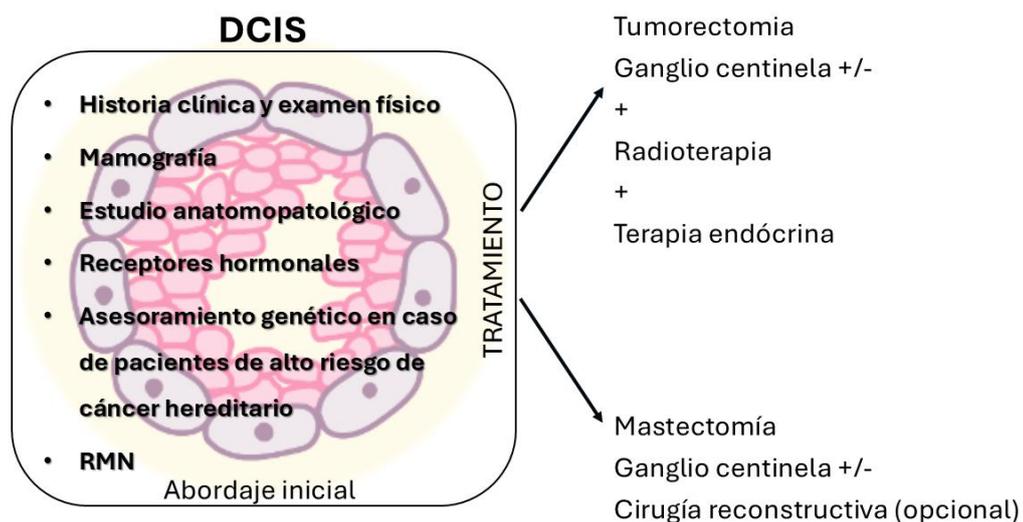


Figura 6.- Tratamiento de lesiones DCIS. Algoritmo de tratamiento para lesiones DCIS propuesto en las Pautas del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo 2023⁴⁴.

Dado que son lesiones que actualmente se tratan principalmente por cirugía y posterior radioterapia o terapia endócrina (en el caso de expresar receptores hormonales), es muy difícil contar con casos clínicos donde se pueda seguir la evolución de la enfermedad y si estas lesiones progresan o no hacia el estadio invasor⁴⁴ (Figura 6). Existen trabajos retrospectivos donde se estudió la evolución de cohortes pequeñas de pacientes en las cuales se hallaron lesiones premalignas que si evolucionaron a estadios avanzados de la enfermedad. En estos trabajos entre un 25-60% de los casos progresan a un estadio invasor de la enfermedad en un periodo que ronda los 9-24 años luego del diagnóstico del mismo. El riesgo a progresar hacia el estado invasor de la enfermedad aumenta según el grado nuclear^{49,50}. A pesar de que aumentó la detección temprana, aun no es posible determinar con precisión que lesiones DCIS progresaran a

IDC, por lo cual aún no es posible disminuir el sobre tratamiento o evitar la recaída en caso de cirugía conservadora.

Transición *in situ*- invasor

Aun no se comprenden completamente los mecanismos que llevan al carcinoma *in situ* a progresar a un estadio invasor. Existen distintos modelos que intentan explicar la transición temprana a partir de la heterogeneidad tumoral. En este caso se listan cuatro que intentan responder esta pregunta: el modelo independiente de linaje, evolutivo de cuello de botella, de invasión multiclonal y de fenotipo convergente (Figura 7).

El primer modelo a diferencia de los otros sugiere que los tumores DCIS e IDC tienen orígenes diferentes, basándose en la idea de que no todos los carcinomas ductales *in situ* progresan al estadio invasor y en el hecho de que no comparten las mismas características. Aunque esto último justamente se puede explicar por el dinamismo que de por sí presenta la enfermedad^{51,52}.

En el caso del modelo de evolución en cuello de botella se hipotetiza que, durante esta transición, solo un pequeño número de células del tumor *in situ* son seleccionadas para formar un único clon, que es capaz de romper ese cuello de botella evolutivo y progresar hacia el estadio invasor. En este modelo se destaca la selección clonal y la disminución de la diversidad clonal⁵³.

Por otro lado, en el modelo de invasión multi clonal difiere del anterior en que no se basa en la existencia de un solo clon, sino en que varios clones son capaces de escapar e invadir en conjunto. Dentro de esta teoría existen otras dos sub hipótesis: una en la que los múltiples sub clones cooperan mutuamente para invadir; mientras que en otro escenario, se plantea la posibilidad de que entre estos múltiples clones exista un clon líder y otros que lo siguen⁵³.

Finalmente hago referencia al modelo de fenotipo convergente, en el cual a partir de varios cambios a nivel genómico las células ganan un fenotipo con características más invasivas que les permite progresar⁴.

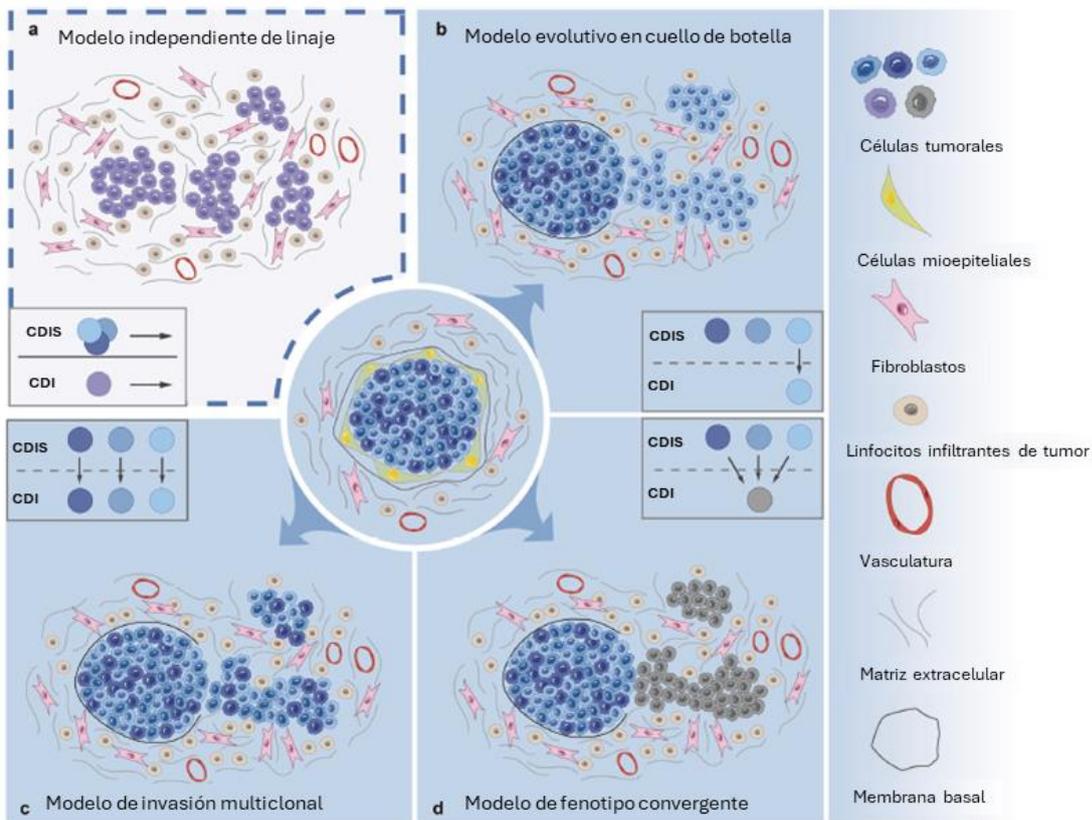


Figura 7.- Modelos de progresión de los carcinomas *in situ*. Se representan los distintos modelos de progresión temprana: modelo independiente de linaje, evolutivo en cuello de botella, de invasión multi clonal y de fenotipo convergente. Adaptado de Wang, 2024⁵⁴.

Si bien existen estos modelos, aun es necesario continuar estudiando el proceso de progresión de los carcinomas *in situ* para esclarecer los mecanismos que lo lleva a cabo. Seguramente en este proceso se incluyan otros actores que forman parte del microambiente, que permitan en conjunto dicha transición. Sumado a ello es probable la célula utilice estos modelos de manera dinámica para poder adaptarse y llevar adelante la enfermedad, es decir que no son excluyentes, sino que se pueden dar de distintas maneras de acuerdo al contexto, estadio de progresión y al paciente.

Modelos murinos

Tipos de modelos

Los modelos en animales son utilizados como una aproximación para evaluar los mecanismos biológicos y los efectos de nuevos tratamientos en el campo de la investigación. En este caso ahondaremos en los distintos modelos animales que pueden utilizarse para el estudio del cáncer de mama, teniendo en cuenta las distintas ventajas y desventajas a la hora de su utilización.

En el caso de animales no mamíferos encontramos *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *zebrafish* y gallinas, que se suelen utilizar como modelos para evaluar el crecimiento, migración y metástasis. Por similitud a los humanos, los roedores son los más comúnmente usados para experimentar. En cuanto a las desventajas del uso de mamíferos, se sabe que son experimentos más extensos en el tiempo y en consecuencia más costosos.

Dentro de los tipos de modelos que se pueden utilizar en experimentación tenemos los modelos espontáneos, que ocurren frecuentemente en ratones y varían según las cepas. También es frecuente encontrar tumores espontáneos en perros, gatos, musaraña arborícola y monos. Los tumores espontáneos en perros dan un buen acercamiento para el estudio de la patología, dado que comparten un 80% de su genética con humanos, sumado a que están expuestos a entornos similares y un sistema inmune activo. La ventaja de estos tipos de modelos es que ocurren naturalmente, de manera que responden a problemáticas reales pero su frecuencia de aparición y latencia es bastante baja.

Los modelos inducidos son aquellos que se generan por la administración de algún carcinógeno, como puede ser 7, 12 dimetilbenz(a) antraceno (DMBA), radiación y la utilización de lentivirus para sobre expresar o silenciar algún gen en particular. Estos sistemas tienen alta tasa de incidencia, tiempos cortos de latencia y resultados más reproducibles, pero su contraparte es la baja eficiencia y características patológicas diferentes. Además, que pueden variar sus resultados según la edad del animal, el historial reproductivo y su estado hormonal al momento del experimento⁵⁵.

Otro modelo muy utilizado son los animales transgénicos, que se generan a partir de la expresión específica de algún oncogén utilizando promotores específicos de tejido, por ejemplo, en ratones podemos encontrar los modelos MMTV-PyMT y MMTV-c-neu. Por otro lado, también es posible silenciar genes, en particular utilizando el sistema de recombinación Cre/loxP o el sistema más usado actualmente que es CRISPR-Cas. Este último es mucho más eficiente y puede noquear varios genes a la vez. Sumado a ello la expresión de los genes puede ser inducible o no, utilizando el sistema *Tet-off*. Las ventajas de estos sistemas es que el o los genes a silenciar son conocidos, de manera que el objetivo es claro y en general se conserva el sistema inmune. Sus desventajas son que no suelen desarrollar una patología histológicamente similar a la que se ve en humanos, y además su producción suele tener un costo elevado. Sumado a ello, en general los cambios genéticos solo ocurren a nivel de la célula epiteliales, lo cual no imita la complejidad de la patología mamaria⁵⁶.

Finalmente, los modelos de trasplante son aquellos en los que se inoculan células o tejidos en animales de experimentación. Existen distintos modelos murinos de cáncer de mama que se diferencian según el sitio de inyección y la línea celular elegida. La inyección puede ser ortotópica o heterotópica, es decir, en el sitio de origen de la enfermedad o en un sitio distal. Según el origen genético de las células y el huésped, el trasplante de células cancerosas puede ser singénico o xenogénico. En el caso de que el trasplante sea singénico, las células a inyectar y el ratón tienen el mismo origen genético, lo cual evita una reacción inmunológica grave. Los modelos xenogénicos se utilizan cuando se quieren estudiar líneas humanas. Se emplean ratones inmunodeficientes, donde no va a ser posible tener en cuenta el sistema inmune como actor de la patología⁵⁵.

La inyección en el *fat pad* (almohadilla grasa) de la mama suele considerarse como el modelo ortotópico de este tipo de cáncer, tiene la capacidad de formar tumores invasores primarios en la mama y luego desarrollar metástasis. Sin embargo, la inoculación intraductal es una de las mejores alternativas para generar tumores que imiten el proceso de progresión temprana del cáncer de mama, pero no todas las líneas celulares son capaces de lograrlo. Con esta técnica es posible seguir la transición de la neoplasia desde su estadio *in situ* hasta la invasión. En ratones, se realiza una incisión

en el pezón de la glándula mamaria, de manera que la suspensión del orden de los microlitros se puede introducir directamente en el árbol galactóforo con un volumen^{57,58} (Figura 8). Estas técnicas serán las utilizadas en presente trabajo.

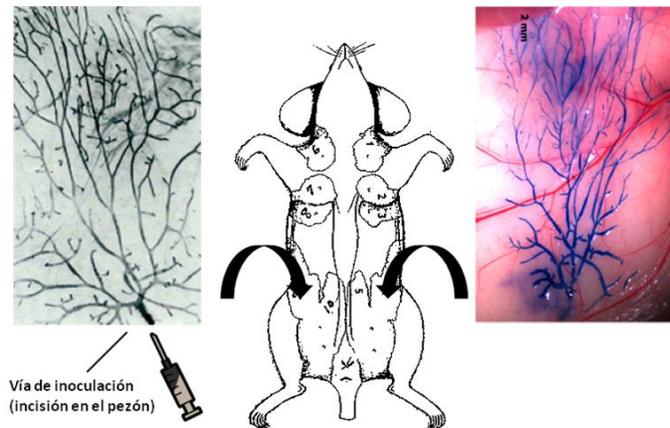


Figura 8.- Inyección intraductal de la glándula mamaria de ratón. Se puede observar la correcta inoculación a través del pezón de una suspensión celular coloreada con azul de tripano. Modificado de Behbod 2009⁵⁷ y Krause 2013⁵⁹.

Líneas celulares de cáncer de mama de origen murino

Líneas celulares mamarias LMM3, LM3 y LM2

En nuestro instituto contamos con modelos celulares murinos derivado de los cultivos primarios de los adenocarcinomas mamarios M3 y MM3. Las líneas están formadas por un solo tipo celular y presentan una morfología poliédrica con características epiteliales. Ambas líneas LM3 y LMM3 forman tumores que metastatizan en pulmón; sin embargo, la línea LMM3 tiene una latencia mayor⁶⁰.

Además, contamos con otra línea también derivada de un carcinoma mamario denominado M2, pero morfológicamente fibroblastoide aunque con un origen epitelial. Esta línea forma también metástasis en pulmón y es hormono independiente, dado que crece independientemente de que el hospedador sea macho o hembra⁶¹.

Modelo LM38

Como se mencionó previamente los ductos y lóbulos de glándula mamaria están formados por dos tipos celulares: las células luminales con características más epiteliales (EPI) y las células basales con características más mioepiteliales (MEP). La mayoría de los

tumores mamarios tienen un origen EPI. El rol de la célula MEP suele describirse como antitumoral pero que es un tema de discusión en el campo⁶². Son escasos los modelos que permiten estudiar el rol de la célula MEP asociada al tumor, particularmente su papel en el tumor DCIS, donde no está del todo claro si esta población puede transformarse en algún punto de la progresión y favorecer el avance de la enfermedad⁶³.

Las líneas celulares usadas para el estudio de cáncer de mama generalmente están compuestas por un solo tipo celular (células EPI), de manera que no se tiene en cuenta el rol de la célula MEP en la tumorigénesis y progresión tumoral. En el bioterio del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” se ha descrito y continúa en estudio, un modelo celular murino de cáncer de mama denominado M38. Este tumor surgió espontáneamente en una hembra BALB/c preñada y fue caracterizado como un adenocarcinoma papilar ductal, capaz de generar metástasis en pulmones y ganglios linfáticos⁶⁴.

La característica principal de este modelo es que está formado tanto por la población EPI como la MEP. Además se cuenta con tres líneas derivadas del tumor M38: la línea mixta denominada LM38-LP compuesta por células EPI y MEP; la línea LM38-HP, enriquecida en la componente EPI; y la línea LM38-D2 conformada por la componente MEP⁶⁵⁻⁶⁷. Además, presenta una población stem/progenitora, capaz de reconstituir un tumor *in vivo* con las mismas características del M38⁶⁸.

Las células LM38-LP se caracterizan por formar islotes celulares en los cuales la componente EPI central es negativa para actina de musculo liso (alfa-SMA), mientras que la componente MEP que rodea a la anterior presenta una tinción fibrilar positiva para alfa-SMA⁶⁵. Por su parte la línea celular LM38-HP se caracteriza por no expresar alfa-SMA, mientras que esta marcación si se observa en la línea celular LM38-D2. Adicionalmente, sólo la componente EPI de las LM38-LP son positivas para E-cadherina, ya que se determinó que tanto LM38-HP como LM38-D2 no expresan esta proteína.

En cuanto a la clasificación molecular, el modelo LM38-LP es también clínicamente relevante, ya que coincide con los tumores mamarios humanos hormono independientes, agresivos y de alto grado. De esta manera LM38 constituye un modelo preclínico de gran relevancia.

Líneas celulares de cáncer de mama de origen humano

MDF10DCIS.com

A partir de la relevancia que cobro el diagnóstico de carcinomas ductales *in situ* gracias a la evolución de las tecnologías de imagen, fue necesario el desarrollo de modelos preclínicos que permitan estudiar este estadio de la enfermedad. En este contexto surge la línea MCF10DCIS.com a partir de una lesión xenogénica obtenida luego de dos pasajes por trocar de una lesión premaligna de MCF10AT. Luego de 22 repiques la línea fue capaz de formar tumores subcutáneos de tipo comedo en ratones inmunosuprimidos. Los mismos generaban estructuras similares a carcinomas ductales *in situ* de alto grado. Estos tumores se caracterizaron por estar formados por estructuras tubulares, varias de ellas con centros necróticos⁶⁹.

Posteriormente esta línea celular fue utilizada por Fariba Behbod para generar tumores ductales luego de la inoculación intraductal. De manera que refleja la progresión de la enfermedad al igual que ocurre en la patología mamaria. Los tumores generados a partir de la inoculación intraductal de MCF10DCIS.com mostraron un patrón cribiforme con características de tumores de subtipo basal. No todas las líneas son capaces de generar tumores que simulen la progresión temprana, por ejemplo, otras líneas como las MCF-7 forman tumores invasores o en el caso de la línea FSK-H7 no progresan al estadio invasor⁵⁷.

Óxido nítrico en cáncer de mama

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que juega un rol muy importante en distintos procesos fisiológicos como neurotransmisión, vasodilatación e inmunidad mediada por macrófagos. Además, actúa como segundo mensajero y tiene un papel dual en la regulación del cáncer⁷⁰.

El NO es producido por un grupo de enzimas denominadas NO sintasas, que convierten con la ayuda de varios cofactores y en presencia de oxígeno, la L-Arginina en NO. Esta enzima presenta varias isoformas en mamíferos: la neuronal nNOS (NOS1), inducible iNOS (NOS2) y la endotelial eNOS (NOS3). Estructuralmente estas enzimas son

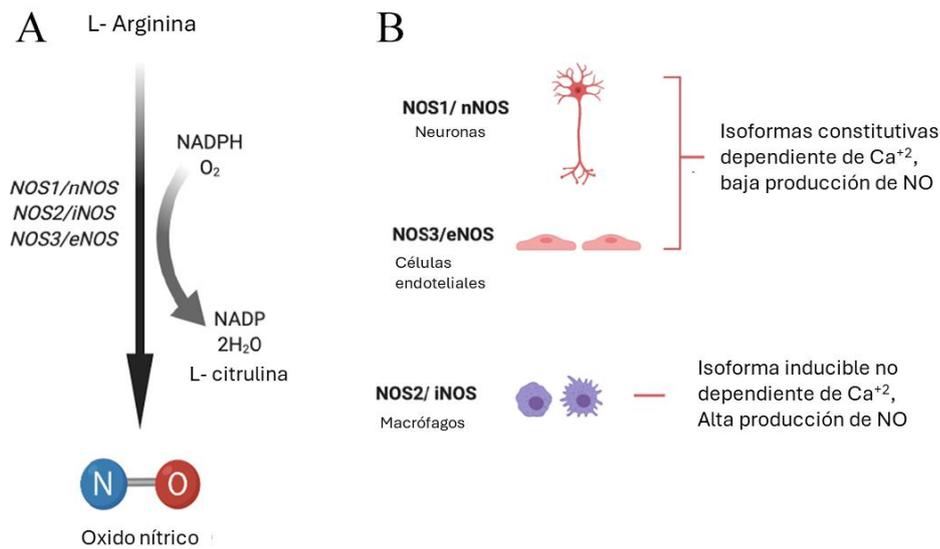


Figura 9.- NO en cáncer de mama. Síntesis del óxido nítrico (A) y las isoformas de NOS (B). Modificado de Mishra, 2019⁷².

homodímeros y aunque son codificadas por tres genes distintos presentan gran homología⁷¹. La activación de las isoformas NOS1 y NOS3 es dependiente de calcio y producen bajos niveles de NO (del orden de nanomolar), además se expresan de manera constitutivas en células endoteliales y neuronas respectivamente. Por otro lado, la isoforma inducible no es dependiente de calcio y produce mayores niveles de NO (del orden de micromolar). iNOS se regula en general transcripcionalmente a través de distintas citoquinas, endotoxinas bacterianas y estrés oxidativo; mecanismos íntimamente relacionados a la respuesta inmune⁷⁰ (Figura 9).

La alta concentración este radical puede inducir cambios por estrés oxidativo o nitrosativo y generar metabolitos reactivos capaces de inducir daño en el ADN⁷⁰. La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) puede provocar: mal funcionamiento de la actividad mitocondrial, S- nitrosilación, desregulación de distintas señales celulares e interacción con lípidos. Particularmente la S- nitrosilación puede afectar a nivel post traduccional la regulación de varias proteínas y sus funciones.

En cáncer de mama, el NO tiene un rol dual dependiendo de su concentración y su contexto, ya que varía si su producción y acumulación es intra o extracelular. Particularmente se ha visto que el NO derivado de iNOS favorece la progresión de cáncer

de mama a partir de distintas vías celulares vinculadas a hipoxia, proliferación y supervivencia⁷³. La alta expresión de iNOS ha sido asociado a peor pronóstico en el subtipo basal de cáncer de mama. Además, se vio que la alta producción de NO intracelular promueve la S-nitrosilación que a su vez activa varios mecanismos pro tumorales, por ejemplo vía receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)⁷⁴. En cáncer de vejiga el grupo de trabajo del cual formo parte, demostró que la sobreexpresión de iNOS en muestras de pacientes es un factor de mal pronóstico^{75,76}.

En trabajos previos se demostró que la línea LM2, que no produce niveles apreciables de NO, fue sensible al agregado de donador de NO, nitroprusiato de sodio (SNP). Por su parte, las líneas LM3 y LMM3 productoras de altos niveles de este radical libre mostraron menor toxicidad frente al tratamiento con SNP⁷⁷.

Inhibidores del NO

La actividad de iNOS se puede inhibir por competición directa con L-Arginina de manera reversible o irreversible. Los primeros inhibidores fueron derivados de la arginina: la L-nitroarginina (L-NAME) y L-N ω -monometilarginina (L-NMMA)⁷⁸. Por su parte estos inhibidores no son selectivos de iNOS, sino que inhiben en general a las 3 isoformas y tienen la desventaja de causar hipertensión en ratas y humanos^{79,80}. Otros inhibidores competitivos, que se basan en la inactivación más selectiva de iNOS, son la aminoguanidina, L-NIO, L-NIL, entre otros. A partir de modificaciones de bisisotiourea, por un cambio en la guanidina de la L-arginina por una porción de amidina y una de esas amidinas por la carga positiva de una amina, surgió el 1400W como inhibidor específico de iNOS⁸¹.

El otro mecanismo por el que suelen actuar los inhibidores está relacionado a la inhibición de la dimerización de iNOS. Dentro de estos inhibidores tenemos la familia de los imidazoles que puede coordinar el hierro del grupo hemo de las NOS. Ejemplos de estos compuestos son el antifúngico clotrimazole e imidazopirimidinas, que son más específicas de iNOS^{82,83}.

En la clínica normalmente los inhibidores de iNOS están indicados para cuadro séptico o dolor. Sin embargo, estos inhibidores han demostrado tener algunos efectos

adversos al aumentar la disfunción cardíaca⁸⁴. Además de sus principales usos, se ha visto que tienen efecto en otras patologías, como enfermedades neurológicas, diabetes, enfermedades respiratorias e incluso el cáncer. En cáncer se ha visto que los inhibidores de iNOS han demostrado efectos antitumorales en varios modelos *in vivo* como en melanoma y cáncer de mama^{85,86}. En la presente tesis estudiaremos el efecto de la inhibición en la producción de NO en la progresión del cáncer de mama usando L-NAME.

Microambiente asociado al tumor

Como ya se mencionó anteriormente, una de las características esenciales de la patología mamaria es la contribución del microambiente al desarrollo y progresión de la enfermedad. Dentro de ese microambiente podemos encontrar a los fibroblastos, que son las células estromales encargadas de organizar y mantener la integridad del tejido.

Los fibroblastos tienen un rol clave en la homeostasis de la matriz extracelular: se encargan de producción de los componentes de la misma y de secretar metaloproteasas encargadas de degradarlos, favoreciendo así la remodelación⁸⁷⁻⁸⁹. También tienen un rol clave en la inflamación y cicatrización de tejidos^{88,90}. Marcadores específicos de este tipo celular son alfa-SMA, proteína de activación de fibroblastos (FAP), S100A4, vimentina y receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α)⁹¹. Además, son los principales actores en el desarrollo de la fibrosis tanto en el contexto normal como patológico. Los fibroblastos se activan frente al proceso de inflamación y adoptan el fenotipo de miofibroblastos, transformándose en los principales productores de colágeno.

Los fibroblastos en un contexto normal en comparación con los fibroblastos asociados a tumor (CAF) tienen otro perfil fenotípico. En esta transformación sufren una transición epitelio-mesénquima (EMT), que promueve la fibrosis asociada al tumor a través de mecanismos autocrinos, que favorecen la proliferación y estimulan la progresión del cáncer. Sin embargo, al ser una población tan heterogénea y variable a lo largo del desarrollo de la enfermedad presentan un rol dual en el contexto tumoral, pudiendo tener efectos pro tumorales o antitumorales. El primer escenario se asocia con la inmunosupresión y el segundo con la depleción de vías relacionadas a la fibrosis, que generan tumores más agresivos y poco diferenciados. Esto nos habla de que el

proceso fibrótico es contexto dependiente y que puede favorecer o inhibir la progresión de la enfermedad bajo distintas condiciones⁹².

Línea murina de fibroblastos embrionarios

La línea NIH/3T3 es una línea celular de fibroblastos que fue aislada a partir de embriones de ratón NIH/Swiss. Dado que la línea fue establecida a partir de embriones completos presenta diferentes subtipos de fibroblastos. Sin embargo, el establecimiento de la línea y los sucesivos pasajes favorecieron la homogenización de la misma. Utilizaremos esta línea como modelo celular para evaluar *in vitro* el efecto de la inhibición de la producción del NO sobre los fibroblastos.

Biomarcadores en cáncer

Los biomarcadores se definen como moléculas biológicas que se pueden encontrar en fluidos o tejidos corporales, que nos den cuenta de si un proceso es normal o anormal⁹³. Dentro de las aplicaciones clínicas que tienen los biomarcadores vamos a encontrar: la detección temprana que facilita el diagnóstico precoz con métodos no invasivos, diagnóstico confirmatorio específico en el caso de la utilización de paneles más globales de biomarcadores, predicción del pronóstico del paciente y evaluación de la recurrencia. El tejido tumoral es el primer sitio donde uno puede encontrar estos marcadores, pero no siempre es simple acceder a la muestra. Otras fuentes a partir de las cuales es posible medir biomarcadores producidos en respuesta al tumor pueden ser los fluidos corporales, como la sangre, orina, heces y saliva.

Los biomarcadores tienen la ventaja de ser una forma sensible, específica, rentable y reproducible de detectar y monitorear el riesgo de un tumor y poder clasificarlo, de manera que los pacientes reciban una medicina más personalizada y ajustada a su realidad individual. Además, permiten que el médico pueda evaluar el progreso, regresión y/o recurrencia de los pacientes. Existen distintas moléculas que pueden ser usadas como biomarcadores, entre ellas vamos a encontrar las inmunoglobulinas, hormonas, y enzimas.

En las últimas décadas con el avance de la ciencia y la tecnología, la identificación de biomarcadores se ha incrementado rápidamente. Las tecnologías de

alto rendimiento como la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica hacen posible obtener información a gran escala, que ha permitido la identificación de biomarcadores putativos. Además, el advenimiento de la medicina de precisión hace necesario llevar el campo de los indicadores tumorales hacia otra nueva etapa, que requiere el descubrimiento de biomarcadores más efectivos y la integración de varios de ellos para formar paneles de expresión que permitan una medicina de precisión.

Selección de genes candidatos

Como se describirá más adelante en los resultados de esta tesis, en el grupo de trabajo del cual formo parte, ya se viene trabajando en la identificación de nuevos genes candidatos a estar involucrados en la progresión temprana del cáncer de mama. A partir del modelo intraductal de la línea de cáncer de mama MCF10DCIS.com en ratones SCID, se obtuvieron tumores *in situ* que progresaron espontáneamente hacia el estadio invasor. La expresión de MT1-MMP (Metaloproteasa de membrana de tipo 1) se vio asociada a la membrana plasmática de células del frente de invasión. A partir de su expresión diferencial fue posible investigar moléculas vinculadas a esta enzima como posibles indicadores de progresión temprana de cáncer de mama ^{94,95}.

MT1-MMP forma parte de la familia de metaloproteasas que se encuentran ancladas a membrana. En la progresión tumoral, su principal función es degradar de manera directa componentes de la matriz extracelular, como colágeno de tipo I y III o de manera indirecta, a través de la activación de MMP2 y el clivaje de colágeno tipo IV. Esta metaloproteasa es de las más caracterizadas dentro de su familia y tiene un rol clave en la invasión y metástasis de la célula tumoral⁹⁶⁻⁹⁸. MT1-MMP se la ha visto expresada en varios tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos y células epiteliales⁹⁹. En cáncer está asociada a mal pronóstico¹⁰⁰. Se ha identificado que la regulación de la expresión de MT1-MMP esta mediada por el factor de transcripción p63 y su modulación inducida por la interacción con componentes de la matriz extracelular, como colágeno tipo I⁹⁴. A través de este mecanismo se demostró que MT1-MMP es esencial en la transición *in situ*-invasor de cáncer de mama.

Valiéndonos de la expresión diferencial de la enzima MT1-MMP se separaron dos poblaciones celulares por citometría de flujo y se analizaron por RNAseq (resultados que

se presentan en el capítulo 2b). En un estudio previo del Dr. Abba y col., se realizó la caracterización completa de carcinomas ductales *in situ* de alto grado humanos (DCIS-HG). Se identificaron dos subgrupos de DCIS (DCIS-C1 y DCIS-C2) donde DCIS-C1 está asociado a un peor pronóstico¹⁰¹. Fue interesante el hallazgo de 3 genes en común con los sobre expresados en el DCIS-C1 y ninguno con los del grupo DCIS-C2: ciclooxigenasa 2 ó *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2* (PTGS2 ó COX-2), *Chloride Channel Accessory 2* (CLCA2) y *Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich* (SPARC). La activación de estos genes y su asociación con un fenotipo más agresivo los coloca en un lugar relevante a ser considerados como targets a estudiar en la transición al estadio invasor del carcinoma mamario.

COX2

La COX2 es una enzima que cuenta con un dominio de transmembrana, puede hallarse en la membrana del retículo endoplasmático, y en las membranas internas y externas del núcleo celular¹⁰². Es una proteína de vida corta, que es blanco farmacológico en el tratamiento del dolor y la inflamación. Es la enzima responsable de la generación de prostanoides como la prostaglandina E2, que contribuye en varios mecanismos pro tumorales^{103,104}. En células normales casi no se expresa pero sí esta expresada frecuentemente en los focos tumorales de varios tipos de canceres asociada a mal pronóstico¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. En la clínica, en cáncer de mama de estadios tempranos se ha visto que la co expresión de ki67, COX-2 y p16 podrían ser indicadores de recurrencia¹⁰⁸. La asociación entre SPARC y COX-2, ya ha sido reportada en cáncer de mama HER-2 enriquecido en el caso de la enfermedad metastásica¹⁰⁹.

CLCA2

El gen CLCA2 codifica para el regulador del canal de cloro activado por calcio de tipo 2, que pertenece a una familia encargada de regular el transporte de cloro a través de la membrana plasmática. Se sabe poco de su rol en cáncer, aunque mayormente se le asocia un rol supresor tumoral, dado que se ha encontrado baja expresión de este gen en muestras de cáncer nasofaríngeo, colorrectal, linfoide y de mama de alto grado en comparación con muestras de bajo grado¹¹⁰. En cáncer de mama su rol es controversial, por ejemplo al evaluar su expresión en líneas celulares humanas de cáncer de mama se

ha reportado que CLCA2 tendría un rol supresor tumoral al reducir la invasión *in vitro* y la metástasis en ratones^{111,112}. Sin embargo, Purrington y colaboradores en 2020 asociaron su expresión a mal pronóstico en una cohorte de tumores triple negativos de cáncer de mama¹¹³.

SPARC

SPARC o también conocida como osteonectina es una glicoproteína dependiente de calcio que forma parte de la matriz extracelular, que abunda en los tejidos mineralizados, como los huesos¹¹⁴. Esta proteína pertenece a la familia de moléculas encargadas de regular y remodelar la matriz extracelular¹¹⁵.

SPARC tiene tres dominios bien conservados. El dominio amino terminal es la región ácida con la capacidad de unirse a calcio y que contiene la mayor proporción de epítopes inmunológicos. El dominio de tipo folistatina rico en cisteína, regula la proliferación de células endoteliales y se puede unir a activina, inhibina, heparina y proteoglicanos. El último es el dominio C terminal extracelular de unión a calcio, que incluye sitios de interacción con células endoteliales y distintas formas de colágeno fibrilar¹¹⁶. Por su parte, SPARC es una proteína asociada a la remodelación del colágeno, favoreciendo su estabilidad y modulando la fibrogénesis del mismo¹¹⁷. Su sitio de unión a colágeno está localizado entre el dominio extracelular (EC) que se solapa con el dominio estructural “mano EF” donde las siglas hacen referencia a las hélices, y que tiene afinidad por los dominios triple hélice de colágeno de manera calcio dependiente¹¹⁸ (Figura 10).

En cuanto a su relación con la patología tumoral, previamente se ha reportado que SPARC está asociado con el desarrollo tumoral y es un actor clave en la invasión y metástasis¹¹⁹. Se ha observado una alta expresión de esta proteína en melanoma, meningioma, cáncer de riñón y cáncer de próstata¹²⁰⁻¹²². En cáncer de mama particularmente se ha visto que la alta expresión de SPARC está asociada al estado TNM y al grado histológico¹²³. Su rol en la célula neoplásica durante la progresión temprana no ha sido del todo estudiado, ni tampoco los mecanismos por los cuales podría llevar a cabo este proceso.

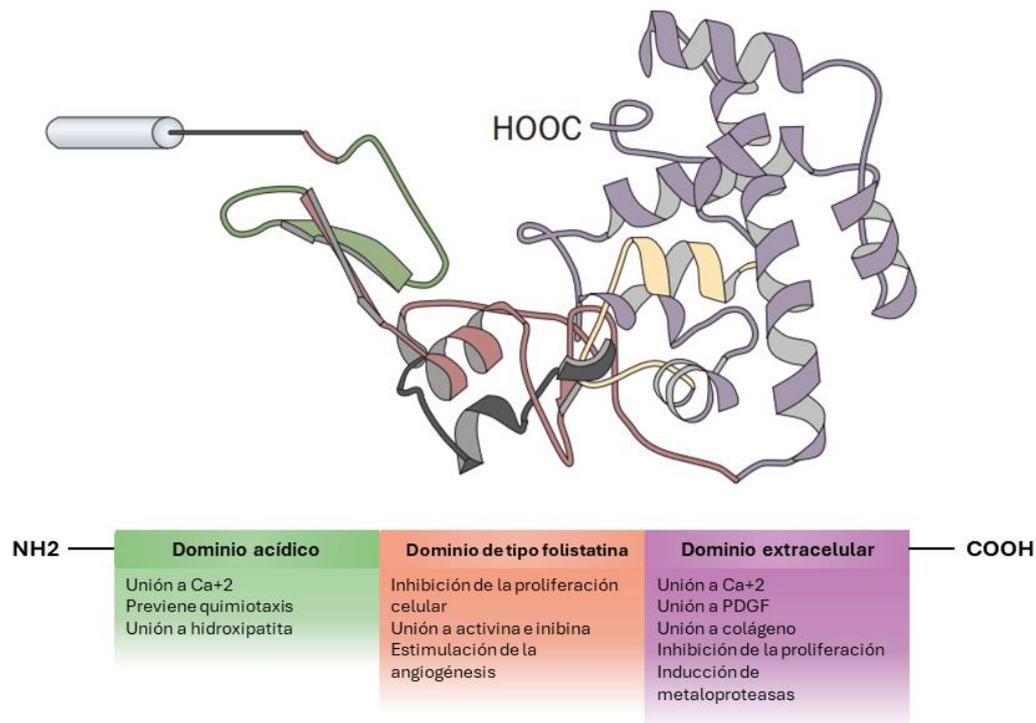


Figura 10.- Estructura y funciones de SPARC. Se muestra la cristalografía de SPARC con los dominios identificados con los respectivos colores. Además, se listan las funciones asociadas a cada dominio. Adaptado de Katarina Kos and John P. H. Wilding, 2010¹²⁴.

La vía de TGF- β 1 en cáncer y sus inhibidores

La señalización mediada por factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un mecanismo molecular que desencadena múltiples efectos biológicos relacionados al desarrollo, mantenimiento y regeneración de tejidos¹²⁵. En condiciones normales, se encargan de mantener la homeostasis de los tejidos restringiendo la proliferación y estimulando la apoptosis. Su rol en la patología tumoral es compleja y dual dependiendo del contexto, pudiendo tener un efecto supresor o promotor tumoral¹²⁶.

Se definen dos vías de señalización, la canónica y la no canónica. En el primer caso la activación de la vía deriva en la fosforilación en cascada de proteínas SMAD, que produce la translocación al núcleo del complejo con SMAD-4 y la modulación de genes blanco-específicos¹²⁷ (Figura 11). Por otro lado la vía de TGF- β también puede activarse de forma no canónica, que incluye la vía de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) como ERK, JNK y p38 MAPK; así como vías dependientes de GTPasas pequeñas, en algunas condiciones fisiológicas o patológicas¹²⁸. En general se van a activar mecanismos relacionados a la EMT, apoptosis y arresto celular.

Los antecedentes aquí descritos dan cuenta de la relevancia que tiene la modulación de la vía molecular de TGF-B en la patología tumoral, siendo relevante estudiarla en la progresión temprana del cáncer de mama. A nivel funcional, la asociación entre TGF-B1 y SPARC ha sido descrita previamente, sin embargo, su funcionalidad en la progresión temprana en cáncer de mama es escasa en la literatura¹³⁰⁻¹³².

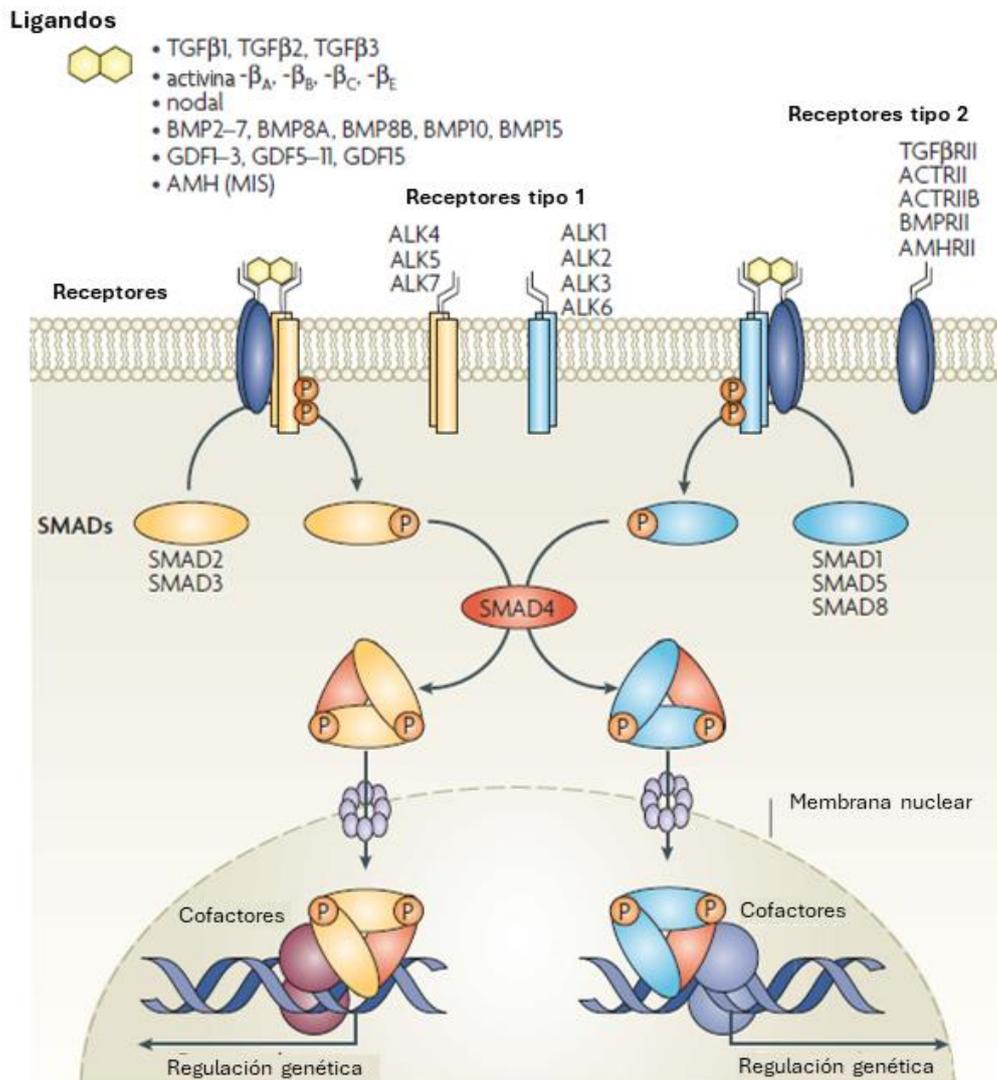


Figura 11.- Vía molecular de TGF-B1. En este caso se describe la activación canónica a partir de la cascada de fosforilación de SMADs. Adaptado de Schmierer y Hill, 2007¹²⁹.



Hipótesis y Objetivos



Hipótesis general

Los modelos preclínicos en animales de experimentación son de gran utilidad para el estudio de mecanismos de progresión tumoral, que pueden emplearse como herramientas para estudiar nuevos blancos terapéuticos, que contribuyan al desarrollo de una medicina de mayor precisión.

Objetivo general

El objetivo de este proyecto es estudiar distintos actores claves en la progresión del cáncer de mama.

Hipótesis y objetivos particulares

Hipótesis 1: La producción exacerbada de NO es un factor de sobrevida que favorece el crecimiento y la progresión tumoral en el cáncer de mama.

Objetivo 1: Evaluar el efecto de la inhibición de la producción de NO en la progresión del cáncer de mama *in vitro* e *in vivo*, empleando el modelo de inoculación en *fat pad*.

Hipótesis 2a: El desarrollo de un modelo intraductal murino inmunocompetente es de gran importancia para estudiar procesos clave de la transición *in situ*-invasor. Distintas componentes tumorales colaboran en los diferentes estadios de progresión.

Objetivo 2a: Desarrollar un modelo murino de crecimiento intraductal, para estudiar la progresión temprana en cáncer de mama, a partir de la línea mamaria mixta LM38-LP. Estudiar la contribución de las poblaciones EPI y MEP en procesos biológicos de sobrevida, migración, invasión e infiltrado inflamatorio

Hipótesis 2b: El modelo *in vivo* intraductal imita la patología humana de cáncer de mama, siendo SPARC un gen implicado en la transición *in situ*-invasora.

Objetivo 2b: Validar el uso del modelo intraductal como herramienta para estudiar la progresión temprana haciendo foco en el rol de la proteína SPARC. Abordar el mecanismo molecular a través del cual SPARC lleva a cabo su rol pro invasivo en la transición del estadio *in situ* al estadio invasor y compararlo con lo observado en tumores mamarios de pacientes en distintos estadios de progresión.



Metodología



Ensayos de cultivo celular

Mantenimiento de líneas celulares

Para el estudio de la modulación del NO y su efecto en la progresión tumoral se utilizaron líneas celulares murinas de cáncer de mama establecidas en nuestra Área de Investigación caracterizadas como hormono independientes: LM3 (CVCCVCL_D269), LMM3(CVCL_D270)⁶⁰ y LM2⁶¹. LM3 y LMM3 se mantuvieron en medio de cultivo MEM (Gibco). La línea celular LM2 se cultivó en medio de cultivo RPMI (Gibco). La línea celular MDA-MB-231 (CVCL_0062) fueron cedidas amablemente por Instituto de Biología y Medicina Experimental (Ibyme), CONICET y se mantuvieron en DMEM F12 (Gibco). La línea celular MCF10DCIS.com se adquirió a Asterand (Detroit, MI, EE.UU.) (CVCL_5552) y se mantuvo en medio DMEM-F12. La línea celular de fibroblastos NIH-3T3 (ATCC) (CVCL_0594) se mantuvo en DMEM bajo en glucosa (Gibco).

Para la generación del modelo intraductal singénico y el estudio del rol de las poblaciones celulares mamarias, se utilizaron líneas celulares murinas derivadas de un adenocarcinoma papilar ductal diferenciado espontaneo: LM38 – LP (CVCL_B7PY), LM38 – HP (CVCL_B7PX) y LM38 – D2 (CVCL_B7PZ)⁶⁵. Todas las líneas LM38 se mantuvieron en medio DMEM F12 (Gibco). La línea MV-1-Lu (CVCL_0593) se utilizó como línea sensible a la modulación del TGF-B1 y se mantuvo en medio de cultivo RPMI (Gibco).

Todos los medios de cultivo se suplementaron con 2 mM de L-glutamina, 80 µg/ml de gentamicina y 5-10% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios, Argentina) en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. Se realizaron pasajes seriados de monocapas confluentes con tripsina (0,25% de tripsina y 0,075% de EDTA en PBS libre de CA⁺⁺ y Mg⁺⁺).

Ensayos de viabilidad celular

Para el estudio del efecto de la modulación del NO, se cultivaron 3x10³ células/100 µl en placas de 96 pocillos con las células LM3, LMM3, LM2 y NIH-3T3. Luego de 24 h de incubación, se añadió L-NAME (Santa Cruz) (2mM) o DETA/NO (250, 125 y 62 µM) y se cultivaron las células durante 48hs o 24hs. En este caso se evaluó la viabilidad a partir del efecto sobre la actividad metabólica utilizando el ensayo MTS 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio según las especificaciones del fabricante (Promega).

También se evaluó por el mismo método de MTS la sobrevivencia de las líneas del modelo LM38 al exponerse a medios suplementados con 1% y 5% de SFB por 24hs. Por otro lado, para el estudio del efecto de la modulación de la vía de TGF- β las células se cultivaron en la misma concentración anteriormente mencionadas en placas de 96 pocillos utilizando las líneas MV-1-Lu y las tres líneas que conforman el modelo LM38. Luego de 24hs, se les añadió TGF- β 1 (2 ng/ml, Peprotech) o SB431542 (20 ng/ml, StemCell), y las células se cultivaron durante 48hs más con dichos tratamientos. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de cristal violeta.

Por último, para determinar el efecto del silenciamiento de SPARC sobre la proliferación celular, se evaluó luego de 48 hs post silenciamiento la concentración celular por conteo directo con azul de tripano de las líneas MCF10DCIS.com y LM38-LP.

Producción de NO

Se determinó la producción de NO en sobrenadantes de líneas celulares LM3, LMM3 y LM2 tras 24hs con o sin la adición de L-NAME, utilizando una modificación del método de Griess¹³³. La liberación de NO se estimó como acumulación de nitrito en el medio condicionado, comparando las absorbancias obtenidas contra una curva estándar de nitrito de sodio.

Citometría de flujo

Para identificar la proporción de células muertas por apoptosis o por necrosis se utilizó el principio de que las células apoptóticas exponen temporalmente fosfatidilserina en su membrana plasmática a la cual se une la anexina V conjugada a FITC y con Ioduro de propidio (IP) que solo ingresa a las células con membrana permeable, es decir, no viables. Para la detección de estos eventos se utilizó un kit comercial, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Biosciences). Se procesaron 10.000 eventos (células) de cada condición experimental utilizando el citómetro de flujo AccuriTM C6 Plus (BD Biosciences). Los resultados se analizaron en el programa

FlowJo™ 10.6.2 (BD Biosciences) y se presentaron como porcentaje de células en apoptosis o necrosis con respecto control ya sea tratadas o no con L-NAME.

PCR cuantitativa en tiempo real

Se evaluó la expresión a nivel transcripcional de iNOS en las líneas murinas LM3, LMM3 y LM2, y en las líneas humanas MDC10DCIS.com y MDA-MB-231. Por otro lado, se evaluó la expresión de E-cadherina, alfa-SMA y TGF- β 1 en las tres líneas LM38. En el capítulo 2b se evaluó la expresión de SPARC y MT1-MMP en la línea murina LM38-LP y la línea humana MCF10DCIS.com. Los *primers* utilizados se especifican en la Tabla 3.

Para tal fin, se extrajo el ARN utilizando TRI Reagent® (MRC Inc, USA) con un protocolo convencional por fenol-cloroformo. A partir del extracto se sintetizó ADNc por RT-PCR utilizando el kit de retro transcripción SuperScript III (Invitrogen®, EE.UU). El análisis qPCR se realizó utilizando el termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad™ Laboratories Inc., EE.UU) con TransStart® Green qPCR SuperMix (AQ101-01 Trans®, China). Todos los kits y enzimas se utilizaron siguiendo las indicaciones del fabricante. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la proteína de unión a TATA (TBP) se utilizaron como control interno. La expresión relativa se determinó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

<i>Primers murinos</i>	<i>Forward 5'-3'</i>	<i>Reverse 5'-3'</i>
iNOS	TCAACACCAAGGTTGTCTGC	AAGGCCAAACACAGCATACC
E-cadherina	GGTTTTCTACAGCATACCG	GCTTCCCATTGATGACAC
SMA	GACGTACAAGTGGTATTGTG	TCAGGATCTTCATGAGGTAG
TGF- β 1	TACCATGCCAACTTCTGTCTGGGA	ATGTTGGACAAGTCTCCACCTTG
SPARC	GCCTGGATCTTCTTTCTCCT	GTTTGGCAATGATGGTTCTGG
MT1-MMP	GCTTTACTGCCAGCGTTC	CCCACTTATGGATGAAGCAAT
GAPDH	CAAAATGGTGAAGGTCGGTG	CAATGAAGGGG TCGTTGATG
<i>Primers humanos</i>		
iNOS	ACAACAAATTCAGGTACGCTGTG	TCTGATCAATGTCATGAGCAAAGG
SPARC	GCGGAAAATCCCTGCCAGAA	GGCAGGAAGAGTCGAAGGTC
MT1-MMP	CAACATTGGAGGAGACACCCACT	CCAGGAAGATGTCATTTCCATTCA
GAPDH	CAAAATGGTGAAGGTCGGTG	CAATGAAGGGGTCGTTGATG
TBP	TGCACAGGAGCCAAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA

Tabla 2.- *Primers específicos utilizados.*

Ensayo Western blot

Se trataron monocapas subconfluentes de líneas celulares tumorales (LM3, LMM3, LM2, MDA-MB-231 o MCF10DCIS.com) o de fibroblastos NIH-3T3 con o sin L-NAME 2mM durante 16hs sin SFB. A continuación, las células se estimularon con un 5% de SFB (con o sin L-NAME) durante 5, 10 y 20 min y se procesaron para *western blot*. Por otro lado, se silenciaron para SPARC monocapas subconfluentes de células tumorales (LM38-LP o MCF10DCIS.com) o se trataron con o sin SB431542 y las células se procesaron para *western blot* como se describe a continuación.

Las células se lavaron suavemente con PBS frío y se lisaron utilizando RIPA-EDTA como buffer de lisis para la extracción de proteínas (50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 1% Triton, 1 mM/ml aprotinina, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 2 mg/ml leupeptina y 10 mM EDTA/EGTA) conteniendo inhibidores de proteasas (Cóctel: fluoruro de fenilmetilsulfonilo, aprotinina, leupeptina, pepstatina, Sigma) e inhibidores de fosfatasa (Cóctel: venadato de sodio, molibdato de sodio, tartrato de sodio, imidazol, Sigma). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford siguiendo las instrucciones del fabricante (Merk). A partir de los lisados proteicos totales se separaron las proteínas por electroforesis utilizando un gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF0 (GE Healthcare, Cat # RPN303F).

Terminada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente en buffer de bloqueo (TBS-Tween 0,1% + 5% de leche descremada o 5% de BSA en el caso de las proteínas fosforiladas). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario específico para cada proteína en buffer de bloqueo a 4° C en agitación durante toda la noche (Tabla 3). Al día siguiente fueron lavadas 3 veces con TBS-Tween 0,1% durante 10 minutos y posteriormente incubadas con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente se incubaron las membranas en ECL (Tris base 1M pH=8, Cumárico 46 mM, H₂O₂ 30%, Luminol 0,2 M) durante 1 minuto y se reveló mediante el uso del equipo ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences). Las bandas fueron

cuantificadas con Image J. Los valores correspondientes a cada una de las bandas de expresión de proteínas fueron normalizados con valores del control de carga correspondiente y con el tratamiento control.

Anticuerpos utilizados

Proteína	Marca	Catalogo
iNOS	Abcam	ab15323
nNOS	Santa Cruz	sc-5302
eNOS	Santa Cruz	sc-376751
p-ERK	Santa Cruz	sc-7383
ERK 1	Santa Cruz	sc-93
p-SMAD 2/3	Cell Signalling	D27F4
SMAD 2/3	Santa Cruz	sc-133098
MT1-MMP	Invitrogen	PA5-13183
SPARC	Invitrogen	PA5-80062
HRP-anti ratón	R&D Systems	RD#HAF007
HRP- anti conejo	R&D Systems	RD#HAF008

Tabla 3.- Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Medición de la actividad enzimática

La medición de la actividad de las MMPs asociadas a membrana plasmática, se analizó bajo la técnica de degradación de la gelatina, donde las células son sembradas en cubreobjetos previamente recubiertos de gelatina fluorescente.

Los cubreobjetos limpios se incubaron con polilisina (0,5 µg/ml, Sigma) 20 min TA, se lavó con PBS y se incubó con glutaraldehído 0.5% 15 min TA. Luego se lavó 3 veces con PBS y se incubaron los vidrios por inversión sobre la gelatina-A488 durante (G13186, Invitrogen) colocada en Parafilm 10 min a TA. Se retornó el cubreobjeto al pocillo y se hizo un lavado con PBS para luego incubar con 5 mg/ml de borohidrato (Sigma) de sodio durante 3 min. Se lavó 3 veces con PBS, se agregó medio completo y se incubó en la estufa mientras se tripsinizaban y contaban las células.

Se sembraron 200.000 células por pocillo en placa de 12 pocillos. Luego de 18hs (ON) las células fueron fijadas 20 min TA con formol 4%. Luego se tiñeron con faloidina (A22283, Life technologies) y DAPI, se sacaron fotos en microscopio de fluorescencia

invertido (Nikon Eclipse TE2000-S y cámara digital CoolpixH 995). Se procedió a evaluar la capacidad degradativa de las células. Utilizando Image J se cuantificaron los niveles resultantes de la proteólisis (áreas negativas de señal fluorescente) por células individuales y por campo¹³⁴.

Medición de la capacidad adhesiva

Los cubreobjetos limpios fueron tratados por 2 hs con SFB o Colágeno IV (Corning 354236). Las células fueron levantadas por tripsinización, se sembraron 150.000 células/pocillo por triplicado en placas de 24 pocillos con medio completo, donde se dispusieron los cubreobjetos previamente tratados. Se fijaron las células con formol 1h luego de la siembra. Se tiñeron con DAPI y se procedió a sacar fotos en microscopio de fluorescencia invertido. Se calculó el índice de adhesión como células adheridas por campo en función del número de células sembradas.

Medios condicionados

Se sembraron placas p60 con las tres líneas de LM38 para la obtención de medio condicionado. Luego de 24hs se cambió el medio de las placas por medio sin SFB utilizando el volumen mínimo de las mismas. Se sembraron las tres líneas de LM38, 3×10^3 células/100 μ l en placa de 96 pocillos con medio completo. Al día siguiente se recolectaron los medios condicionados de las placas p60, se centrifugaron para eliminar células muertas y se cambió el medio de la placa de 96 pocillos colocando 50% del medio condicionado con 50% de medio fresco, para evaluar el efecto de los medios condicionados en forma cruzada. Se realizó un ensayo de viabilidad con MTS a las 24 hs como se describió previamente y se procedió a realizar el análisis estadístico.

Se procedió de manera similar para analizar la marcación con PCNA (PC10, Cell signaling). Se hicieron crecer las tres líneas LM38 sobre cubreobjetos y se trataron con los medios condicionados cruzados como se describió anteriormente. Luego de 24 hs se fijaron y se marcaron contra PCNA por inmunofluorescencia como se describió en el apartado "Ensayo de inmunofluorescencia en células de cultivo". Posteriormente se contaron núcleos positivos para PCNA en función de los núcleos totales.

Tratamiento con ARNs

Se silenciaron monocapas subconfluentes de células tumorales (LM38-LP o MCF10DCIS.com) utilizando siARN SPARC de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Para realizar la transfección se utilizó ARN de interferencia (siARN) en una concentración de 5nM y como reactivo de transfección Mission®siRNA (Sigma) y se determinó el silenciamiento luego de 72 hs del tratamiento. Se utilizaron las siguientes secuencias diana: siSPARC humano: EHU002941, siSPARC murino: EMU088951; Control Negativo Universal#1 MISSION® siRNA: sic001 (Sigma).

Ensayo de migración 2D

Se sembraron $1,5 \times 10^3$ células LM38-LP silenciadas o no para SPARC en un *FluoroDish™* de 35mm, posteriormente se trataron las células durante 2hs con TGF-B1 o SB431542 y por último se tiñeron con Hoesch para discriminar los núcleos (Invitrogen). Las células se fotografiaron con un microscopio invertido (Leica Dmi8) equipado con objetivos APO 10x/0,45 PH1, FL L 20x/0,40 CORR PH1, y APO 40x/0,95. Las imágenes se tomaron con una cámara digital ORCA-Flash4.0 (Hamamatsu Photonics) utilizando el software MetaMorph Versión 7.10.3.279 (Molecular Device). Las imágenes se capturaron con un aumento de 10x, contraste de fase PH1 y *binning* ajustado a 2, se tomaron cada 3 minutos durante un periodo de 4,5 horas. Se procedió la cuantificación utilizando el programa Image J y utilizando el complemento TrackMate.

Ensayo de migración 3D

El microdispositivo utilizado para migración 3D se fabricó en polidimetilsiloxano (PDMS) a partir de un molde maestro de tres compartimentos. El dispositivo de PDMS resultante se unió a un *FluoroDish™* de 35mm por temperatura. La preparación del gel de colágeno se realizó en frío. El colágeno tipo I de cola de rata (Corning) se diluyó a una concentración de 2 mg/mL con 10% en volumen de PBS 10X y agua desionizada y se ajustó a pH 8,0 con hidróxido de sodio 1 N (NaOH). Luego se añadió la suspensión celular en medio de cultivo con una concentración final de 6×10^5 células/ml (LM38-LP o MCF10DCIS.com). El colágeno polimerizo luego de 20 minutos de incubación a 37 °C. Se

trataron las células con TGF-B1 o SB431542 y se sacaron fotos con un microscopio invertido (Leica Dmi8) equipado con objetivos APO 10x/0,45 PH1, FL L 20x/0,40 CORR PH1, y APO 40x/0,95. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital ORCA-Flash4.0 (Hamamatsu Photonics) utilizando el software MetaMorph Versión 7.10.3.279 (Molecular Device). Las imágenes se realizaron cada 3 minutos durante 16 horas, empleando un aumento de 10x con contraste de fase PH1 y *binning* ajustado a 2. Se procedió la cuantificación utilizando el programa Image J y utilizando el complemento TrackMate.

Experimentación in vivo

Se utilizaron ratones hembras vírgenes BALB/c de entre 8 a 10 semanas de edad, criados en el Bioterio del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”. Los ratones se manipularon de acuerdo con el procedimiento internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. La comida y bebida fue administrada *ad libitum*. Los protocolos fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional Comité Interno para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio (CICUAL), Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” 2017/03 y 2023/04.

Inyección de células tumorales mamarias dentro de la almohadilla grasa de glándulas mamarias de ratón

Para evaluar el efecto *in vivo* de la inhibición de la producción de NO en la progresión del cáncer de mama, se inocularon ratones BALB/c hembras de entre 8 a 10 semanas de edad en la cuarta glándula mamaria con $2,5 \times 10^5$ células LM3, LMM3 o LM2. A continuación, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos: Control y L-NAME (n=8 /grupo). Se añadió L-NAME (2mM) al agua de bebida.

Por otro lado, para la generación de tumores a partir de las tres líneas LM38, se trabajó con hembras vírgenes de entre 8 a 10 semanas de edad y se inyectó la suspensión celular en la almohadilla grasa del cuarto par de glándulas mamarias. Se inoculó una suspensión en PBS de 2×10^5 células por glándula de las tres líneas LM38.

El crecimiento tumoral se registró dos veces por semana midiendo 2 diámetros perpendiculares. Para calcular el tamaño del tumor se utilizó la fórmula

Volumen= $3/4\pi Dd^2$, donde D y d representan los diámetros mayor y menor, respectivamente.

Inoculación de células tumorales mamarias dentro del conducto galactóforo de glándulas mamarias de ratón

Para la generación del modelo intraductal singénico se trabajó con hembras adultas de 10 semanas de edad bajo anestesia (Ketamina 100mg/kg +Xilacina 10mg/kg). Se realizó una pequeña incisión en el pezón de la cuarta glándula mamaria para luego inocular directamente en el ducto galactóforo^{57,135}. La suspensión celular fue de 5×10^3 células por glándula para las tres líneas del modelo LM38. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical entre las 3 y 5 semanas post inoculación y se procedió a la exéresis de la glándula mamaria para continuar con el análisis.

En el caso del estudio del efecto de la inhibición de la vía molecular de TGF-B sobre la progresión temprana del cáncer de mama, se realizó el mismo procedimiento con células LM38-LP. Después de tres semanas los ratones fueron aleatorizados en 2 grupos: Control y Galunisertib (n=10 por grupo). Tras la detección de cualquier tumor palpable (alrededor de la tercera semana) se administró Galunisertib por vía oral, una vez al día a una dosis de 60mg/kg durante 5 días. A continuación, se extrajeron las glándulas mamarias y se procesaron para análisis histológico.

Técnicas histológicas

Una vez sacrificados los ratones se procedió a la obtención de las glándulas mamarias, las cuales se fijaron con Metacarn (metanol, cloroformo, ácido acético 6:3:1)¹³⁶. Se lavaron con etanol 70%, luego con agua durante 5 minutos y se incubaron en una solución de Carmin 2gr/l por 18hs. Luego, se deshidrató el tejido con el objetivo de visualizar la presencia y la morfología de los tumores. Se fotografiaron las glándulas usando una lupa estereoscópica triocular Carl Zeiss Stemi 2000C. La cuantificación del área tumoral se realizó utilizando el software Image J.

Las glándulas mamarias se incluyeron en parafina para el estudio histológico convencional. Se tiñeron en el Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Roffo con hematoxilina – eosina (H&E) y P.A.S. para la visualización de la membrana basal.

Por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica se evaluó la expresión de marcadores de interés.

Análisis histológicos y determinación de la infiltración linfocitaria (TILs)

Se realizó la tinción convencional con hematoxilina y eosina y la tinción con tricrómico de Masson (Biopack) y rojo picrosirio según las instrucciones del fabricante (NovaUltra, Woodstock, MD, EE.UU.). La cuantificación del colágeno se analizó con el programa informático Image J. La necrosis se define como área tisular caracterizada por un aumento de la eosinofilia (hipereosinofilia) y aspecto homogéneo, producto de la desnaturalización de las proteínas; con figuras celulares fantasmas por desintegración de la membrana celular y núcleos picnóticos (de menor tamaño), con fenómenos de cariólisis (ruptura de los núcleos), y cariorrexis (fragmentación nuclear).

La densidad de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) por campo se estimó de acuerdo con las recomendaciones del International TILs Working Group ¹³⁷. Se realizó un paneo rápido de las áreas peri tumorales e intratumorales a bajo aumento y se evaluó el porcentaje del área del estroma tumoral que estaba ocupada por células inmunes mononucleares a alto aumento ($\times 200$). Las células mononucleares, incluidos linfocitos y células plasmáticas, se definieron como TIL. La densidad de TIL se evaluó en cinco campos diferentes y se calculó su densidad media.

Inmunomarcaciones

Ensayo de inmunofluorescencia en células de cultivo

Con relación al capítulo 1, se hicieron crecer las células NIH-3T3 en cubreobjetos con medio completo y se trataron o no con L-NAME 2mM y se evaluó alfa-SMA. En el capítulo 2a, se hicieron crecer células LM38-LP en cubreobjetos solas o con TGF-B1 (2 ng/ml, Peprotech) o SB431542 (20 ng/ml, StemCell) o medio condicionado de células LM38-D2 (MC D2) para evaluar TGF-B1. Por último, en el capítulo 2b las células LM38-LP o MCF10DCIS.com que crecían en cubreobjetos se silenciaron para SPARC o se trataron con o sin SB431542 (20 ng/ml, StemCell) para marcar SPARC y MT1-MMP. Posteriormente se procesaron los cubreobjetos como se describe a continuación. Los anticuerpos utilizados se listan en la Tabla 2.

Las monocapas subconfluentes se lavaron con PBS y se procesaron para inmunofluorescencia. Las células se fijaron con PAF al 4% en PBS durante 15 minutos. Se lavó tres veces con PBS y se incubó con solución de bloqueo (PBS 1x, SFB 5% y Tritón 0,3%) durante 1 hora. Se incubó durante 18hs con el anticuerpo primario preparado en solución de bloqueo (Tabla 4). Se realizaron tres lavados con PBS y se incubó durante 2hs el anticuerpo secundario preparado en PBS a temperatura ambiente (Tabla 4). Se lavó y se incubó con DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol diclorohidrato, Sigma) durante 10 minutos, se lavó y montó con medio de montaje (P36961, Invitrogen). Posteriormente se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse™ E400 y se fotografiaron con una cámara digital CoolpixH 995.

Inmunofluorescencia de cortes de tumores murinos

Se desparafinaron los cortes para lo cual se realizaron 2 baños con xilol de 5 minutos, 2 baños de etanol 100% de 2 minutos, después 1 baño de etanol 95%, 70% y 50% de 2 minutos cada uno. Luego se realizó un baño de agua destilada y PBS.

Se procedió a realizar el desenmascaramiento de antígenos con buffer citrato 10mM pH=6. Se calentó el buffer con los cortes a 90°C durante 8 minutos. Se dejaron enfriar los vidrios y luego se pasaron a un baño de PBS durante 5 minutos. Para el bloqueo, se secaron los vidrios y se incubaron con volumen necesario de solución de bloqueo de 5% SFB/corte durante 1h a temperatura ambiente.

Se prepararon las soluciones de anticuerpos primarios en la solución de bloqueo. Se incubó con 50 – 100 µl de anticuerpo primario por corte toda la noche a 4°C en cámara húmeda (Tabla 4). Luego, se lavaron los vidrios con PBS 3 veces durante 10 minutos, se sacaron y se incubaron con la solución del anticuerpo secundario en PBS durante 2hs a temperatura ambiente (Tabla 4). Se tiñeron los núcleos con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, sc-3598, Santa Cruz, 1 µg/ml) por 10 minutos y en algunos casos la F-actina se tiño con faloidina Alexa546 (A22283, Life technologies). Luego de 3 lavados con PBS los cortes se dejaron secar y se procedió al montaje.

Anticuerpos utilizados

Proteína	Inmuno reactividad	Empresa	Catalogo
iNOS	Ratón	Abcam	ab15323
CD8	Ratón	Abcam	ab20133
CD4	Ratón	Abcam	ab183685
E –cadherina	Ratón	Abcam	ab76055
SMA – alfa	Ratón	Sigma	A2547
PCNA	Ratón	Cell signaling	25865
TGF-B1	Ratón	Santa Cruz	sc-146
SPARC	Ratón	Invitrogen	PA-5-80062
MT1-MMP	Ratón	Invitrogen	PA5-13183
Ki-67	Ratón	Abcam	ab1558
SMAD-4	Ratón	Santa Cruz	sc-7966
Alexa-488 anti-conejo	Conejo	Abcam	ab150077
Alexa-488 anti-ratón	Ratón	Abcam	ab150113
Alexa-546 anti-ratón	Ratón	Abcam	ab11003

Tabla 4.- Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Purificación celular, análisis transcriptómico y selección de genes diana

Los tumores en estadio invasor obtenidos luego de la inyección intraductal de células MCF10DCIS.com en la glándula mamaria de ratones inmunosuprimidos SCID¹³⁵ se extrajeron y disgregaron mecánicamente. Se marcaron las células contra CD298 para diferenciar las células humanas (BD Pharmingen™, clon LNH-94) y para aislar las poblaciones según el nivel de expresión MT1-MMP (Millipore Anti-MMP-14, dominio catalítico, clon LEM-2/15.8). Utilizando la tecnología RNAseq y basándonos en la expresión diferencial de MT1-MMP, comparamos el perfil transcriptómico de las poblaciones celulares MT1-MMP^{Alto} y MT1-MMP^{Bajo}. Las muestras se procesaron de acuerdo con el protocolo de *SMARTer stranded total RNA seq Kit-Pico Input Mammalian*, y luego se secuenciaron utilizando HiSeq™, de Illumina en el Core Facility del Instituto Curie, París, Francia.

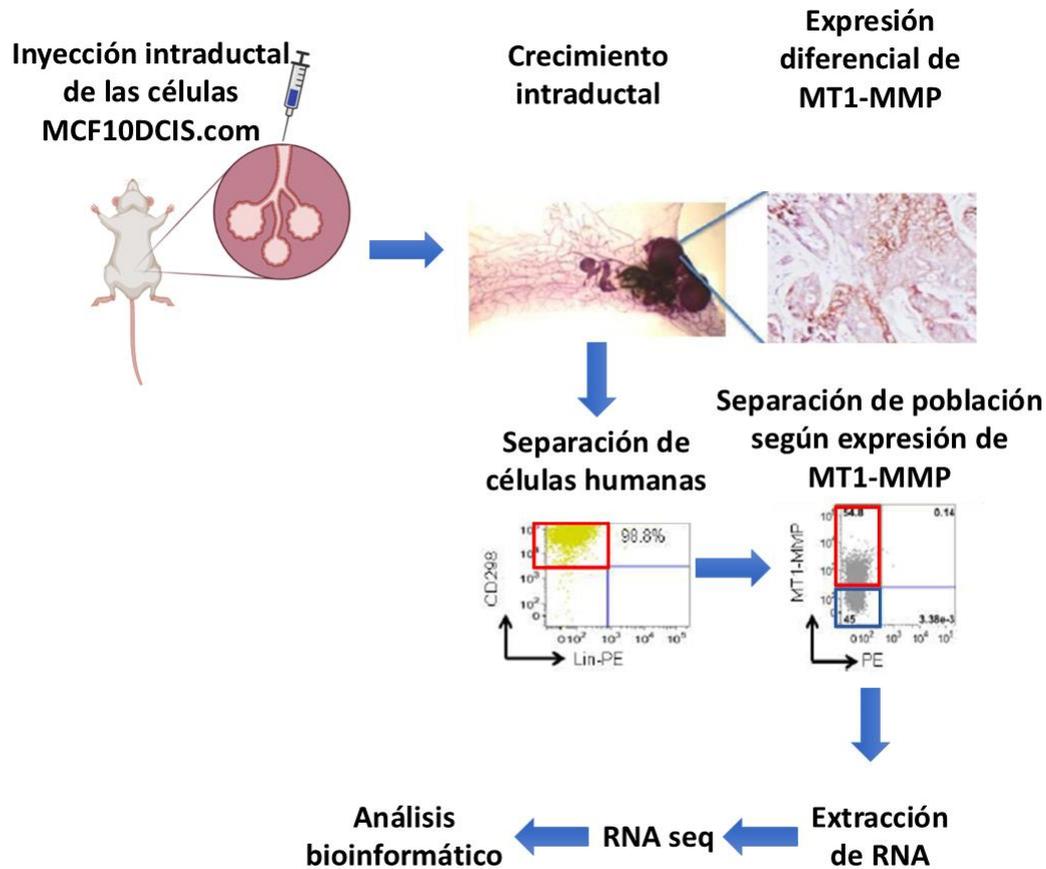


Figura 12.- Flujo de trabajo. A partir del modelo xenogénico y la expresión diferencial de MT1-MMP se identificaron genes potencialmente implicados en la transición del estadio *in situ* al invasor.

Los archivos FASTQ generados a partir de la secuenciación de cada muestra se alinearon contra el genoma humano estándar, produciendo archivos BAM. Para realizar esta alineación, se utilizó el paquete SubRead del entorno R/Bioconductor. Luego de la alineación, se utilizó Trimmomatic para recortar las lecturas y garantizar la calidad y precisión de los datos. Los archivos BAM, una vez alineados y recortados, se procesaron para crear una matriz de recuento de lecturas. Esta matriz sirvió de entrada para DESeq2, otro paquete R/Bioconductor, que se utilizó para identificar genes expresados diferencialmente entre los dos grupos de estudio. Todo el análisis se llevó a cabo en el entorno estadístico R en colaboración con el Dr. Ezequiel Lacunza.

Para descubrir similitudes en la expresión génica entre nuestro modelo experimental y las muestras humanas de DCIS de alto grado, se comparó la lista de genes sobre expresados en la población con MT1-MMP^{Alto} de nuestro modelo experimental con la lista de genes regulados sobre expresados en los subconjuntos humanos DCIS-C1

y DCIS-C2. Estos subconjuntos se caracterizaron previamente en una cohorte de DCIS de alto grado, como se detalla en Abba et al., 2015¹⁰¹.

Muestras de tejido humano

Se accedió a muestras parafinadas de tumores de mama humanos de tres cohortes diferentes de pacientes. 116 muestras de tumores de mama primarios (incluidos N=55 DCIS y IDC sincrónicos) del Instituto Curie entre 2005 y 2006 vírgenes de tratamiento (cohorte II). 58 muestras de tumores de mama primarios (incluidos N=34 DCIS y IDC sincrónicos y N=16 DCIS solos) que se obtuvieron entre 2015 y 2016 (cohorte I) y 57 muestras de tumores de mama primarios con IDC y metástasis en ganglios linfáticos obtenidas entre 2015 y 2020 (cohorte III) en el Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”.

Todas las mujeres proporcionaron un consentimiento informado firmado para estudios de investigación. Los datos se analizaron de forma anónima. Este estudio cumple la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de revisión interna y ética de cada institución (Comité de Pilotage du Groupe Sein, Institut Curie). El análisis de las muestras humanas mediante inmunohistoquímica (IHQ) se realizó tras la aprobación del comité de revisión y ética del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” (21/18). En este caso se utilizó el anticuerpo anti SPARC humano GTX133747.

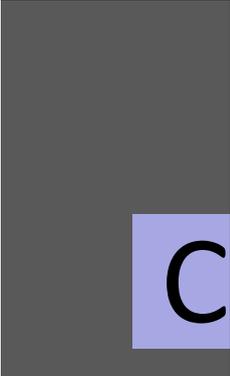
Análisis de datos de expresión génica

Para estudiar la asociación y co-expresión de genes en conjuntos de datos de cáncer de mama, se emplearon diagramas de dispersión y líneas de regresión. Los datos para este análisis se obtuvieron del *TCGA - PanCanAtlas*¹³⁸. Para evaluar la expresión de SPARC y MT1-MMP en líneas celulares de cáncer de mama, utilizamos datos de secuenciación de ARN del conjunto de datos GSE48213¹³⁹, que incluye un perfil transcripcional completo de un panel de líneas celulares de cáncer de mama.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces de forma independiente. Los datos se expresan como media \pm DS o \pm SEM. Los análisis estadísticos

de los ensayos de proliferación, apoptosis, *H-score*, células positivas para marcadores específicos, tamaño tumoral, los niveles de proteína y ARNm, los ensayos de degradación de gelatina y los ensayos de migración se realizaron mediante la prueba X², la prueba t de Student, el análisis de varianza unidireccional con GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.), tal como se especifica en la leyenda de cada figura, y $p < 0,05$ se consideró significativo y prueba posterior también se indica en cada caso. Para los gráficos de caja y bigote que muestran la expresión génica se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Software R versión 3.0.2, R Foundation for Statistical Computing, Institute for Statistics and Mathematics, Viena, Austria).



Capítulo 1



La inhibición de la producción del óxido nítrico disminuye el crecimiento tumoral en conjunto con la activación de fibroblastos

El NO es un radical libre producido por NOS que funciona como molécula de señalización que desencadena distintos procesos moleculares. Dos de las enzimas son de expresión constitutiva: eNOS y nNOS, y la tercera isoforma iNOS, la cual produce niveles más altos de NO como respuesta a estímulos pro inflamatorios^{70,71,73}.

En la clínica el rol de iNOS es dual y contexto dependiente. La sobreexpresión de esta enzima está asociada a mal pronóstico en algunos tipos de cánceres como cáncer de mama, de vejiga, gástrico y oral escamoso. Es por ello que se ha propuesto su inhibición como blanco terapéutico.

En cuanto al microambiente tumoral, los fibroblastos que son las células encargadas de producir los componentes de la matriz extracelular, se caracterizan por ser una población heterogénea cuyo efecto en el contexto del cáncer depende del tipo tumoral⁹¹. Particularmente, su papel en el cáncer de mama asociado con la inhibición de NO aún no está del todo claro.

Como objetivo este capítulo se buscó evaluar el impacto de la inhibición de NO en la progresión tumoral del cáncer de mama y el rol de los fibroblastos asociado a esta inhibición. Como inhibidor de la producción de NO utilizamos el L-NAME que es un análogo de la arginina y que inhibe a las enzimas NOS en general.

Caracterización de un modelo celular murino de cáncer de mama en relación al NO

En primer lugar, se caracterizó el modelo celular en relación a la expresión de las NOS y la producción de NO. Se utilizaron tres líneas celulares murinas de cáncer de mama, dos líneas con características epiteliales: LM3 y LMM3, siendo la segunda una variante más agresiva de la primera, y la línea LM2 con una morfología más fibroblastoide^{60,61}.

Se determinó la expresión proteica basal de las distintas isoformas de NOS en las líneas celulares, mediante la técnica de *Western blot* utilizando corazón de ratón como control positivo de las eNOS y nNOS. Tanto la línea celular LM3 como su variante más agresiva LMM3 expresaron altos niveles de iNOS. Mientras que ambas líneas no expresaron niveles considerables de las otras dos isoformas. En cuanto a la línea LM2 mostro niveles muy bajos tanto de iNOS como de nNOS, por lo cual la catalogamos como una línea celular iNOS negativa. Por su parte el tratamiento con L-NAME no moduló los niveles de expresión proteica en las líneas iNOS positivas (Figura 13.A). Resultados similares respecto a iNOS se observaron a nivel transcriptómico mediante la técnica de qPCR, donde LMM3 que presenta características más agresivas *in vivo*, fue la que expresó mayor nivel de ARN mensajero y este se vio disminuido significativamente frente al tratamiento con el inhibidor L-NAME (Figura 13.B). Tanto LM3 como LMM3 secretaron niveles detectables de NO, que concuerdan con sus niveles de expresión de iNOS. Este efecto se vio inhibido con el agregado del inhibidor enzimático L-NAME. La determinación de NO se llevó a cabo a partir de los medios condicionados a través de la técnica colorimétrica de Griess.

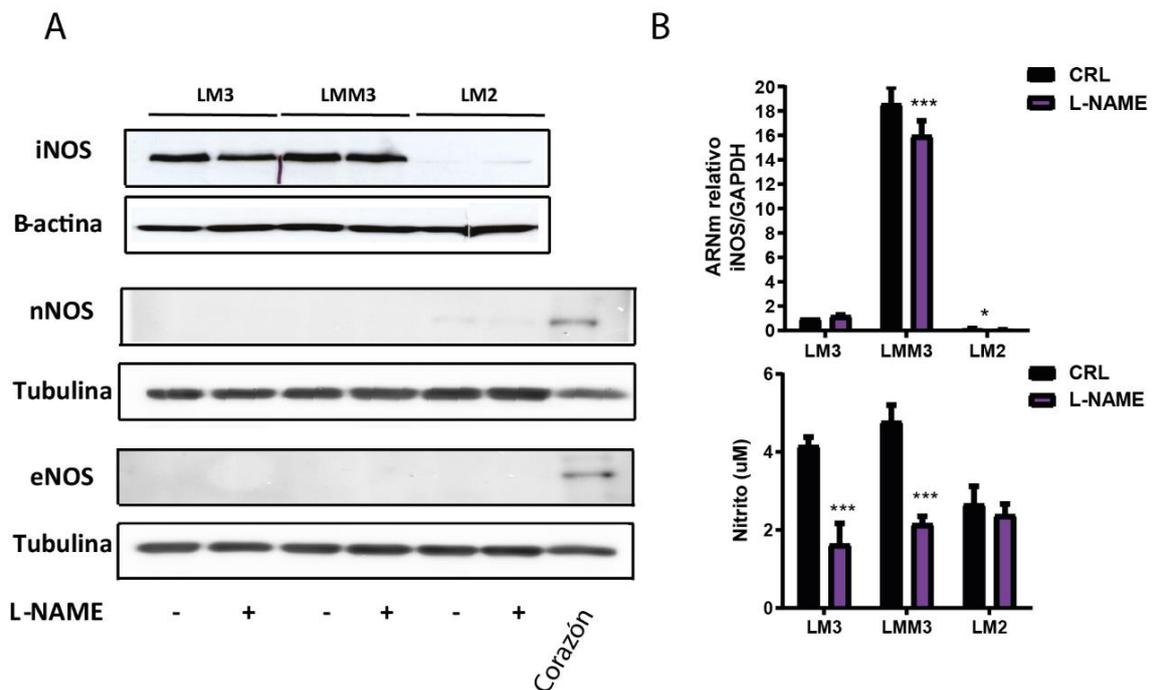


Figura 13.- Expresión de las NOS y la producción de NO en las líneas murinas de cáncer de mama. (A) Expresión de isoformas de NOS en células de cáncer de mama murinas LM3, LMM3 y LM2 mediante *Western Blot* en presencia o ausencia de L-NAME con B-actina o tubulina como control de carga. Se utilizó un lisado de corazón de ratón como control positivo. (B) Nivel de expresión de ARNm de iNOS en células tratadas o no con L-NAME. Los valores se expresan como la media \pm SEM, n=3 experimentos independientes de cantidades relativas de ARNm de iNOS normalizado a GAPDH. *p < 0,05; ***p < 0,001 mediante ANOVA de dos vías, post prueba de Bonferroni frente a LM3. (C) Cuantificación de la producción de NO en los sobrenadantes de las tres líneas utilizando el ensayo de Griess con o sin L-NAME (2 mM) durante 24 h. ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni.***p < 0,001 frente a CRL.

Efecto de la modulación de NO sobre la viabilidad celular

Inicialmente se evaluó el impacto del NO sobre la viabilidad de las líneas celulares utilizando la técnica de cristal violeta. Se observó que el tratamiento con un donador de NO como es el DETA-NO indujo la viabilidad celular solo en las líneas celulares iNOS positivas, principalmente en las concentraciones intermedias de 60 y 125 μ M. Mientras que concentraciones más elevadas como 250 μ M de DETA/NO no aumentaron la viabilidad celular, sugiriendo que niveles más altos de NO pueden afectar negativamente la actividad proliferativa de las mismas (Figura 14 A).

Por su parte el tratamiento con L-NAME redujo la actividad metabólica celular de las líneas LM3 y LMM3, mientras que la viabilidad de la línea celular iNOS negativa LM2 no se vio afectada por el tratamiento con el inhibidor (Figura 14 B). No se observaron efectos significativos sobre el porcentaje de células apoptóticas por el tratamiento con L-NAME en ninguna de las líneas celulares en un ensayo de citometría

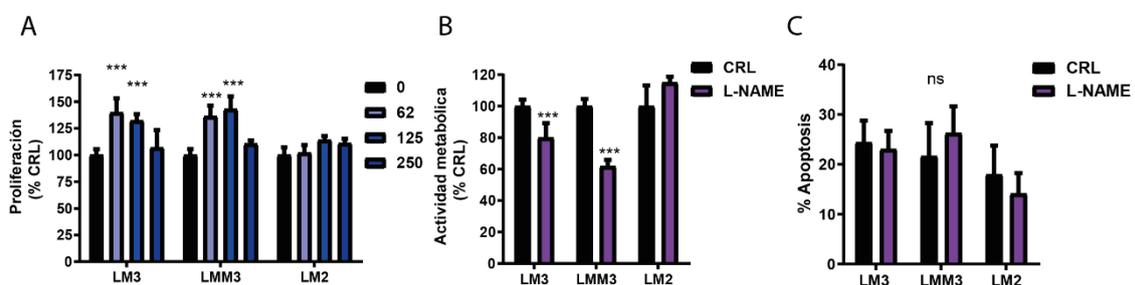


Figura 14.- Efecto de la inhibición en la producción de NO sobre la proliferación y apoptosis.

(A) Viabilidad celular evaluada mediante CV luego del tratamiento con DETA/NO (62, 125 y 250 μ M) durante 24 h. ***p < 0,001 mediante ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni frente a CRL. (B) Viabilidad celular evaluada mediante MTS luego del tratamiento con L-NAME (2 mM) durante 48. (C) Porcentaje de apoptosis obtenido a partir de la proporción de células Anexina y Ioduro de propidio positivas evaluadas por citometría. Cada línea fue tratada con L-NAME (2 mM) durante 48h. ns= no significativo. ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni.

de Anexina- Ioduro, lo que sugiere que el efecto producido por el inhibidor de NO sobre la viabilidad celular no estaría mediado por la apoptosis. Aunque se pudo apreciar una tendencia al incremento de células apoptóticas en el caso la línea LMM3 (Figura 14 C).

Dado que se observó un efecto tanto del inhibidor de las NOS como del donador de NO sobre la proliferación de las líneas celulares y sumado a que ya es sabido que el NO está involucrado en la activación de la vía mitogénica mediada por MAPKs ¹⁴⁰, nos propusimos entonces evaluar si el L-NAME podría estar modulando la activación de dicha vía. Dado que la vía de ERK es inducible por el agregado de SFB, las células fueron tratadas con L-NAME 2mM en ausencia de SFB durante 16 hs. Posteriormente se analizó la cinética de fosforilación de ERK mediante la técnica de *Western blot* de las líneas

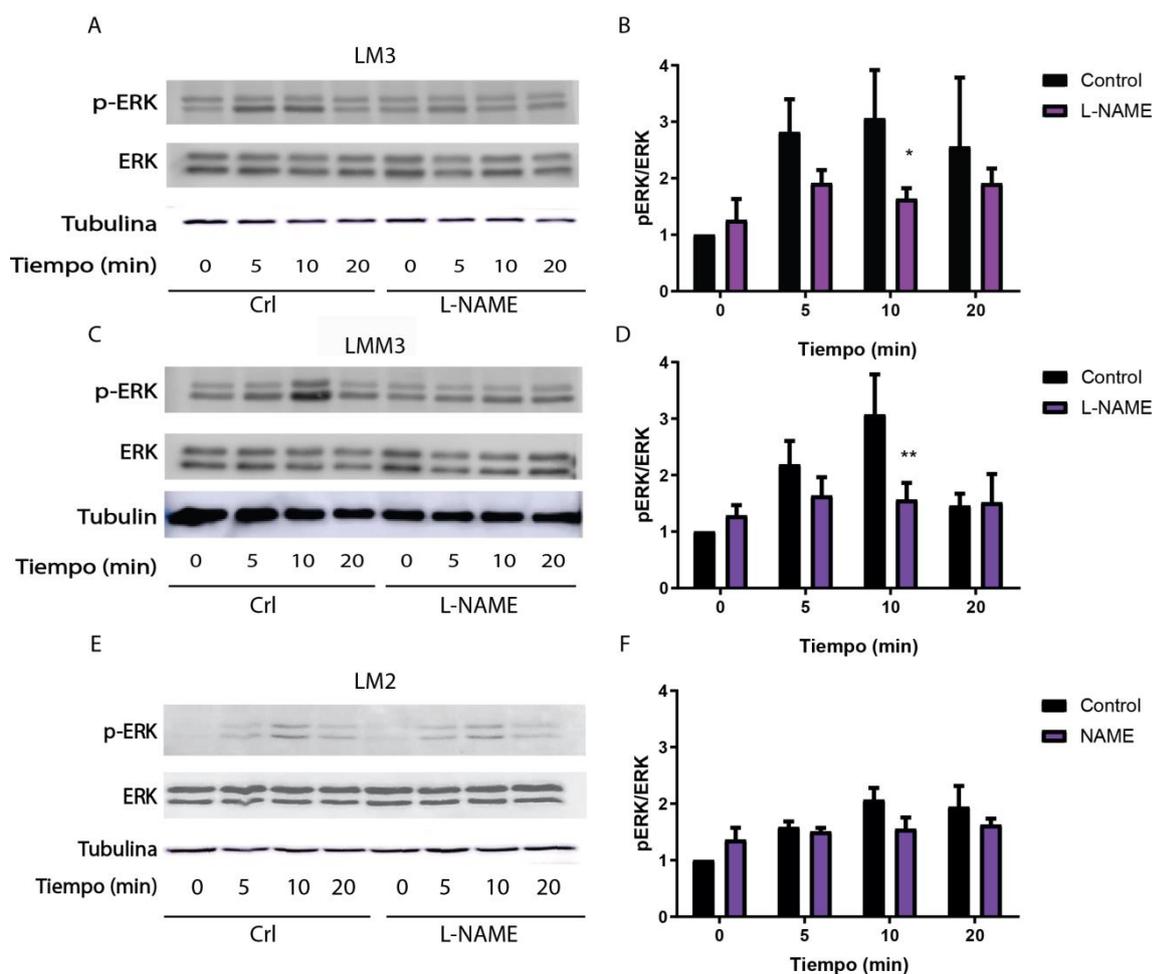


Figura 15.- Efecto de la inhibición de la producción de NO sobre la vía de MAPK. (A) *Western blot* representativo de p-ERK y ERK total en células (A) LM3 (C) LMM3 y (E) LM2. Las células se privaron de SFB toda la noche y se trataron con L-NAME 2mM, al siguiente día se realizaron pulsos de SFB de 5, 10 y 20 minutos. Se utilizó tubulina como control de carga. Los valores son medias \pm SEM, n=3 experimentos independientes. Los niveles relativos de fosforilación de ERK se normalizaron con respecto a la proteína de control (B, D y F). *p < 0,05; p < 0,01 mediante ANOVA bidireccional, Bonferroni post-test vs Control 10 min.

sometidas al agregado de SFB al 10% en medio de cultivo y al tratamiento o no de L-NAME durante 5, 10, 15 y 20 minutos. Se observó que la inducción con SFB produjo un aumento en la fosforilación de ERK a los 5 y 10 minutos en las tres líneas comparado con su condición basal. De manera interesante, este efecto se vio inhibido significativamente frente al tratamiento con L-NAME solo en las líneas celulares positivas para iNOS (LM3 y LMM3) (Figura 15 A-F).

Efecto de la modulación del NO en líneas celulares humanas

Con la idea de extender estos hallazgos, se analizó el efecto del NO sobre líneas celulares humanas de cáncer de mama: MDA-MB231 y MCF10DCIS.com ambas clasificadas dentro del subtipo molecular triple negativo^{57,141}. En primer lugar, evaluamos la expresión del ARNm de iNOS en las dos líneas de cáncer de mama mediante qPCR. La línea MDA-MB-231 presentó una alta expresión de iNOS a nivel transcripcional que se vio disminuido frente al tratamiento con L-NAME en contraste

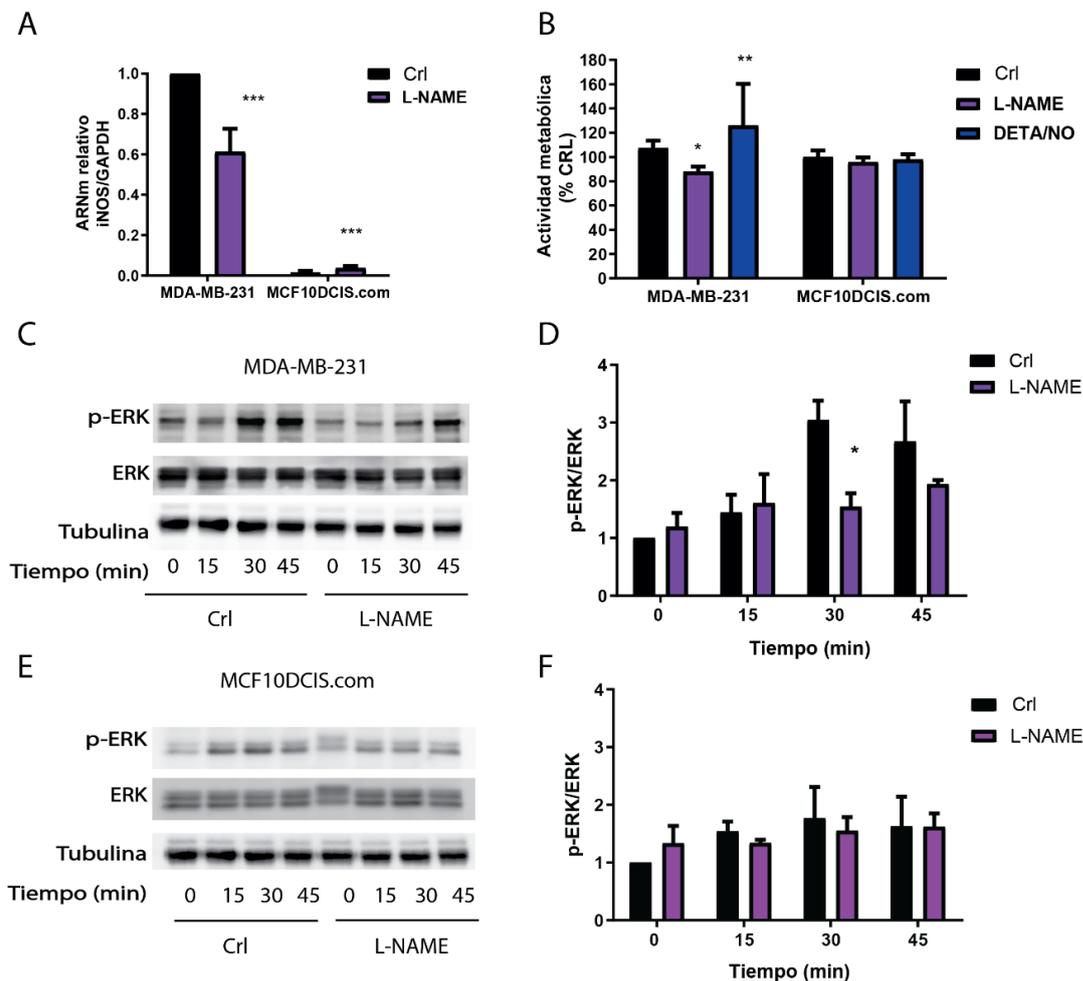


Figura 16.- Efecto de la modulación del NO en líneas de cáncer de mama humanas. (A) Nivel de expresión de iNOS en las líneas MDA-MB-231 y MCF10DCIS.com tratadas o no con L-NAME. Los valores son expresados como la media \pm SEM, n=3 experimentos independientes de cantidades relativas de iNOS normalizado a GAPDH. ***p < 0,001 por ANOVA de dos vías, Bonferroni frente a CRL MDA-MB-231. (B) Viabilidad celular evaluada por MTS de las células tratadas con L-NAME (2 mM) o DETA/NO (62 μ M) durante 48 hs y 24 hs respectivamente. *p < 0,05; **p < 0,01 mediante ANOVA de dos vías, posttest de Bonferroni frente a CRL MDA-MB-231. Imágenes representativas de Western blot de p-ERK y ERK total luego de los pulsos de SFB en (C) MDA-MB- 231 y (E) MCF10DCIS.com. Tubulina como control de carga. Los valores son medias \pm SEM, n=3 experimentos independientes. Los niveles relativos de p-ERK se normalizaron respecto a ERK total y su control. *p < 0,05 mediante ANOVA de dos vías, Bonferroni ANOVA, posttest de Bonferroni frente a CRL 30 min.

con lo observado en la línea celular MCF10DCIS.com (Figura 16 A). Al igual que lo que observamos en las líneas murinas, el tratamiento con L-NAME redujo la viabilidad celular, mientras que el DETA-NO la indujo en la línea iNOS positiva MDA-MB-231 y no se vio efecto sobre las MCF10DCIS.com (Figura 16 B). También quisimos evaluar si este efecto sobre la viabilidad celular estaba mediado por la vía mitogénica de MAPK para lo cual evaluamos el efecto del L-NAME sobre la fosforilación de ERK en ambas líneas por *Western blot*. Así también, L-NAME bloqueó la activación de ERK en la línea celular MDA-MB-231, mientras que no mostro efecto sobre la línea celular MCF10DCIS.com (Figura 16 D y F).

Estos resultados indican que la producción de NO puede contribuir a la activación de la vía molecular MAPK en células iNOS positivas, sugiriendo que la inhibición de NO es un buen blanco terapéutico en el cáncer de mama triple negativo.

El L-NAME redujo el crecimiento de tumores iNOS positivos

Para analizar el efecto sobre la inhibición del óxido nítrico en la progresión del cáncer de mama, se inocularon las tres líneas celulares (LM3, LMM3 y LM2) en el tejido adiposo de la glándula mamaria de hembras BALB/c. Los ratones fueron separados de manera aleatoria en dos grupos: donde uno de ellos recibió L-NAME 2 mM en el agua de la bebida *ad libitum* y el otro grupo permaneció como control. Al analizar el volumen tumoral post inyección de las líneas celulares LM3 y LMM3, observamos tumores significativamente más pequeños en aquellos ratones tratados con L-NAME en comparación con el grupo control a tiempo final. No se observaron diferencias en el tamaño de los tumores LM2 frente al tratamiento, sugiriendo que solo los tumores iNOS positivos fueron sensibles al inhibidor del NO (Figura 17).

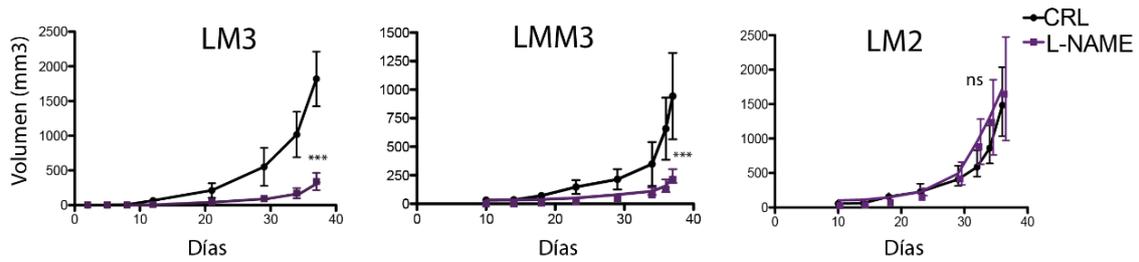


Figura 17.- Efecto de la inhibición del NO sobre el crecimiento tumoral. Curva de crecimiento tumoral en la almohadilla grasa de LM3, LMM3 y LM2. Los ratones recibieron agua normal (CRL) o L-NAME (0,5 g/L en agua potable). Los valores se expresan como medias \pm DE. *** $p < 0,001$ frente a CRL mediante la prueba t de Student.

Los estudios histopatológicos revelaron que la inoculación de células LM3 y LMM3 en almohadilla grasa de la glándula mamaria favoreció el desarrollo de tumores epiteliales, en los cuales las células estaban dispuestas de manera compacta conformando una estructura de tipo sincitial, sin mostrar un patrón definido (Figura 18). Se observaron grandes áreas necróticas y presencia de infiltrado inflamatorio (Figura 18 flechas naranjas). Asimismo, se evidenció que los tumores tratados con L-NAME presentaban una disposición celular más dispersa. En algunos sectores tumorales las

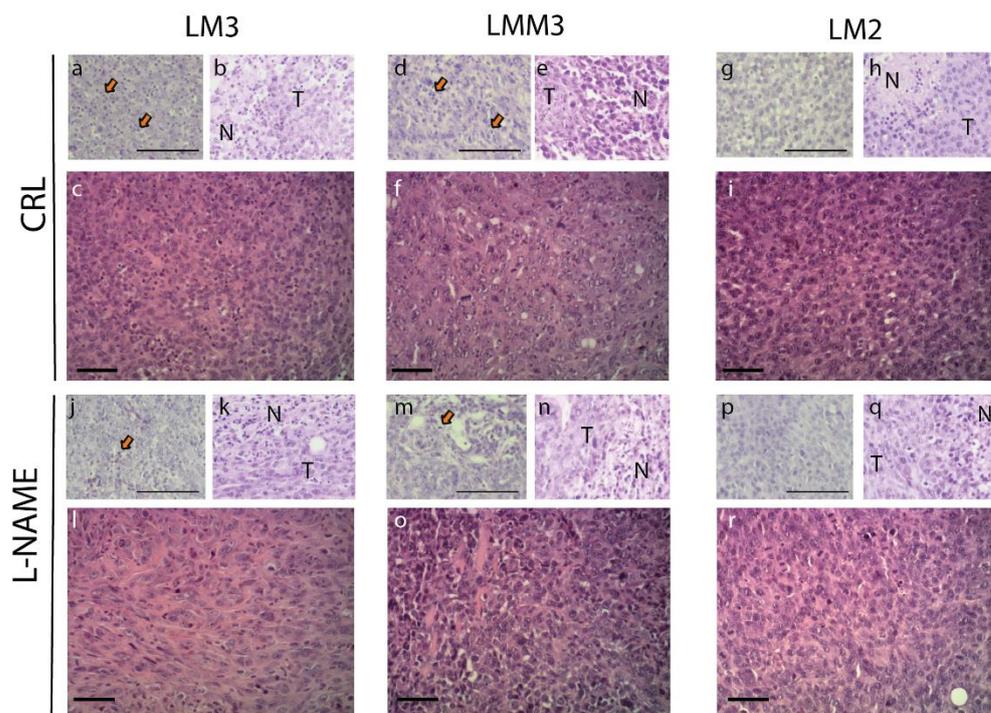


Figura 18.- Análisis histológicos de los tumores. Tinción H&E de tumores representativos. (a, c, g, j, m, p) TIL, flechas naranjas. (b, e, h, k, n, q) Imágenes representativas de necrosis. N: necrosis; T: tumores. (c, f, i, l, o, r) fenotipo tumoral. Barra de escala: 25 μ m.

células neoplásicas formaban nidos y cordones delimitados por tejido conectivo, asociado al depósito de colágeno. Los tumores LM2 también se caracterizaron por células ubicadas de manera compacta, pero con la presencia de menos áreas necróticas e infiltrado inflamatorio, en comparación con los generados a partir de las líneas LM3 o LMM3. En este caso, no se observaron diferencias histopatológicas en los tumores cuando los ratones recibieron L-NAME.

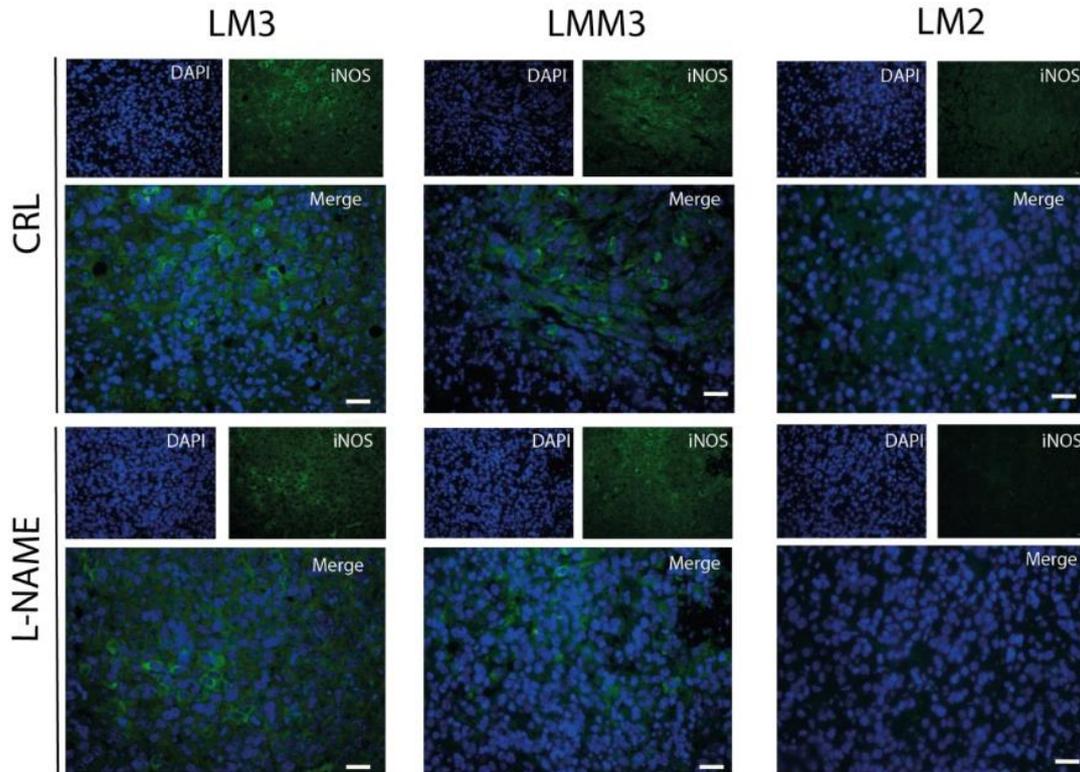


Figura 19.- Expresión de iNOS en los tumores. Inmunofluorescencia de cortes de parafina donde se evalúa la expresión de iNOS (verde) en los tumores. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 5 μ m.

Se evaluó la expresión de iNOS mediante inmunofluorescencia en los tumores para corroborar que se mantenga esta característica luego de la inoculación. LM3 y LMM3 presentaban una marcada expresión de la enzima que se vio ligeramente disminuida cualitativamente, en los cortes provenientes de ratones tratados con L-NAME. Por su parte los tumores LM2 fueron negativos tanto en la situación control como frente al tratamiento con L-NAME (Figura 19).

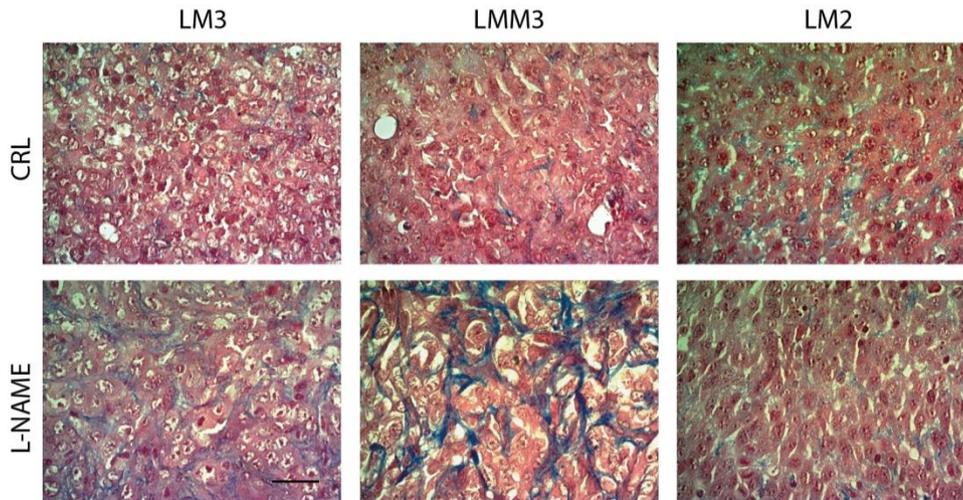


Figura 20.- Tinción tricrómico de Masson. Se muestran imágenes representativas de la tinción de Masson (colágeno en azul) para evidenciar el aumento en el depósito de colágeno asociado al tratamiento con L-NAME en las líneas iNOS positivas. Barra de escala: 50 μ m.

Previamente se han descrito cambios en la remodelación del estroma cardiaco inducidos por L-NAME¹⁴², en consecuencia se quiso evaluar el efecto de la inhibición del NO sobre el estroma del tumor mamario. Para ello se estudió mediante distintas tinciones el depósito de colágeno en los tumores murinos. Utilizando la tinción de tricromico de Masson, en los tumores LM3 y LMM3 que recibieron L-NAME se observaron células en forma estrellada compatible con fibroblastos activados. Estos resultados mostraron que L-NAME fue capaz de inducir una reacción estromal con acumulación de colágeno solo en tumores cuyas células neoplásicas expresaban iNOS (Figura 20).

Para confirmar este resultado se utilizó otra tinción específica de colágeno, como es el rojo Picrosirious, que en este caso fue posible cuantificar. El depósito de colágeno fue significativamente mayor en las líneas iNOS positivas LM3 y LMM3 frente al tratamiento con L-NAME. No se vieron diferencias significativas a nivel estromal en los tumores generados a partir de la línea LM2. Dado que los fibroblastos son los principales actores en la remodelación de la matriz y la producción de colágeno, estos resultados indican que el NO producido por las células tumorales podría estar inhibiendo la activación de fibroblastos cicatriciales en el cáncer de mama (Figura 21).

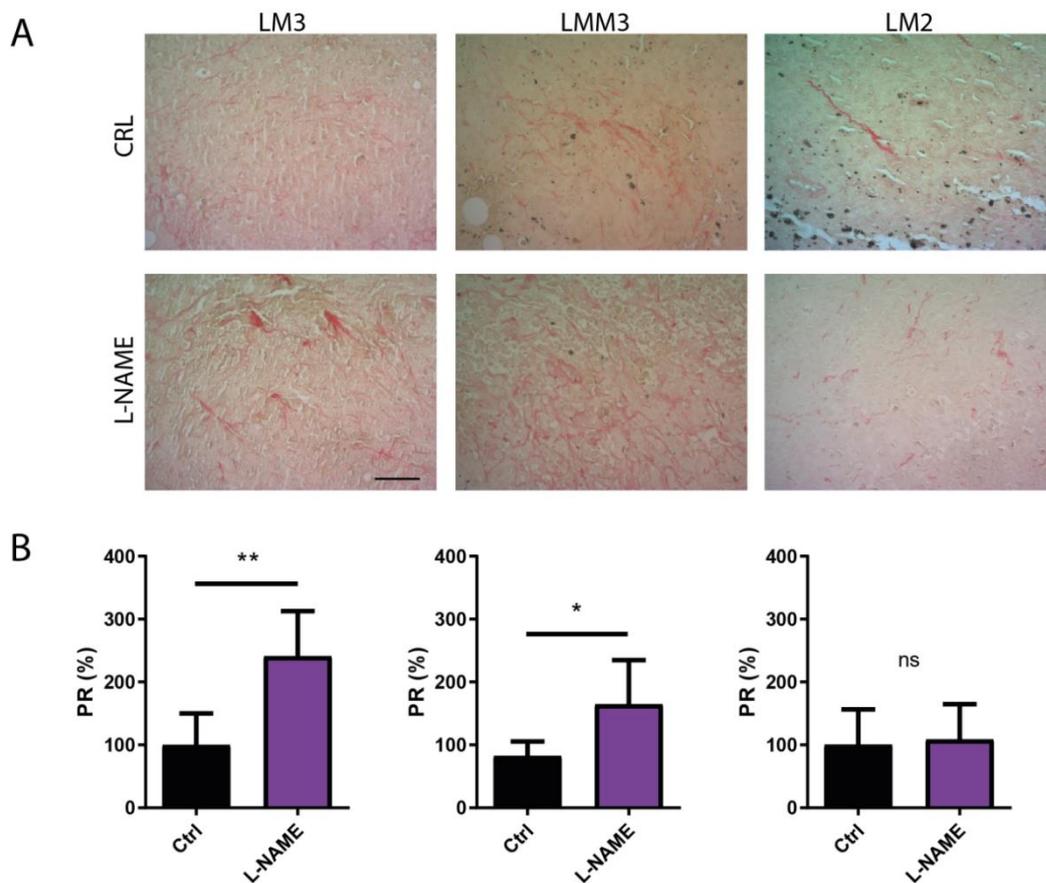


Figura 21.- Análisis del depósito de colágeno frente a la inhibición del NO. (A) Tinción de rojo Picrosirius para visualizar el colágeno (PR) y (B) cuantificación (colágeno en rojo) evaluando 5 campos por muestra. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, L-NAME frente a CRL mediante la prueba t. Barra de escala: 100 μm .

Para continuar intentando entender el papel del L-NAME en la progresión del cáncer de mama y dado que la inhibición de del NO afecta directamente la respuesta inmunitaria se analizó el infiltrado de los tumores *fat pad* de las tres líneas celulares. El infiltrado inflamatorio se determinó de forma semicuantitativa en secciones teñidas con H&E. Los tumores iNOS positivos presentaron mayor presencia de infiltrado inmune tanto intra como peritumoral. No se observaron variaciones significativas entre los tumores tratados o no con L-NAME a nivel general (Figura 22 A).

Continuando con la caracterización de este infiltrado inmune, se analizó por inmunofluorescencia la marcación para linfocitos CD8 en cortes de tumores generados a partir de las líneas LM3, LMM3 y LM2 tratados o no con L-NAME (Figura 22B). En un ensayo preliminar, se analizó el porcentaje de células CD8+ por campo en tres tumores por grupo. Se observó un aumento de células CD8+ citotóxicas en LM3 y LMM3 bajo tratamiento con L-NAME. Esto habla de un contexto inmunológico más reactivo, capaz

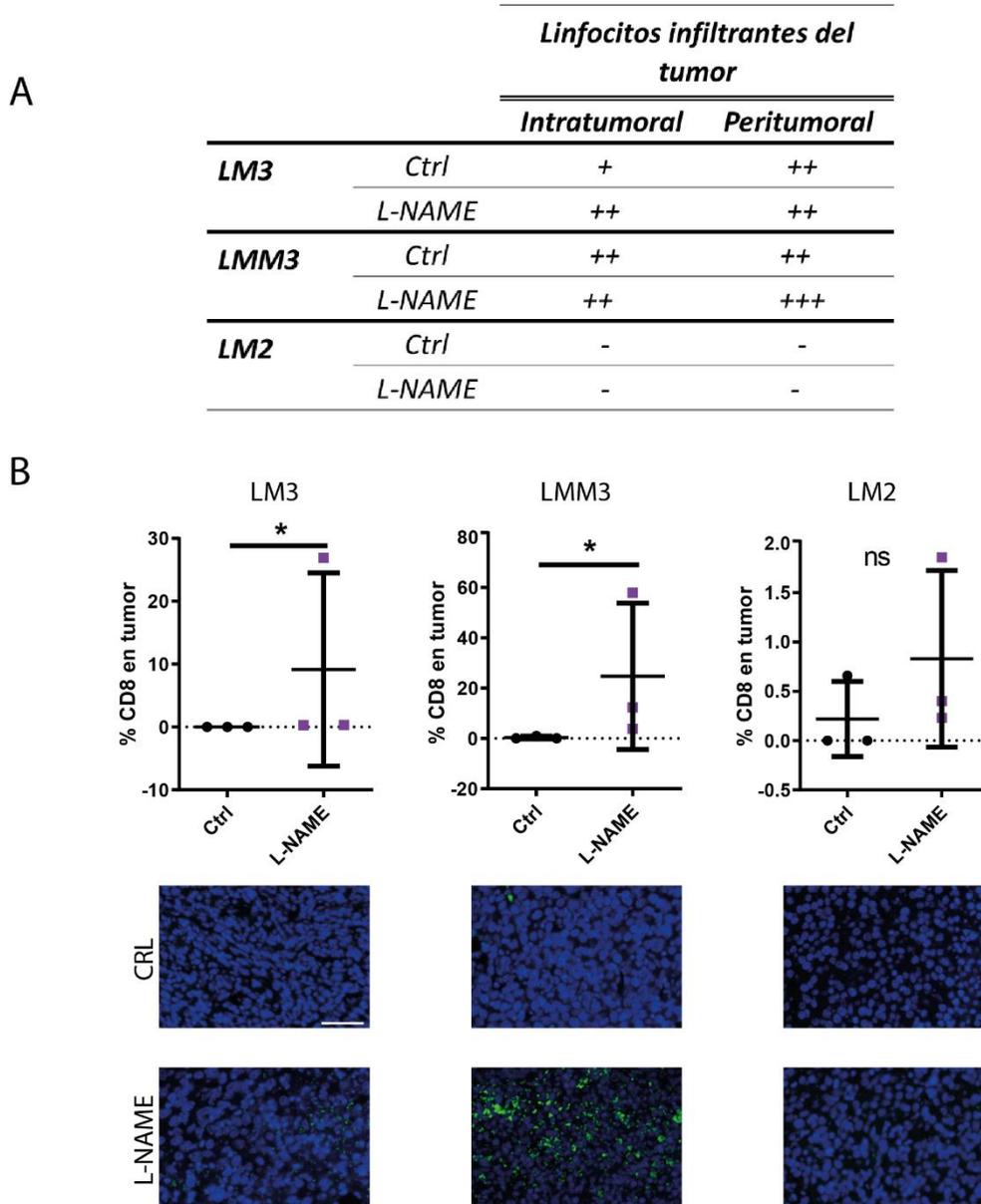


Figura 22.- Estudio del infiltrado inmune en los tumores tratados o no con L-NAME. (A) Tabla representativa de la semi cuantificación de los linfocitos infiltrantes en los tumores generados en la almohadilla grasa mamaria. Se evaluaron secciones tanto intra como peri tumorales. Se estimaron porcentajes por campo a un aumento de 200x. (B) Cuantificación de inmunofluorescencia para la marcación de CD8 en los tumores generados a partir de LM3, LMM3 y LM2, con sus respectivas imágenes representativas. Prueba de Mann-Whitney a una cola. $p=0,05$. Barra de aumento: $50\mu\text{m}$.

de activar un fenotipo antitumoral cuando se inhibe la producción de NO. Así la activación inmunológica mediada por el reclutamiento de linfocitos citotóxicos sería otro mecanismo que ocurre en simultaneo con la inhibición del crecimiento tumoral por el tratamiento con L-NAME.

Estos resultados demuestran que el L-NAME fue capaz de disminuir el tamaño tumoral de tumores iNOS positivos, acompañado de un aumento de tejido conectivo asociado a una activación de colágeno cicatricial y al reclutamiento de linfocitos citotóxicos CD8+.

La activación de fibroblastos asociados a tumor frente al tratamiento con L-NAME

El hecho de que la inhibición del NO produjera *in vivo* una disminución del crecimiento tumoral acompañado de un aumento en el depósito de colágeno, condujo al interrogante de estudiar el mecanismo por el cual el L-NAME podría estar favoreciendo la activación de fibroblastos asociados a tumor. *In vitro*, se analizaron la viabilidad y la activación de fibroblastos NIH-3T3 iNOS positivos. Se observó que la viabilidad de las células con L-NAME fue mayor en comparación con la condición control (Figura 23 A). En contraparte, el tratamiento con el donador de NO, DETA-NO, redujo la viabilidad de los fibroblastos. Además, evaluamos la activación de los fibroblastos frente al L-NAME mediante inmunofluorescencia contra el marcador de fibroblastos activados alfa-SMA y vimos un aumento en su expresión cuando los fibroblastos recibieron L-NAME (Figura 23 B).

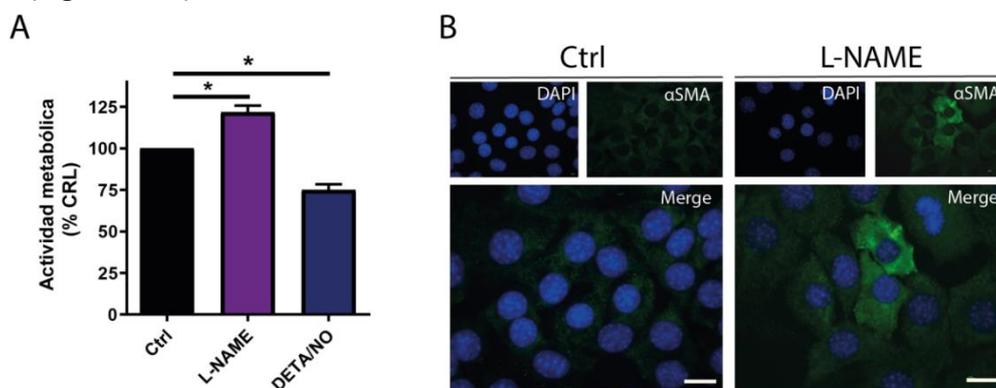


Figura 23.- Efecto *in vitro* de la modulación del NO sobre los fibroblastos. (A) Viabilidad celular medida por MTS de los fibroblastos NIH-3T3 luego del tratamiento con L-NAME (2 mM) o DETA/NO durante 48 h. * $p < 0,05$ mediante ANOVA de dos vías, postprueba de Bonferroni frente a CRL. (B) Marcación para alfa-SMA (verde) en fibroblastos NIH-3T3 tratados con L-NAME 2mM durante 48 hs. Barra de escala: 3 μ m.

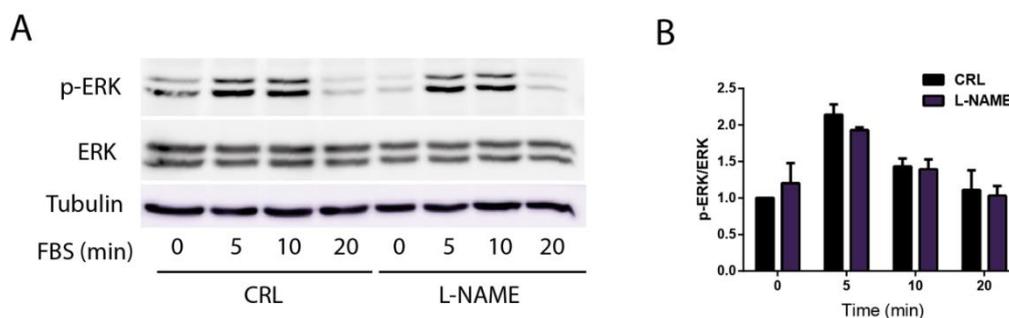


Figura 24.- Efecto de la inhibición de la producción de NO sobre la vía de MAPK en fibroblasto. (A) Imágenes representativas de *Western blot* de p-ERK y ERK total. La tubulina como control de carga (B) Los valores se representan como la media \pm SEM, n=3 experimentos independientes. p-ERK relativizado a ERK total y al control por ANOVA de dos vías, Bonferroni.

Dado que L-NAME inhibió la activación de ERK inducida por SFB en las células tumorales, quisimos evaluar el efecto sobre la vía de MAPK frente a la inhibición del NO en los fibroblastos. Se realizó el mismo procedimiento que se describió anteriormente y se observó que la fosforilación de ERK inducida por SFB a los 5 y 10 min en este caso no se moduló con el tratamiento (Figura 24). De manera que la inducción de la proliferación en los fibroblastos por L-NAME en este caso no estaría mediada por ERK.

Finalmente se evaluó la activación de fibroblastos en los cortes parafinados de tumores realizando una marcación por inmunofluorescencia de alfa-SMA. Los tumores iNOS positivos que recibieron L-NAME mostraron una mayor proporción de alfa-SMA directamente asociada a fibroblastos activados (Figura 25).

A partir de los resultados aquí descritos, podemos inferir que el NO inhibe la proliferación y activación de fibroblastos y en paralelo aumenta del crecimiento de células tumorales iNOS-positivas. De manera que el tratamiento con un inhibidor de las NOS cómo es el L-NAME, estaría contribuyendo a la activación de un estroma cicatricial en paralelo con la inducción de una respuesta inmune antitumoral y podría ser utilizado para mejorar las terapias ya existentes contra el cáncer de mama.

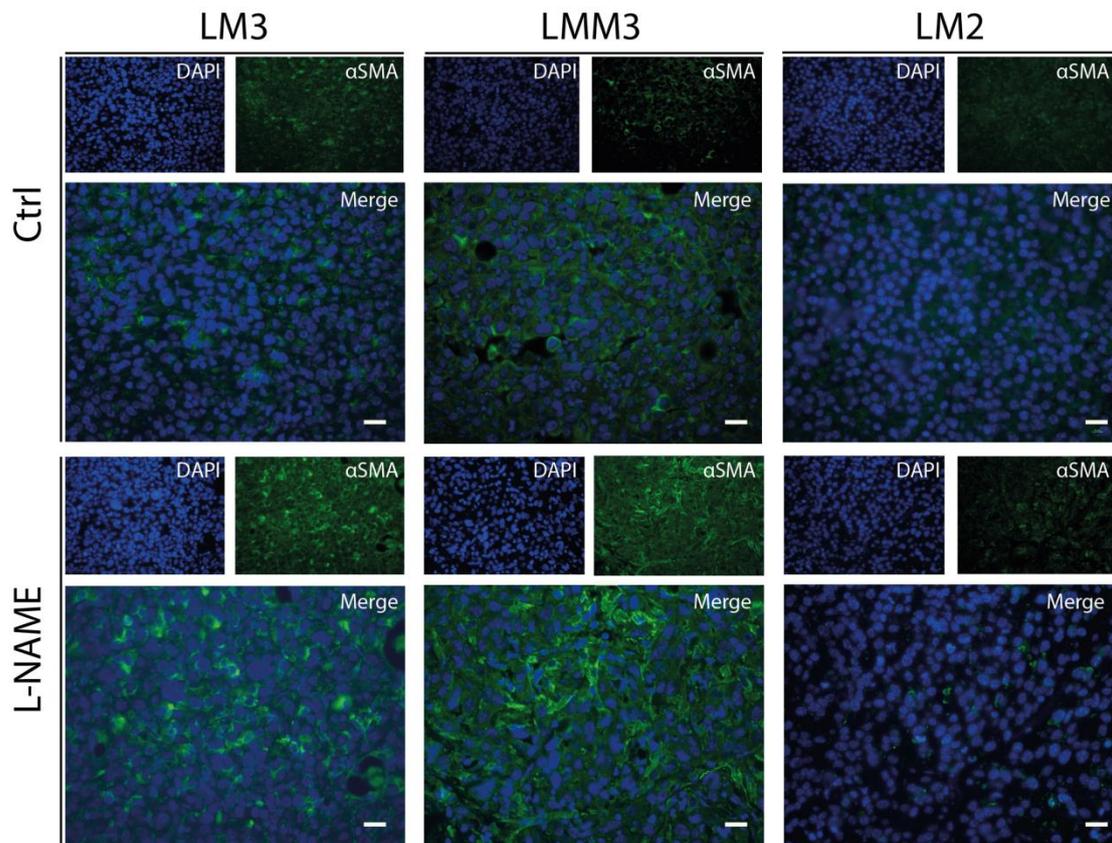


Figura 25.- Marcación contra alfa-SMA en cortes de tumores fat pad. Inmunofluorescencia en cortes de parafina de los tumores para la marcación de α -SMA (verde) con DAPI (azul). Barra de escala: 5 μ m.

Conclusiones parciales capítulo 1

A modo de conclusión se puede decir que en este capítulo se pudo caracterizar un modelo murino de cáncer de mama en relación al rol del NO en la progresión tumoral. Se estableció que de las líneas murinas mamarias LM3, LMM3 y LM2, las dos primeras expresaron niveles proteicos y transcripcionales altos de iNOS y fueron sensibles a la modulación de la producción de NO.

En cuanto a las vías que pueden estar implicadas en el efecto sobre la viabilidad celular, la activación de la vía de las MAPK parece ser uno de los mecanismos que se ve inhibido frente al tratamiento con L-NAME en las líneas iNOS positivas. Resultados similares se pudieron observar en líneas humanas, donde MDA-MB-231 fue positiva para iNOS y sensible a la modulación del NO en contraparte con la línea MCF10DCIS.com negativa para iNOS. Nuevamente la activación de ERK se vio modulada en la línea iNOS positiva MDA-MB-231 frente al tratamiento con L-NAME como se observó en el modelo murino.

In vivo los tumores generados a partir de las líneas iNOS positivas fueron significativamente sensibles al tratamiento con L-NAME. Estos tumores presentaron un marcado aumento del depósito de colágeno asociado a una activación estromal que estaría asociado a un fenotipo más cicatricial. En cuanto al reclutamiento inmune de tumores los iNOS positivos presentaron una mayor proporción de TILs y en particular se observó un aumento de los linfocitos citotóxicos CD8+ frente al tratamiento con L-NAME, favoreciendo la generación de un ambiente inmune más reactivo y antitumoral.

En relación con la reacción desmoplásica observada en los tumores iNOS positivos se quiso determinar la implicancia de los fibroblastos en este proceso de progresión. *In vitro* los fibroblastos murinos NIH-3T3 demostraron ser sensibles a la modulación del NO pero dicho efecto no fue mediado por la vía de las MAPK. Se demostró por su parte que la reacción desmoplásica observada en los tumores iNOS positivos frente al tratamiento con L-NAME estaba asociada un aumento de fibroblastos activados. De manera que el NO estaría actuando como un factor inductor de la proliferación o supervivencia en las células tumorales y como un factor bloqueante de la diferenciación y/o activación de los fibroblastos.



Capítulo 2a



Desarrollo de un modelo intraductal singénico. Análisis de la contribución de las células cancerosas EPI y MEP en la progresión de estadio *in situ* a invasor

La mayoría de los modelos murinos preclínicos para el estudio de cáncer de mama utilizan la inoculación de células tumorales en subcutáneo o en la almohadilla de tejido adiposo de la glándula mamaria, dejando de lado el desarrollo temprano de la enfermedad. En consecuencia, son escasos los modelos ortotópicos en los cuales los tumores se generen directamente en el ducto galactóforo de la glándula mamaria, que permitan así evaluar procesos vinculados con la transición del tumor *in situ* hacia el estadio invasor.

Además, la mayoría de los estudios se realizan utilizando líneas tumorales puras que no permiten evaluar las interacciones entre célula EPI y MEP y su rol en la carcinogénesis y progresión tumoral. En consecuencia, el objetivo de este capítulo es avanzar con la caracterización de un modelo murino de cáncer de mama de crecimiento intraductal para el estudio de procesos biológicos determinantes en la progresión del tumor de un estadio *in situ* a un estadio invasor. Además de estudiar la contribución de las componentes EPI y MEP en procesos biológicos claves de crecimiento (viabilidad y sobrevida) y de la progresión (adhesión, migración e invasión).

Desarrollo del modelo intraductal

Como se mencionó previamente el conducto normal de la glándula mamaria está revestido por un epitelio formado por dos tipos celulares las EPI y las MEP. La mayoría de los tumores de mama se generan a partir de la población EPI, en cuanto al papel de las MEP en la tumorigénesis se las ha asociado a un rol más supresor tumoral, aunque existen trabajos que caracterizaron fenotipos de esta población que promueven la progresión de la enfermedad⁶³. El modelo celular LM38 consta de tres líneas celulares: LM38-LP (EPI y MEP), LM38-HP (EPI) y la LM38-D2 (MEP)^{65,66,68}.

En primera medida se analizó la capacidad tumorigénica de las tres líneas que componen el modelo, para ello se inocularon 200.000 células en la almohadilla grasa de la glándula mamaria. Las tres variantes celulares fueron capaces de formar tumores, sin

embargo, el porcentaje de toma y la latencia tumoral fueron más altas en las LM38-LP comparado con las otras dos líneas. Toma: 100% para LM38-LP versus 40% para LM38-HP y 60% para LM38-D2; Latencia en días: LM38-LP: 7 [6-8], LM38-HP: 40 [27-56], LM38-D2: 12 [10-14]. La velocidad de crecimiento de LM38-LP mostro una tendencia a ser mayor que las otras dos líneas celulares (Figura 26 A). La utilización del modelo *fat pad* demostró entonces la tumorigenicidad de las líneas LM38 en un contexto similar al original, comparable a los observado en trabajos previos en los cuales se utilizó la inoculación subcutánea⁶⁵.

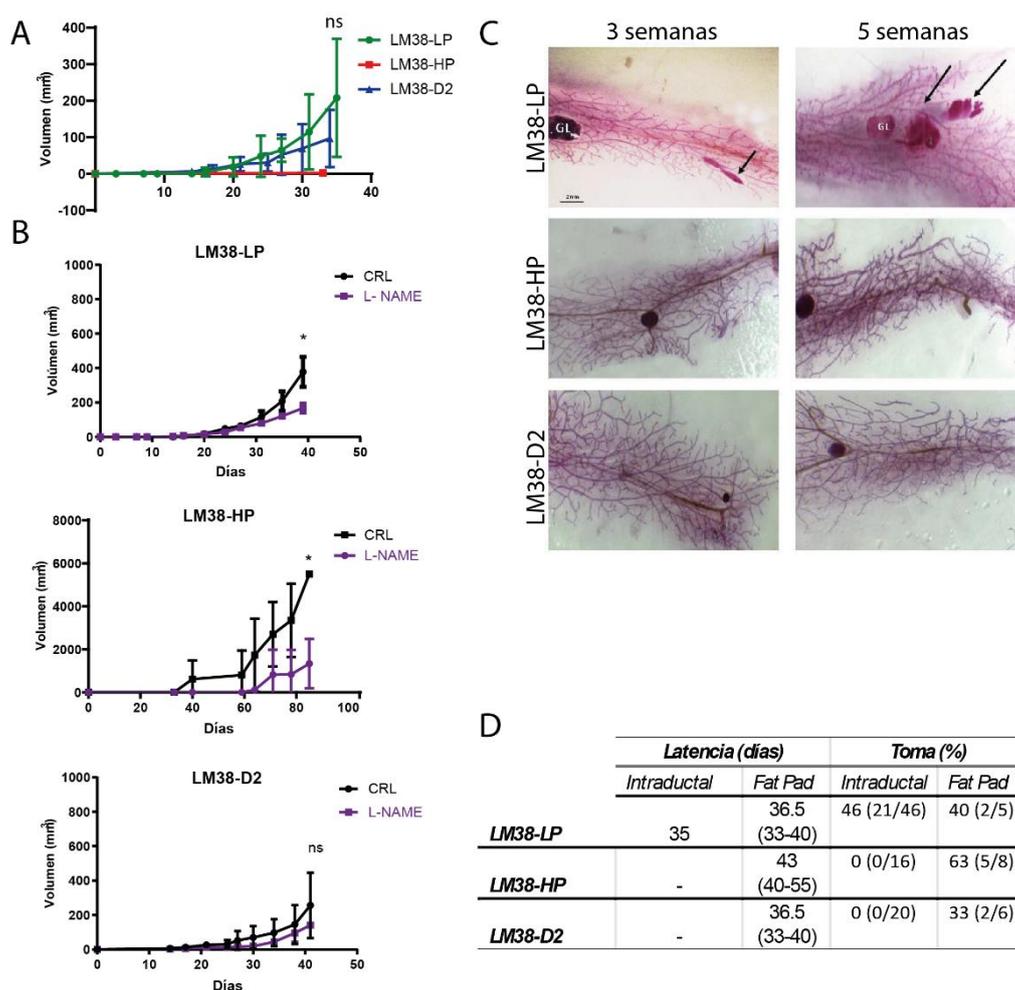


Figura 26.- Comparación del modelo fat pad contra el modelo intraductal. (A) Curva de crecimiento de las células LM38 inoculadas en el *fat pad*. ns, ANOVA de una vía a tiempo final, Comparaciones múltiples Tukey. n=5 ratones por línea celular (B) Curvas de crecimiento de las líneas del modelo LM38 en el *Fat Pad* frente al tratamiento con L-NAME. (*p<0,05, T-test a dos colas a tiempo final, Grupos CRL vs L-NAME. n=4 por línea celular). (C) Tinción de Carmín de las glándulas mamarias obtenidas a tres y cinco semanas post inoculación de las líneas celulares LM38. Barra de aumento: 2 mm. (D) Tabla comparativa entre el modelo *fat pad* y el modelo intraductal comparando la misma concentración celular de 5.000 células por glándula.

Por su parte tanto los tumores generados a partir de la línea LM38- LP como la línea LM38-HP mostraron ser sensibles al tratamiento con el inhibidor L-NAME, no así en el caso de la línea LM38-D2 (Figura 26 B). El estudio del efecto de la modulación de la producción del NO en este modelo celular fue profundizado en trabajos previos del grupo de trabajo⁶⁷. Dado que las líneas LM3, LMM3 y LM2 utilizadas en el capítulo 1 no fueron capaces de generar tumores de manera intraductal, no se continuaron utilizando para el estudio de la progresión temprana.

Para continuar entonces con la generación de un modelo intraductal se procedió a la inoculación de 5.000 células en la cuarta glándula mamaria (izquierda y derecha) de las tres variantes del modelo LM38 (LM38 – LP, LM38 – HP y LM38 – D2). Los ratones fueron sacrificados a diferentes tiempos de manera de analizar la presencia y característica de los tumores. En las glándulas que fueron inyectadas con las líneas LM38-HP y LM38-D2 no se observó presencia de tumores tanto a las tres como a las cinco semanas post inoculación (HP: 0 glándulas positivas sobre un total de 16 inoculadas y D2: 0 glándulas positivas sobre 20 inoculadas) (Figura 26 C). En las glándulas inoculadas con la población mixta sí se observaron tumores (LP: 21 glándulas positivas de un total de 46 inoculadas; $p < 0,001$ X^2 test vs HP y D2). La inoculación de la línea mixta LM38-LP generó a las tres semanas post inoculación tumores *in situ* que se visualizaron como distensiones y engrosamiento del ducto a través de la tinción de carmín. Estos tumores progresan espontáneamente a tumores invasores luego de las cinco semanas. Los mismos se visualizan como masas que excedían los límites del ducto (Figura 26 C panel derecho).

Estos resultados sugieren que la cooperación entre las dos poblaciones celulares es necesaria para la formación de tumores intraductales. Dado que en primera instancia inoculamos en el *fat pad* una concentración de células mayor a la que se inocula de manera intraductal y con el objetivo de descartar el hecho de que el número celular podría ser el causante del no crecimiento tumoral por parte de las líneas que están formadas por una sola población se procedió a inocular entonces 5.000 células en el *fat pad* de ratones BALB/c y se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la inoculación de 200.000 células en las líneas LM38-HP y LM38-D2. La latencia fue mayor

en el caso de los tumores LM38-LP y su toma fue menor, comparable a lo observado en el modelo intraductal con esa concentración celular (Figura 26 D).

Caracterización de los tumores intraductales de LM38-LP

El análisis histológico con H&E mostró que los tumores inoculados con la línea celular LM38-LP de tres semanas de evolución se encontraban dentro del conducto galactóforo con la presencia de una membrana basal conservada, corroborando que se encontraban en un estadio *in situ* (Figura 27 A). En algunos casos, fue posible observar eventos de micro invasión (Figura 27 A). En dicha imagen se observa un grupo de células tumorales que invaden el estroma coincidente con zonas donde la membrana basal está interrumpida, acompañadas de presencia de infiltrado inflamatorio.

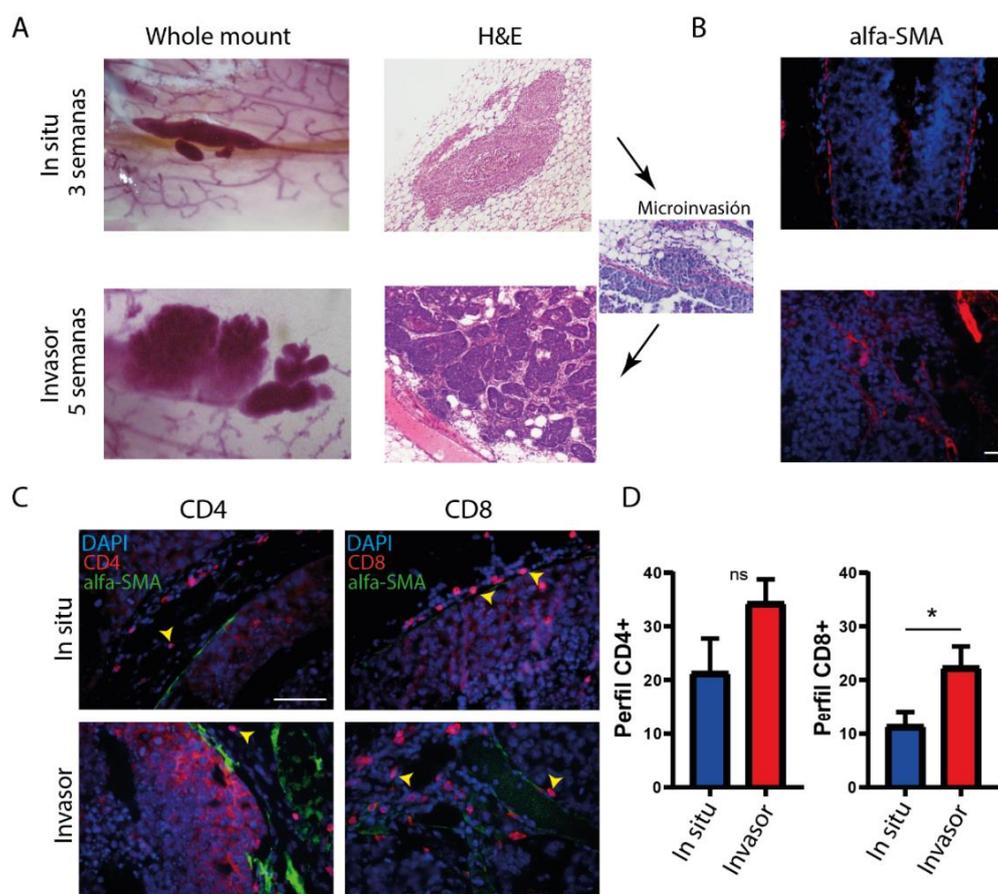


Figura 27.- Caracterización del modelo intraductal LM38-LP. (A) Histología de las glándulas mamarias. Magnificaciones de la tinción con carmín de los tumores *in situ* e invasor y H&E. (B) Inmunofluorescencia de cortes parafinados contra alfa-SMA. Barra de aumento: 50 μ m. (C) Inmunofluorescencias representativas de CD4 y CD8 en cortes de tumores de estadio *in situ* e invasor. Barra de aumento: 50 μ m. (D) Cuantificación de células CD4 y CD8 contra células totales. (* $p < 0,05$, t-test a dos colas, Tumores *In situ* vs Invasor, se muestra 1 de 2 experimentos con la misma tendencia).

El análisis histológico de los tumores luego de tres semanas post inoculación reveló que eran compatibles con un carcinoma ductal *in situ* de alto grado nuclear (alto pleomorfismo nuclear e índice mitótico), con un patrón histoarquitectural de tipo sólido y comedo-necrosis (Figura 27 A H&E). A su vez por inmunofluorescencia y utilizando un anticuerpo específico para alfa-SMA, se pudo corroborar la conservación de la capa de células MEP bordeado a los tumores *in situ*. (Figura 27 B).

Al analizar la histología de los tumores obtenidos luego de cinco semanas post inoculación, se observaron tumores de mayor tamaño con características invasoras. En este estadio, la membrana basal se encontró completamente desorganizada, sin límites de contención del epitelio mamario (Figura 27 A y B). El análisis histológico reveló tumores de tipo adenocarcinomas papilares diferenciados con presencia de estructuras tipo cribas y esbozos de estructuras glandulares (pseudoglandulares). Estos tumores se caracterizan por una importante reacción desmoplásica con depósito de fibras de colágeno y de infiltrado inflamatorio tanto intra como peritumoral. Luego de la necropsia de los ratones, no se observaron metástasis macroscópicas en pulmón ni hígado.

Comúnmente, el proceso progresión tumoral va acompañado de un reclutamiento de células inmunes que puede favorecer o no la invasión según el perfil inmune¹⁴³. En consecuencia, se evaluó la presencia de células inmunes a partir de cortes histológicos de tumores *in situ* e invasores obtenidos luego de la inoculación intraductal de células LM38-LP en el ducto de la glándula mamaria de ratones Balb/c (Figura 27 C). Utilizando la técnica de inmunofluorescencia, se evidencio una tendencia a un aumento de los linfocitos CD4+ y un aumento significativo en el número de CD8+ en el estadio invasor al compararlo con el estadio *in situ* (Figura 27 D). Estos resultados nos indican que el proceso de invasión temprana, consecuencia de la ruptura de la membrana basal y posterior contacto de las células neoplásicas con el estroma, induciría el reclutamiento de linfocitos T citotóxicos en la zona de invasión. Lo cual nos habla de una respuesta inflamatoria antitumoral al menos en la transición del estadio *in situ* al invasor.

Es posible discriminar a las poblaciones celulares que conforman las líneas LM38 por marcadores específicos y por tamaño nuclear. Por su parte la expresión de E –

cadherina es propia de la componente EPI, mientras que alfa-SMA es característico de la componente MEP (Figura 28 A). Al evaluar la expresión de estos marcadores en el modelo celular LM38 se pudo observar que los marcadores característicos de las poblaciones no se mantuvieron en las líneas establecidas (Figura 28 B).

La expresión del ARNm de E-cadherina fue mayor en LM38-LP comparado con LM38-HP. Indicando que la línea celular LM38-HP ha perdido a lo largo de los sucesivos pasajes la expresión de la misma. Además, la expresión de alfa-SMA también se evidenció más alta en LM38-LP comparado con LM38-D2, sugiriendo una desdiferenciación de la población celular a partir de su aislamiento. El hecho de que la LM38-LP presente este fenotipo más diferenciado que sus poblaciones establecidas por separado, podría conferirle una ventaja a la hora de colonizar el ducto en el modelo murino intraductal, dado que son proteínas que están involucradas en la interacción célula- célula y en el movimiento celular.

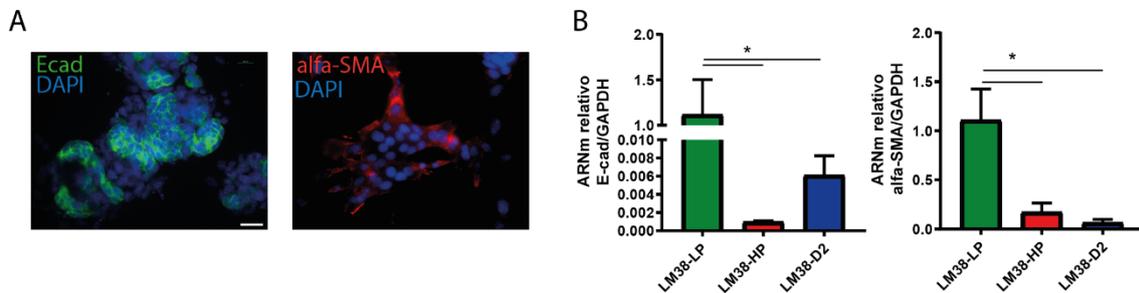


Figura 28.- Expresión diferencial de marcadores epiteliales y mioepiteliales en la línea celular mixta y las líneas establecidas. (A) Inmunofluorescencia que muestra la expresión diferencial de E-cadherina (epiteliales) y alfa-SMA (mioepiteliales) en la línea LM38-LP. Barra de aumento: 50 μ m. (B) Niveles de expresión de E- cad y SMA para las líneas LM38 por qPCR normalizado a GAPDH (* p <0,05, ANOVA de una vía con comparaciones de Tukey, n=3).

Rol de la componente EPI y MIO en mecanismos clave de la progresión tumoral

De acuerdo a los resultados obtenidos, solo la línea bicelular LM38-LP fue capaz de formar tumores intraductales. Además, los tumores generados luego de la inoculación con LM38-LP en el *fat pad* fueron más agresivos comparados con los generados con LM38-HP y LM38-D2. Estas observaciones llevan a hipotetizar que el dialogo intercelular que se esté dando entre las poblaciones que conforman la línea LM38-LP podría conferir una ventaja para la formación y progresión del tumor. Por ello

examinamos la implicancia de diferentes mecanismos celulares como la supervivencia, adhesión, migración e invasión, en este modelo.

La sobrevivencia es uno de los primeros puntos que la célula tumoral debe afrontar para continuar el desarrollo tumoral. Por ello en primera instancia se analizó la viabilidad de las líneas en el estado basal frente a distintos porcentajes de SFB. Se realizó un MTS a las 24 hs con diferentes porcentajes de SFB en medio de cultivo. Como se observa en la Figura 29A las células LM38-LP tuvieron una actividad metabólica significativamente mayor que LM38-D2 en 1% de SFB, y se observó la misma tendencia con 5% de SFB. Las LM38-HP y las LM38-D2 no mostraron ser metabólicamente diferentes entre sí. Siendo entonces la línea LM38-LP la que presenta mayor viabilidad en las condiciones más adversas de bajo SFB.

Sumada al estudio de la sobrevivencia, se analizó la capacidad de adhesión de las tres líneas LM38. Se pudo observar una capacidad de adhesión significativamente mayor en la línea LM38-HP en comparación con las otras dos líneas celulares que componen el modelo (Figura 29 B).

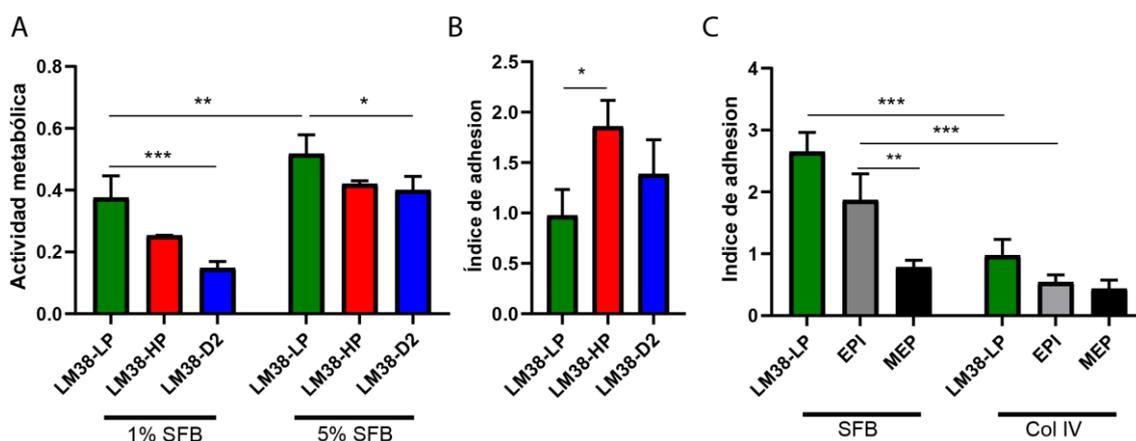


Figura 29.- Actividad metabólica basal y adhesión. (A) Ensayo de MTS con 1% y 5% de SFB luego de 24 hs. (***) $p < 0,001$, ANOVA de 2 vías con comparaciones de Tukey, $n=3$). (B) Índice de adhesión de las tres líneas LM38 frente a colágeno IV (* $p < 0,05$, ANOVA de una vía con comparaciones de Tukey, $n=3$). (C) Índice de adhesión de LM38-LP en SFB y colágeno IV diferenciando las poblaciones celulares. (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, ANOVA de 2 vías con comparaciones de Tukey, $n=3$).

Se prosiguió a analizar la capacidad de adhesión de la línea LM38-LP, que a partir de trabajos previos sabemos que es posible discernir las células EPI de las células MEP según su tamaño nuclear, siendo las primeras de núcleo más pequeño (hipotriploides) y las segundas de núcleo más grande (hipertetraploides)⁶⁵. En este caso se evaluó además

la adhesión a SFB en comparación con el colágeno IV. La adhesión en la línea LM38-LP a SFB fue mayor en comparación con el colágeno IV y en particular cuando se analizó la componente EPI. Ambas poblaciones que componen la línea LM38-LP mostraron el mismo índice de adhesión a colágeno IV (Figura 29 C).

Una de las características esenciales de la transformación maligna es el aumento de la capacidad invasiva. Para que las células puedan invadir, tienen que degradar los componentes de la membrana basal y de la matriz extracelular. Para analizar la capacidad degradativa de las líneas se realizó un ensayo de degradación de gelatina, proceso en el cual estarían involucradas metaloproteasas de membrana como MT1-MMP (MMP-14)⁹⁴. Se cuantificaron las zonas donde la gelatina que se encontraba degradada identificadas como áreas con ausencia de fluorescencia (Alexa 488). Se pudo observar una diferencia en la capacidad de degradación de las distintas líneas, que se

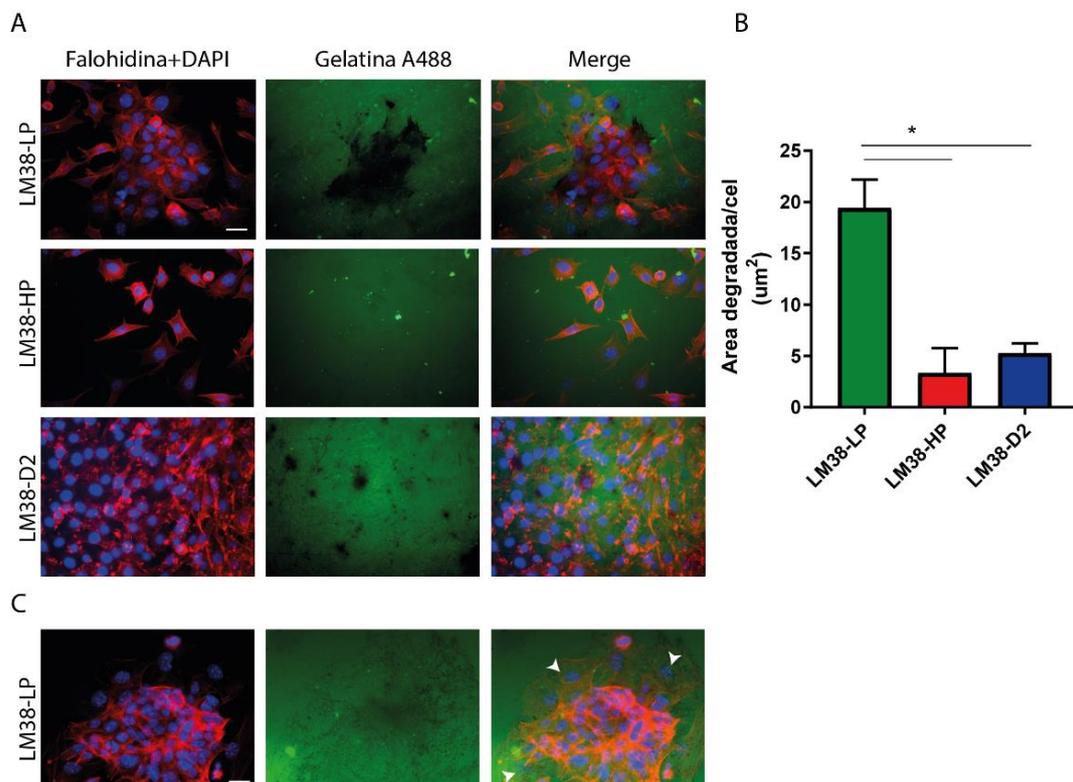


Figura 30.- Degradación de la gelatina. (A) Inmunofluorescencia representativa de las líneas LM38 en las cuales se puede apreciar el área degradada como los sectores en ausencia de fluorescencia. (B) Cuantificación del área degradada por célula total (*p<0,05, ANOVA de una vía con comparaciones de Tukey, n=3). Barra de aumento: 10µm. (C) Inmunofluorescencia de células LM38-LP donde se puede apreciar el área degradada como los sectores en ausencia de fluorescencia más asociado a la población MEP (se ejemplifica con flechas blancas). También se muestra la tinción con faloidina A568, gelatina A488 y DAPI. Barra de aumento: 10µm

cuantifico como el área degradada en función de las células totales. Se pudo advertir que el área degradada por células totales, en las LM38-LP fue significativamente mayor en comparación con las líneas LM38-HP y LM38-D2 (Figura 30).

La línea celular mixta, fue la que presentó mayor capacidad degradativa. Como se puede apreciar en la figura 30 C, y basándonos en la morfología nuclear y en la posición de las células en el islote concluimos que la degradación está asociada a las células MEP (señaladas con flechas blancas).

Otro proceso clave en el proceso de progresión y diseminación tumoral es la migración celular. Para estudiar este proceso en el modelo celular LM38 se realizó un ensayo de migración aleatoria en 2D en tiempo real. Se realizó sin y con colágeno tipo I, que es el principal componente de la matriz extracelular (Figura 31). La velocidad media fue mayor en la línea LM38-HP en la condición sin colágeno, en presencia de este sustrato la línea LM38-LP mostro una velocidad similar a la LM38-HP mientras que LM38-D2 continuó siendo la línea con menor velocidad migratoria. En cuanto a la direccionalidad de la migración (Rectitud), sin el agregado de ningún quimiotractante, LM38-LP mostro tener mayor direccionalidad en su movimiento que las líneas

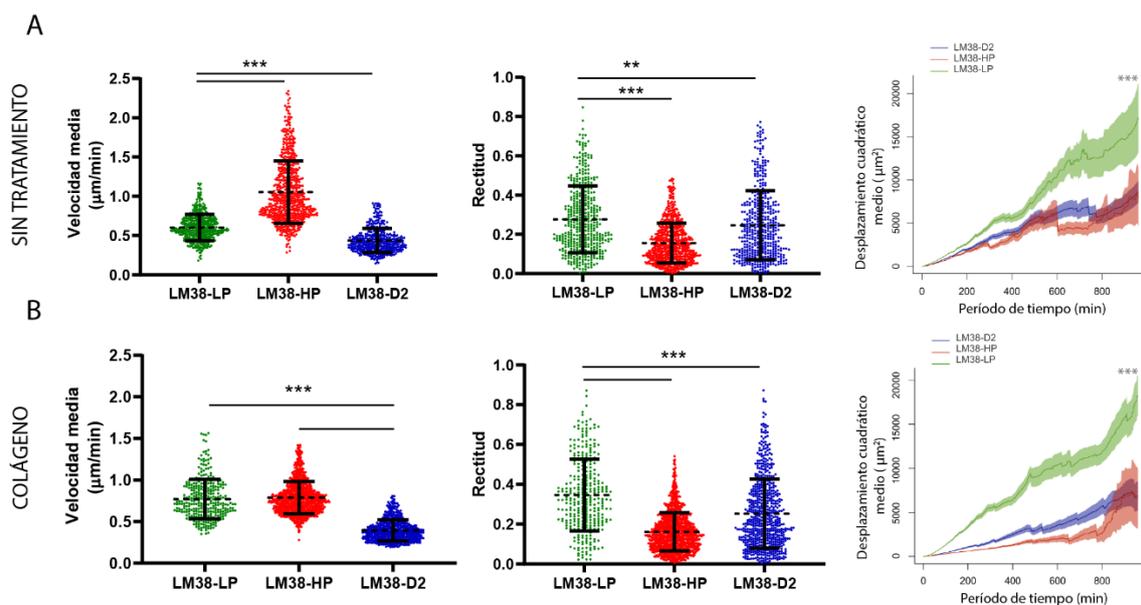


Figura 31.- Migración en el modelo celular LM38. (A) Velocidad media, rectitud y desplazamiento cuadrático medio de las líneas celulares LM38 en vidrio (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, ANOVA de una vía con comparaciones de Tukey. En el caso del desplazamiento cuadrático medio se analizó a tiempo final). (B) Velocidad media, rectitud y desplazamiento cuadrático medio de las líneas celulares LM38 en colágeno tipo I (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, ANOVA de una vía con comparaciones de Tukey. En el caso del desplazamiento cuadrático medio se analizó a tiempo final).

unicelulares, sugiriendo que el diálogo entre las poblaciones estaría favoreciendo la migración. Así mismo LM38-LP mostro tener un mayor desplazamiento cuadrático medio que nos da una idea de cómo se desplaza una célula a lo largo del tiempo (Figura 31). Estos últimos dos parámetros dan cuenta de una migración más eficiente, sugiriendo que la migración de LM38-LP mediada por ambas poblaciones sería otro de los procesos que conlleven a la mayor tumorigenicidad de la línea mixta en el ducto mamario.

Identificación de factores solubles involucrados en el diálogo celular

Para profundizar acerca del posible diálogo entre las componentes celulares, se buscó analizar si esta interacción esta mediada por la presencia de factores solubles. Al analizar la actividad metabólica pero ahora frente a la exposición de las células a los medios condicionados de las tres líneas, se observó un aumento significativo en la actividad metabólica frente al medio condicionado de LM38-D2 tanto en las células LM38-LP como en las LM38-HP (Figura 32). Estos resultados sugieren que existen factores solubles secretados por las células MEP que son capaces de inducir la actividad metabólica en la población mixta y en la EPI.

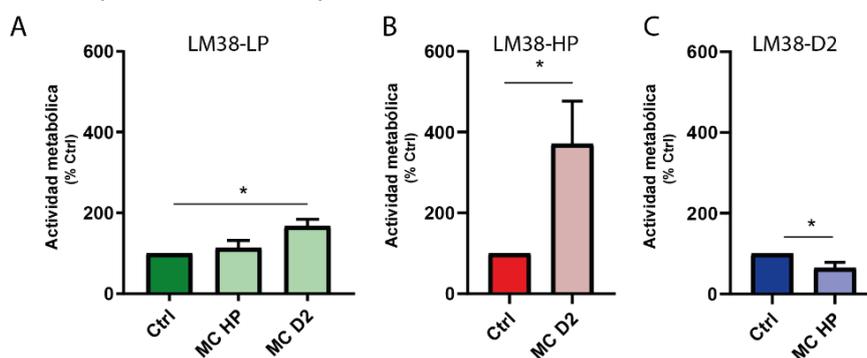


Figura 32.- Actividad metabólica frente a los medios condicionados cruzados en el modelo celular LM38. La actividad metabólica se relativiza al control de cada línea y se expresa como porcentaje (* $p < 0,05$ ANOVA de una vía con comparaciones de Tukey y t-test a dos colas, $n=4$).

Para profundizar acerca de cuál o cuáles pueden ser los mecanismos que aumenten la viabilidad celular, se cuantificó mediante inmunofluorescencia la expresión de PCNA. Las células LM38-LP en presencia del medio condicionado de LM38-D2 presentaron un aumento de la expresión de PCNA en relación a sus respectivos controles (Figura 33). Las células LM38-D2 en contacto del medio condicionado de LM38-HP presentan una disminución de la intensidad en PCNA consistente con la ligera inhibición

observada en el ensayo de actividad metabólica (Figura 32). Por su parte, las células LM38-HP no tuvieron diferencias de expresión entre la condición control y la tratada con medio condicionado.

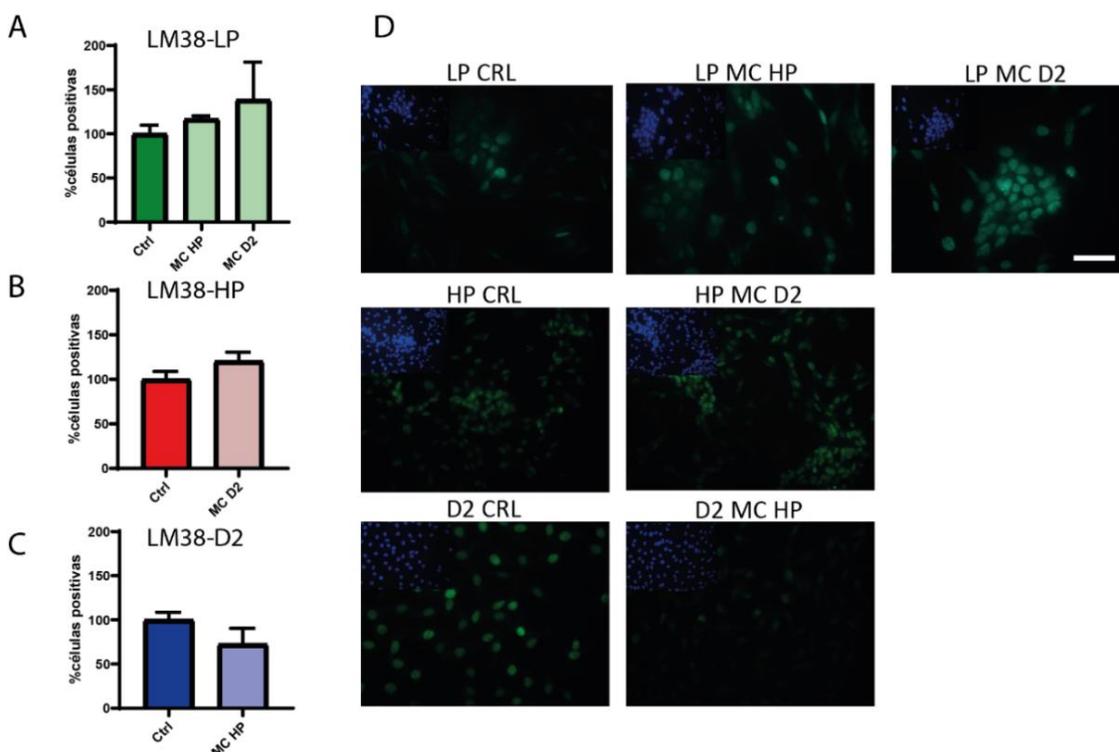


Figura 33.- Evaluación de la expresión de PCNA frente al tratamiento con medios condicionados. (A-C) Células positivas relativizadas al número de células totales. Inmunofluorescencias para PCNA con su respectivo. Se diferenció la expresión de PCNA: puntillado, intensidad fuerte e intensidad media. Barra de aumento: 50 μ m (ns, ANOVA de una vía con comparaciones de Tukey y t-test a dos colas, n=2).

Debido a que ciertos factores de crecimiento suelen activarse por calor¹⁴⁴, se sometió el medio condicionado de LM38-D2 a distintas temperaturas y al ponerlo en contacto con las células LM38-LP y LM38-HP no se observaron diferencias significativas en comparación con la situación control. Esto sugiere que no existirían conformaciones proteicas inactivas en los medios condicionados (Figura 34 A y B).

En trabajos previos de nuestro grupo de trabajo, se reportó una mayor producción de TGF-B1 en aquellas líneas con células MEP¹⁴⁵. Quisimos determinar entonces si el TGF-B1 podría ser uno de los factores involucrados en este diálogo y para ello utilizamos las células MV-1-Lu sensibles a TGF-B1¹⁴⁶. Observamos que la viabilidad de MV-1-Lu tendió a disminuir frente al tratamiento de 2 ng/ml de TGF-B1 y se revertió con el agregado del inhibidor de la actividad quinasa del receptor TGFBR1 (ALK5, ALK4,

y ALK7) denominado SB431542¹⁴⁷. Por su parte el tratamiento con el medio condicionado de LM38-D2 produjo una disminución mayor de la viabilidad de las células MV-1-Lu que se vio significativamente recuperada frente al tratamiento con SB431542 (Figura 34 C). Esto sugeriría que al menos el TGF-B1 es uno de los factores que está presente en el medio condicionado de LM38-D2 y que podría estar involucrado en el dialogo celular entre la población EPI y MEP favoreciendo su capacidad carcinogénica intraductal y la progresión temprana de los tumores LM38-LP.

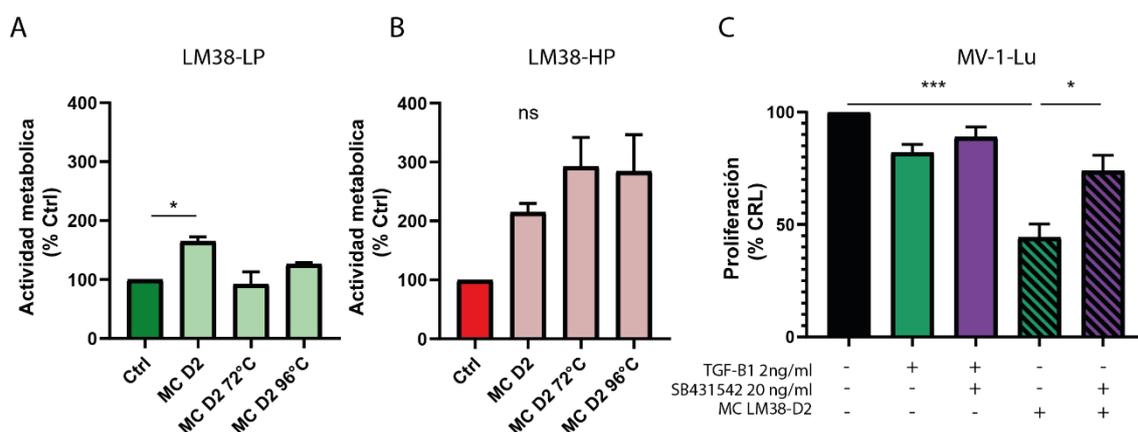


Figura 34.- Estudio de los factores solubles del medio condicionado de LM38-D2. Medida de la actividad metabólica por MTS del medio condicionados sometidos a temperatura de LM38-D2 sobre (A) LM38-LP y (B) LM38-HP (* $p < 0,05$, ANOVA de una vía con comparaciones de Dunnett, $n=2$). (C) Cuantificación de la proliferación de células MV-1-Lu por cristal violeta frente a TGF-B1 exógeno (2ng/ml), MD D2 y el tratamiento el inhibidor RTGFB1 (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ ANOVA de una vía con comparaciones de Tukey, $n=3$).

TGF-B1 como factor clave en el diálogo celular

Según bibliografía previa y los resultados anteriormente mostrados, propusimos al TGF-B1 como uno de los factores que podrían estar involucrados en este diálogo¹⁴⁸. La vía del TGF-B activa el proceso de EMT y se encarga de regular el epitelio mamario normal. En las células neoplásicas, la pérdida de su modulación está ligada a la promoción de la angiogénesis, invasión y resistencia a terapias¹⁴⁹. Sobre esta base, nos propusimos entender la implicancia del TGF-B1 en el diálogo entre las poblaciones EPI y MEP. Al analizar los niveles de expresión transcripcional de TGF-B1 en las líneas celulares LM38, LM38-D2 mostró una mayor expresión transcripcional de ARNm de TGF-B1 que LM38-LP (Figura 35 A).

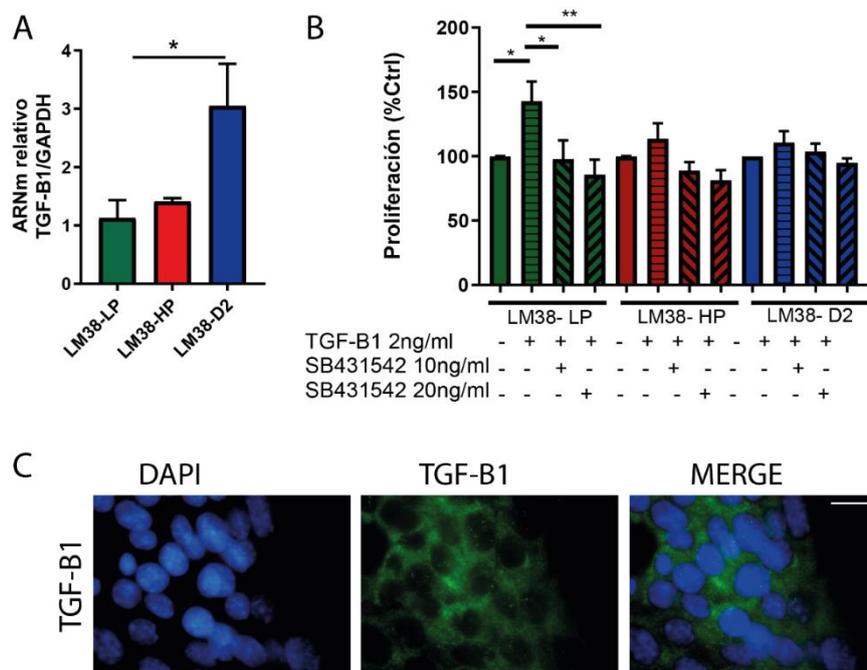


Figura 35.- TGF-B1 en el modelo LM38. (A) Nivel de expresión del TGF-B1 para el en células LM38 por qPCR normalizado frente a GAPDH (**p < 0,01 mediante ANOVA de una vía con comparaciones de Bonferroni frente a LM38-LP, n=4). (B) Proliferación celular de las células tratadas con TGF-B1 (2 ng/ml) y SB431542 (10 ng/ml y 20 ng/ml) durante 48 h, mediante ensayo con violeta de cristal (*p < 0,05, **p < 0,01 mediante ANOVA de dos vías con comparaciones de Bonferroni frente a CRL. Los valores son medias ± SEM, n=4). (C) Inmunofluorescencia contra TGF-B1 en células de LM38-LP. Barra de aumento: 20 µm.

Para continuar profundizando en el rol del TGF-B1 en el diálogo entre las poblaciones que componen el ducto mamario evaluamos *in vitro* la sensibilidad de las líneas a su modulación. Las células LM38 fueron tratadas con un TGF-B1 recombinante (2ng/ml) y un inhibidor de su receptor SB431542 (10 y 20 ng/ml). Pudimos observar que el tratamiento con TGF-B1 aumentó un 40% la viabilidad de LM38-LP en comparación con el control, que se redujo en presencia de SB431542 (Figura 35 B). De manera que a pesar de que LM38-LP no fue la línea que mayor expresión de TGF-B1 tuvo a nivel transcriptómico, si fue la más sensible al agregado exógeno y al inhibidor del TGFBR1.

Para continuar estudiando el rol del TGF-B1 en el diálogo entre las poblaciones celulares y su contribución en la progresión temprana del cáncer de mama, quisimos evaluar si TGF-B1 estaba asociado a alguna de las poblaciones que la componen. En la línea bicelular LM38-LP por inmunofluorescencia no encontramos una expresión marcadamente diferencial a nivel intracelular (Figura 35 C).

La línea LM38-LP mostro ser la más sensible al tratamiento con TGF-B1 y además el tratamiento con el inhibidor de su receptor genero cambios morfológicos en cuanto a la disposición celular característica de esta línea. Las células LM38-LP se caracterizan por formar islotes que según estudios de IHQ previos⁶⁵, la componente EPI central rodeada de la componente MEP positiva para alfa-SMA. Pudimos observar que frente al tratamiento con el inhibidor del TGFBR1 se produjo un aumento del número de islas en comparación con el control (Figura36 A y B). Esto sugiere que la inhibición de la vía del TGF-B estaría favoreciendo que la población de células madre que conforma la línea celular⁶⁸ se diferencie hacia la estirpe EPI, viéndose favorecidas las uniones intercelulares y la formación de islas más compactas, donde la actina se presenta de manera cortical (Figura 36 D).

Sabiendo que la línea LM38-LP mostro ser más sensible al agregado de TGF-B1 exógeno y su inhibidor, quisimos ahondar en el posible dialogo entre las poblaciones celulares de la línea mixta. Mediante un ensayo de proliferación por la técnica de cristal violeta el tratamiento con TGF-B1 y con el medio condicionado de LM38-D2 no afectaron significativamente la viabilidad de la línea LM38-LP, aunque en ambos casos el

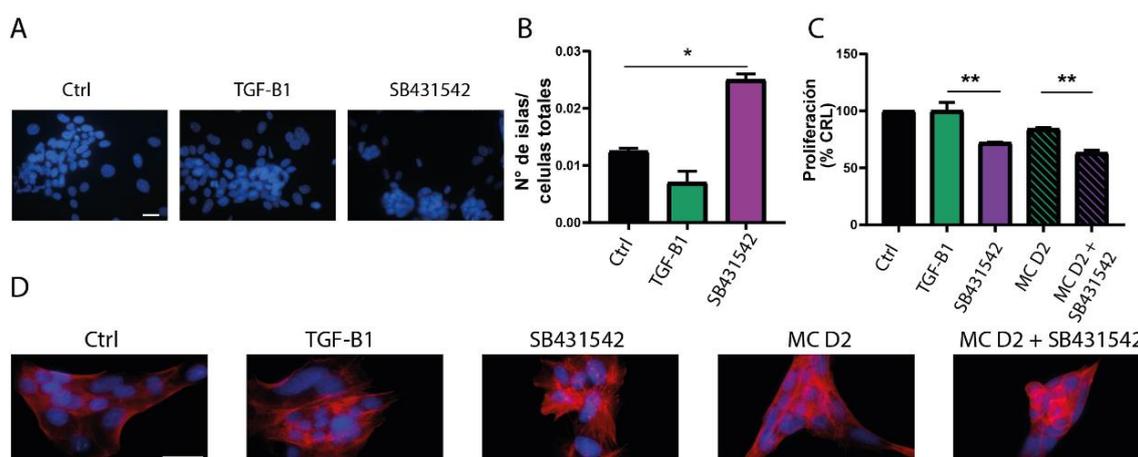


Figura 36.- Efecto de la modulación la vía molecular de TGF-B sobre las poblaciones EPI y MEP. (A) Imágenes representativas células teñidas con DAPI tratadas con TGF-B1 y SB431542. Barra de aumento: 50 μ m. (B) Cuantificación del número de islas en función de las células totales frente al tratamiento de TGF-B1 y su inhibidor (* $p < 0,05$, ANOVA de una vía con Bonferroni comparando contra Ctrl, se muestra 1 de 2 experimentos con la misma tendencia). (C) Proliferación de las células LM38-LP frente al tratamiento de TGF-B1, MC D2 y su combinación con el inhibidor de la vía. (** $p < 0,01$, ANOVA de una vía con comparaciones de Tukey, $n=3$). (D) Imágenes representativas de células LM38-LP teñidas con DAPI y faloidina, donde se puede apreciar cambios en la disposición de la fibra de actina con los distintos tratamientos de TGF-B1, MC D2 y su combinación con el inhibidor de la vía. Barra de aumento: 50 μ m.

tratamiento con SB431542 disminuyó la viabilidad. (Figura 36 C). Estos resultados sugieren que TGF- β 1 tiene un rol clave en el diálogo entre las poblaciones que componen a la línea mixta, que también podrían estar confiriéndole ventajas en el proceso de formación de tumores intraductales y su posterior progresión.

A partir de los cortes previamente generados de tumores *fat pad* de las tres líneas celulares que componen a LM38 se evaluó la expresión de TGF- β 1 por IHQ (Figura 37 A). Dado que la expresión de TGF- β 1 presentó un patrón heterogéneo en los tumores LM38-LP, se evaluó la expresión utilizando el H-Score como parámetro para determinar de manera más fehaciente la marcación. No se observaron cambios significativos en el H-score de los tumores generados a partir de las líneas del modelo LM38-LP (Figura 37 B). Tomando un corte de positividad de 60 de *H-score* de TGF- β 1, se comparó tumores positivos y negativos, donde se observó una mayor proporción de tumores positivos para LM38-D2 que en los tumores LM38-LP, al igual de lo observado *in vitro* en las líneas celulares a nivel transcriptómico (Figura 37 C).

En los cortes obtenidos del modelo intraductal de LM38-LP, se observó de manera cualitativa que TGF- β 1 tuvo una expresión mayor en el estadio invasor que en el estadio *in situ* y en este último se observó principalmente asociado al frente invasor (Figura 37 D).

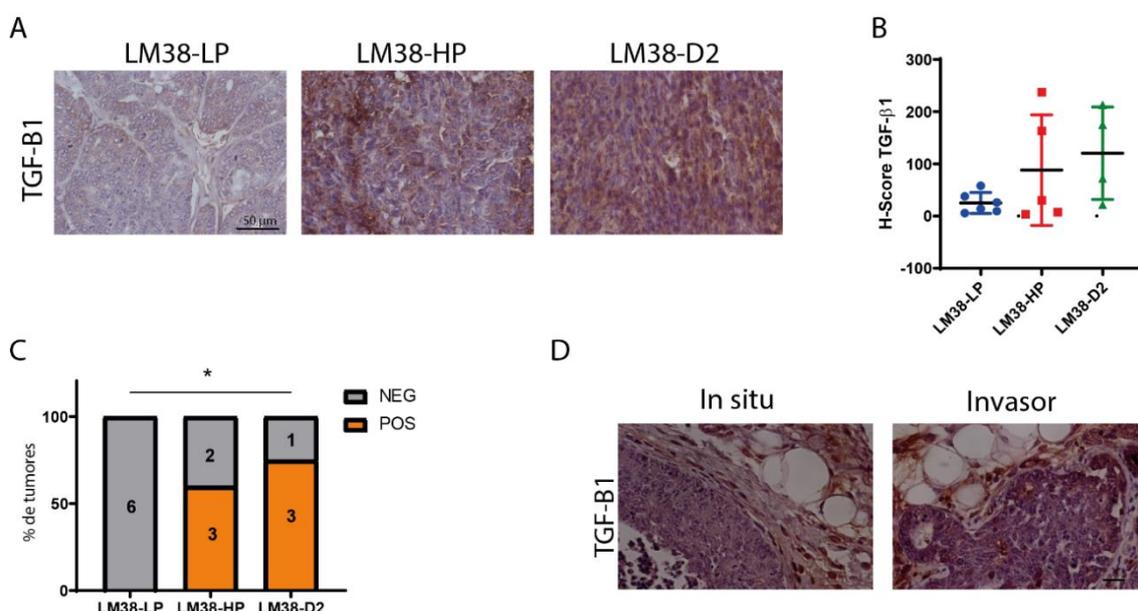


Figura 37.- Efecto de la modulación de TGF-B en la progresión tumoral del cáncer de mama.

(A) IHQ de TGF-B1 en cortes parafinados de tumores *fat pad*. Barra de aumento=50 μ m (B) H-Score de la expresión de TGF-B1 (ns, Prueba de Kruskal Wallis). (C) Porcentaje de tumores sin expresión de TGF-B1 (NEG) o positivos (POS) según un valor de corte de 60 de H -score. Se observó una mayor proporción de tumores LM38-D2 positivos en comparación con los tumores LM38-LP ($p=0,03$, prueba exacta de Fisher, unilateral). (D) IHQ de TGF-B en cortes parafinados de tumores intraductales en estadio in situ e invasor de LM38-LP. Barra de aumento: 20 μ m.

Conclusiones parciales capítulo 2a

En conclusión, se obtuvo un buen modelo murino que simula la progresión tumoral temprana donde fue posible obtener tumores intraductales que progresaron espontáneamente al estadio invasor, caracterizado por la disrupción de la membrana basal y el aumento de infiltrado inmune. Sumado a esto, el hecho de que solo LM38-LP pudo formar tumores sugiere que el diálogo entre las poblaciones que la conforman le confiere una ventaja para el desarrollo tumoral intraductal. Además, la línea celular LM38-LP presentó una mayor capacidad de supervivencia, una mayor actividad invasiva y migratoria, por lo que estos mecanismos podrían ser utilizados por las células para adaptarse al ducto mamario y favorecer la formación y progresión tumoral.

A partir de lo observado en los medios condicionados surgió TGF-B1 como un posible factor involucrado en el diálogo entre poblaciones. TGF-B1 mostro estar más expresado en la línea MEP LM38-D2, aunque la línea bicelular LM38-LP fue la más sensible a la activación e inactivación de la vía y se vio afectada morfológicamente en cuanto a la modulación de la vía de TGF-B. En la línea bicelular no se observó una asociación clara de la expresión de TGF-B1 a alguna de las poblaciones. TGF-B1 podría ser entonces uno de los factores que contribuyen al diálogo EPI-MEP y podría estar implicado en la transición DCIS-IDC.

De esta manera se obtuvo un buen modelo intraductal singénico capaz de imitar la patología humana y que podrá utilizarse para estudiar factores claves en la transición *in situ*- invasor. A su vez el diálogo entre las poblaciones EPI y MEP sería clave para la capacidad de formar tumores intraductales, contexto en el cual TGF-B1 podría ser relevante.



Capítulo 2b



Utilización del modelo intraductal como herramienta para el estudio de SPARC como actor clave en la progresión temprana en cáncer de mama

El carcinoma ductal *in situ* se lo define como una proliferación de células neoplásicas confinadas dentro del ducto mamario. Conforme la enfermedad avanza se produce la ruptura de la membrana basal y el escape de las células neoplásicas hacia el estroma que rodea al tumor, lo que se conoce como estadio invasor. Existen distintas teorías que sugieren que los tumores ductales *in situ* podrían ser precursores de los tumores invasores, pero aún no existen biomarcadores que determinen cuáles de estos tumores progresarán al estadio invasor y cuales se mantendrán como tumores *in situ*. Surge entonces la importancia de indagar posibles biomarcadores de progresión temprana, que nos permitan disminuir el sobre tratamiento de esta patología.

MT1-MMP es una metaloproteasa de membrana que está involucrada en procesos claves en la reorganización de la matriz extracelular durante procesos tanto fisiológicos como patológicos. Con el objetivo de estudiar el proceso de progresión tumoral de la patología mamaria en sus estadios tempranos, en trabajos previos se desarrolló un modelo xenogénico que simula fehacientemente los estadios tempranos de la patología mamaria. En este modelo se inocularon células humanas de cáncer de mamá triple negativo MCF10DCIS.com directamente en el ducto de la glándula mamaria de ratones inmuno suprimidos SCID. Luego de 5 semanas, se obtuvieron tumores *in situ* (confinados dentro del ducto galactóforo) que progresaron espontáneamente hacia el estadio invasor luego de 10 semanas post inoculación^{57,94}. En el estadio invasor se observó un incremento significativo de la enzima MT1-MMP asociada al frente de invasión junto con p63, al igual que un incremento del tejido desmoplásico. Se determino entonces que MT1-MMP se encuentra regulada por el factor de transcripción p63 y que su modulación es inducida por contacto con componentes de la matriz, como el colágeno de tipo I. Surgiendo así MT1-MMP y p63 como actores clave en la progresión temprana del cáncer de mamá. Sumado a ello los tumores inoculados con shMT1-MMP no progresaron a invasores como si lo hacen los controles.

A partir de este modelo se buscó identificar nuevos biomarcadores de los estadios tempranos de la enfermedad que pudieran tener un rol clave en el proceso de progresión.

Selección de los genes candidatos

En primera instancia se buscó determinar posibles genes diferencialmente expresados en el modelo intraductal xenogénico, basándose en la expresión diferencial de MT1-MMP y su asociación a la progresión. A partir de los tumores invasores obtenidos luego de 10 semanas de inoculación intraductal se procedió a la separación celular por citometría de flujo utilizando CD34 como marcador de células humanas. A partir de la población humana CD34+ se aislaron las células según la expresión alta y baja de MT1-MMP. Luego de la extracción de ARNm se realizó un *RNAseq* de ambas poblaciones y se analizaron los datos utilizando herramientas bioinformáticas.

Al comparar el transcriptoma de ambas poblaciones se obtuvieron 46 genes regulados positivamente en la población MT1-MMP^{Alto} comparado con MT1-MMP^{Bajo} y 1 gen regulado de manera negativa (ZEB2). Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de los genes que presentaban un aumento en la expresión génica, observándose que los mismos se encontraban principalmente implicados en procesos relacionados a la adhesión celular y reorganización de la matriz extracelular (Figura 38 A).

Posteriormente en colaboración con el Dr. Martin Abba y el Dr. Ezequiel Lacunza del CINIBA de UNLP, se procedió a realizar un análisis bioinformático teniendo en cuenta un set de datos de una colección de tumores DCIS de alto grado previamente descrito por el grupo colaborador¹⁰¹. Abba y colaboradores obtuvieron los perfiles transcriptómicos de los tumores, los cuales permitieron clasificarlos según distintas características intrínsecas, como el subtipo molecular, la capacidad proliferativa, la respuesta del sistema inmune y vías moleculares activadas. Se identificaron entonces los grupos DCIS C1 y DCIS C2, dónde C1 estaba asociado a peor pronóstico: mayor tasa de proliferación, fenotipo basal y perfil inmunosupresor. Se cruzaron la lista de genes diferencialmente expresados entre los grupos DCIS C1 y DCIS C2 junto con los genes regulados positivamente en la población MT1-MMP^{Alto} aislada de los tumores invasores

del modelo xenogénico. Se obtuvieron 3 genes en común entre la población MT1-MMP^{Alto} y la población DCIS-C1, ambas asociadas con un fenotipo más agresivo de la enfermedad. Estos genes fueron: SPARC (*Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich*) conocida también como osteonectina, COX2 (*Cyclooxygenase-2*) que codifica para la prostaglandina sintetasa 2 y el accesorio del canal de cloro tipo 2, CLCA2 (*Chloride Channel Accessory 2*) (Figura 38 B).

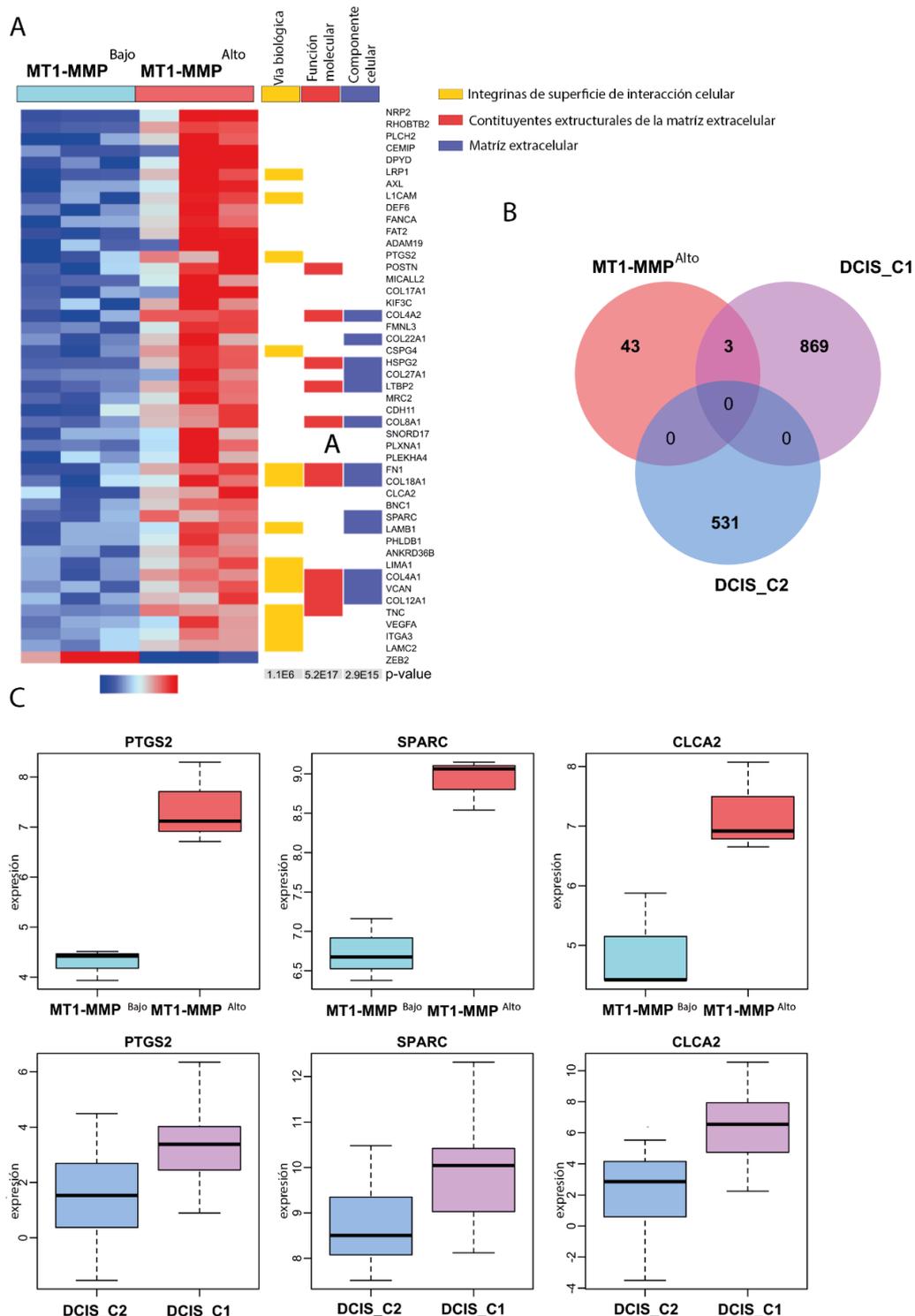


Figura 38.- Análisis del transcriptoma de las subpoblaciones MT1-MMP obtenidas tras la inoculación intraductal de células MFC10DCIS.com. (A) Mapa de calor que muestra los 47 genes expresados diferencialmente entre las células MT1-MMP^{Bajo} vs MT1-MMP^{Alto}. (B) Diagrama de Venn de la lista de genes expresados diferencialmente entre los subgrupos DCIS-C1 y -C2 (Abba, 2015) con los genes regulados al alza en la subpoblación MT1-MMP altas. Se encontraron 3 genes en común con los regulados al alza en DCIS-C1, mientras que no se encontró ninguno en el grupo DCIS-C2. (C) Diagramas de cajas y bigotes que muestran la expresión de genes diana en los grupos MFC10DCIS.com y DCIS_C2 frente a C1. Panel superior: PTGS2: p-value = 0.01965; SPARC: p-value = 0.0255; CLCA2: p-value = 0.001893 comparando MT1-MMP^{Alto} versus MT1-MMP^{Bajo}. Panel inferior: PTGS2: p-value = 0.01389; SPARC: p-value = 0.002101; CLCA2: p-value = 0.02451.

Se analizó la expresión de los genes candidatos entre los subgrupos tanto del modelo xenogénico como de la cohorte de tumores DCIS de alto grado, que mostraron un mismo patrón de expresión. La alta expresión de estos genes se identificó tanto en la población MT1-MMP^{Alto} derivada del modelo murino, comparada con la población MT1-MMP^{Bajo} como en el subgrupo de pacientes de peor pronóstico DCIS C1, comparado con DCIS C2, de manera tal que en ambos casos su sobreexpresión estuvo asociada a fenotipos más agresivos de la enfermedad (Figura 38 C). Situando a SPARC, COX2 y CLCA2 como prometedores biomarcadores de progresión temprana en cáncer de mama.

SPARC en muestras de pacientes

Para comenzar con la validación de los genes candidatos, se procedió a analizar si existía asociación de estos genes con MT1-MMP utilizando el repositorio de datos *TCGA PanCancer Atlas*¹³⁸. En un set de datos de cáncer de mama se pudo observar que el par de genes con mejor correlación positiva fue SPARC y MT1-MMP, lo que nos dio el puntapié inicial para comenzar el estudio de SPARC en el contexto de la enfermedad temprana (Figura 39).

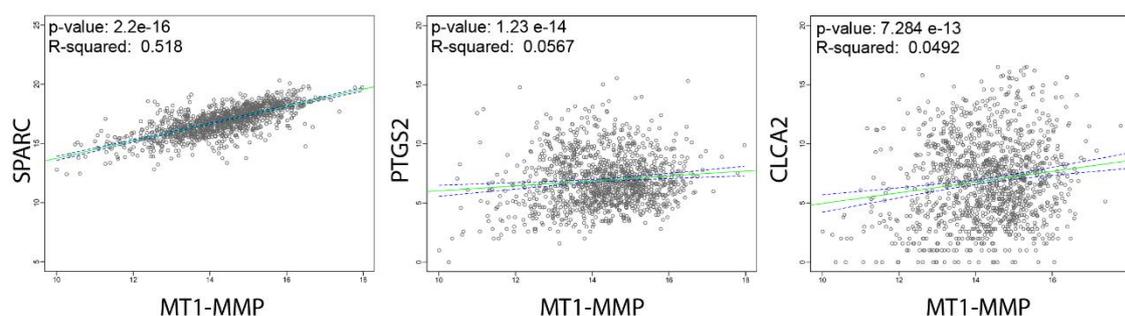


Figura 39.- Análisis de correlación. Correlación de expresión entre los genes candidatos (SPARC, PTG2 y CLCA2) y MT1-MMP obtenidas a partir de la base de datos pública TCGA.

A partir de estos resultados decidimos comenzar el estudio de SPARC en muestras de pacientes como posible gen involucrado en la progresión temprana del cáncer de mama. Se realizó IHQ convencional contra SPARC en cortes de parafina de tumores en tres cohortes de pacientes. La primera consto de 34 pacientes del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”, donde la característica de inclusión fue que tuvieran tumores *in situ* (Cohorte I). En este caso las pacientes en general presentaban tratamiento previo. La segunda cohorte de pacientes, denominada Cohorte PICBIM-Instituto Curie de Francia (Cohorte II), compuesta por muestras de pacientes que se encontraban vírgenes de tratamiento. En ambos conjuntos de muestras, se priorizaron casos que presentaban en la misma muestra componente normal, DCIS y tumor invasor.

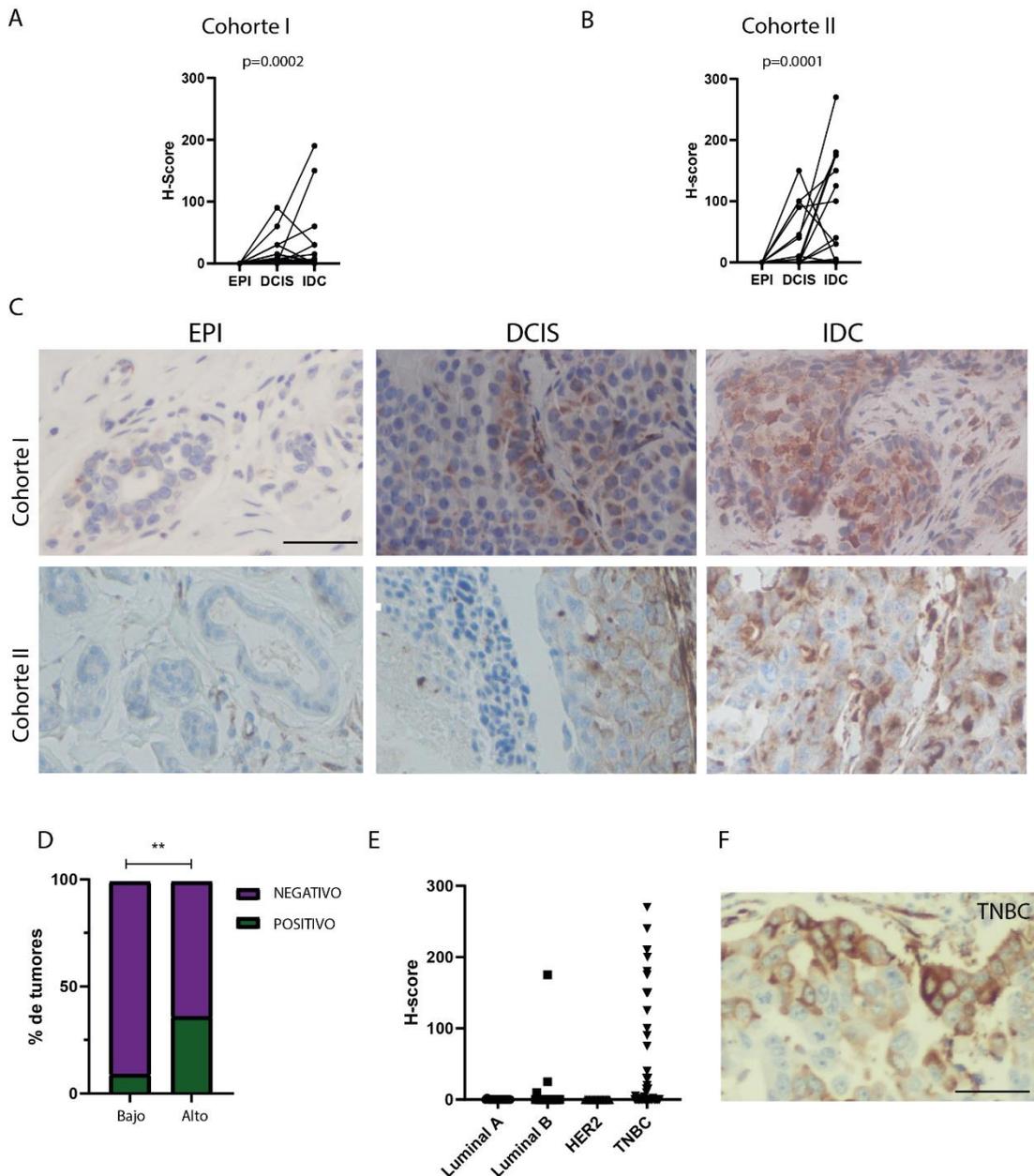


Figura 40.- Análisis de la expresión de SPARC en muestras humanas de cáncer de mama en estadios tempranos. (A) H-Score para SPARC en casos pareados de la cohorte Roffo analizando tejido EPI, DCIS e IDC ($p=0.0002$, Prueba de Friedman). (B) H-Score para SPARC en casos pareados de la cohorte PICBIM analizando tejido EPI, DCIS e IDC ($p=0.0001$, Prueba de Friedman). (C) Imágenes representativas de las distintas componentes analizadas en las dos cohortes de estudio. Barra de aumento: 50 μm . (D) Expresión SPARC de las células neoplásicas según el grado histológico (prueba Chi-cuadrado, X2 $p=0.016$). (E) Cuantificación de casos infiltrantes clasificados según subtipo molecular. (F) Imagen representativa de TNBC IDC. Barra de aumento: 50 μm .

También contamos con una tercera cohorte de Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” de pacientes con tumores de mama infiltrantes y metástasis en ganglios linfáticos (Cohorte III). Todas las muestras fueron analizadas por dos profesionales independientes.

En la cohorte I, con un total de 34 muestras pareadas donde se encontraba la componente DCIS y la invasora al mismo tiempo, se pudo observar en el tejido adyacente no tumoral que la marcación para SPARC fue positiva en las células mioepiteliales, fibroblastos y células endoteliales. Por su parte, el epitelio normal no expreso SPARC, en contraste con el tejido tumoral que resultó ser positivo para dicha proteína. En aquellas células tumorales positivas para SPARC la marcación intracelular fue citoplasmática granular. Por su parte, en las áreas neoplásicas el patrón de expresión de SPARC fue heterogéneo, de manera tal que resultó pertinente utilizar el H-Score como parámetro para cuantificar la expresión. Este parámetro se lo define como el producto entre el porcentaje de células positivas y la intensidad de la marca. La expresión de SPARC fue significativamente mayor en las células neoplásicas del DCIS al comparar con el tejido no tumoral adyacente al tumor, y aún mayor en aquellos tumores IDC (Figura 40 A y C Cohorte Roffo).

Se obtuvieron resultados similares en la cohorte PICBIM con un total de 55 pacientes, donde también se observó una marcación citoplasmática granular con un patrón de expresión heterogéneo, que aumento conforme progresaba la enfermedad (Figura 40 B). Por otro lado, al subdividir los tumores invasores de esta cohorte según su grado histológico, hubo una mayor proporción de tumores positivos para SPARC asociados a un alto grado histológico (grado III) comparado con bajo grado (grado I y II) (Figura 40 D). A su vez en esta cohorte se analizó la expresión de SPARC en los tumores

invasores en función de los subtipos moleculares y se observó un mayor número de tumores positivos para SPARC en los tumores triple negativos (Figura 40 E y F).

Por último, en la cohorte III de pacientes con metástasis se analizó la expresión de SPARC en secciones de parafina de los tumores invasores y los ganglios linfáticos axilares (N=57). Dichas muestras presentaron: tejidos histológicamente normales adyacentes a los tumores (n=25), tumores invasivos (n=55) y ganglios linfáticos con metástasis (n=19). Pudimos observar que tanto la proporción como el H-Score de la marcación de SPARC aumenta en los tumores invasores y posteriormente se pierde en el tejido metástasis ganglionar (Figura 41). De manera tal que, SPARC estaría involucrado en el proceso de progresión temprana pero luego su expresión se perdería en el proceso metastásico, al menos a nivel de los nódulos de linfáticos.

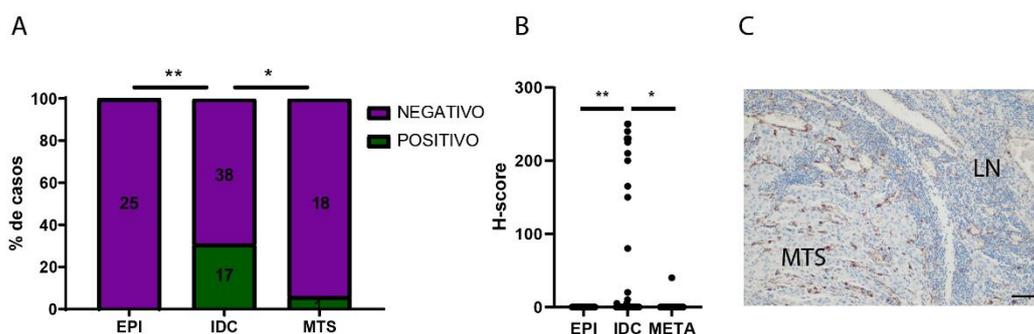


Figura 41.- Análisis de la expresión de SPARC en una cohorte de pacientes metastásicos. (A) Proporción de casos positivos para SPARC de tejido EPI, IDC y MTS (Chi-cuadrado, $p < 0.0001$). (B) H-Score para SPARC analizando tejido EPI, IDC y MTS (prueba de Kruskal Wallis, EPI vs IDC; $p = 0.0031$, IDC vs Metastasis; $p = 0.0450$). (C) Imagen representativa de la marcación en la metástasis donde se puede apreciar tanto la metástasis (MTS) con el ganglio linfático (LN) con ausencia de marcación. Barra de aumento = $100\mu\text{m}$.

Estos resultados apoyan el hecho de que SPARC tendría un rol clave en progresión temprana del cáncer de mamá, dado que aumenta su nivel de expresión en el estadio *in situ* al compararlo con la célula epitelial no tumoral, el mismo aumenta aún más en una proporción considerable de tumores invasores y luego su sobreexpresión se pierde en la metástasis, por lo menos a nivel de los ganglios linfáticos. A su vez estos resultados sitúan también a SPARC como un posible marcador de mal pronóstico asociado a casos más agresivos, como son aquellos con alto grado y de subtipo triple negativo.

Evaluación del rol funcional de SPARC en los procesos de invasión

Para continuar con el estudio de SPARC como posible candidato de progresión temprana, se utilizó el modelo intraductal singénico e inmunocompetente con la línea celular LM38-LP, cuya caracterización se abarcó en el capítulo 2a.

Se procedió a analizar *in vitro* la expresión de SPARC. Se pudo observar por inmunofluorescencia que la línea LM38-LP fue positiva para SPARC con un patrón de expresión granular perinuclear similar a lo observado en las muestras de pacientes. A su vez se observó una marca positiva para MT1-MMP con una localización lisosomal (Figura 42 A). Observamos el mismo patrón de expresión en la línea humana MCF10DCIS.com.

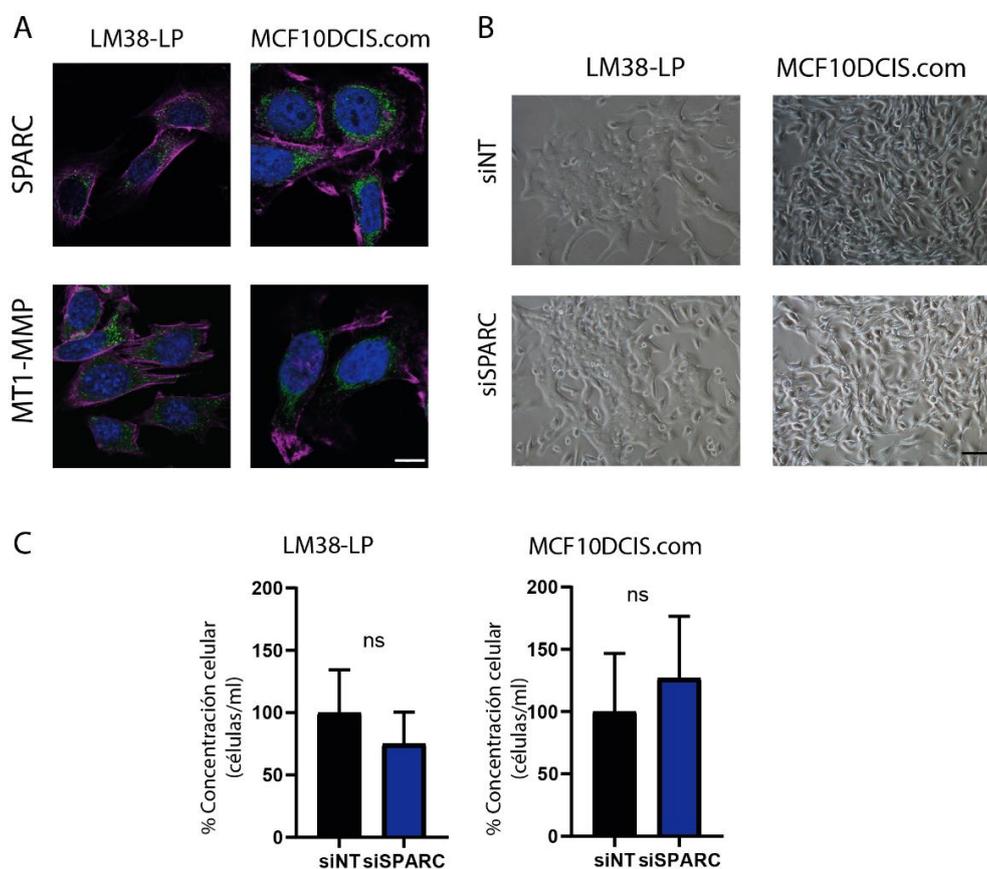


Figura 42.- Silenciamiento de SPARC en las líneas LM38-LP y MCF10DCIS.com. (A) Inmunofluorescencia de SPARC (verde) y MT1-MMP (verde) en las líneas LM38-LP y MCF10DCIS.com. DAPI: azul y faloidina: fucsia Barra de aumento :10µm. (B) Figuras representativas en microscopio de luz clara con contraste de fase para ilustrar la morfología frente al silenciamiento de SPARC. Barra de aumento: 50 µm. (C) Ensayo de viabilidad de las líneas frente al silenciamiento determinado por conteo directo.

Quisimos estudiar entonces los distintos procesos tumorales en los cuales SPARC puede tener un rol clave y favorecer las etapas tempranas de progresión, como son la proliferación, invasión y migración. Para ello silenciamos la expresión de SPARC tanto en la línea murina LM38-LP como la línea humana MCF10DCIS.com de manera transitoria, utilizando siARN específicos de especie. El silenciamiento de SPARC no generó cambios significativos a nivel de la morfología celular ni tampoco a nivel de la capacidad proliferativa en ninguna de las dos líneas celulares (Figura 42 B y C).

Al analizar la expresión de SPARC y MT1-MMP a nivel proteico por inmunofluorescencia y a nivel del ARN mensajero por qPCR, se observó que la expresión de SPARC descendió en un 50% y este descenso se vio interesantemente aparejado a una bajada de la expresión de MT1-MMP (Figura 43 A y C). Resultados similares se

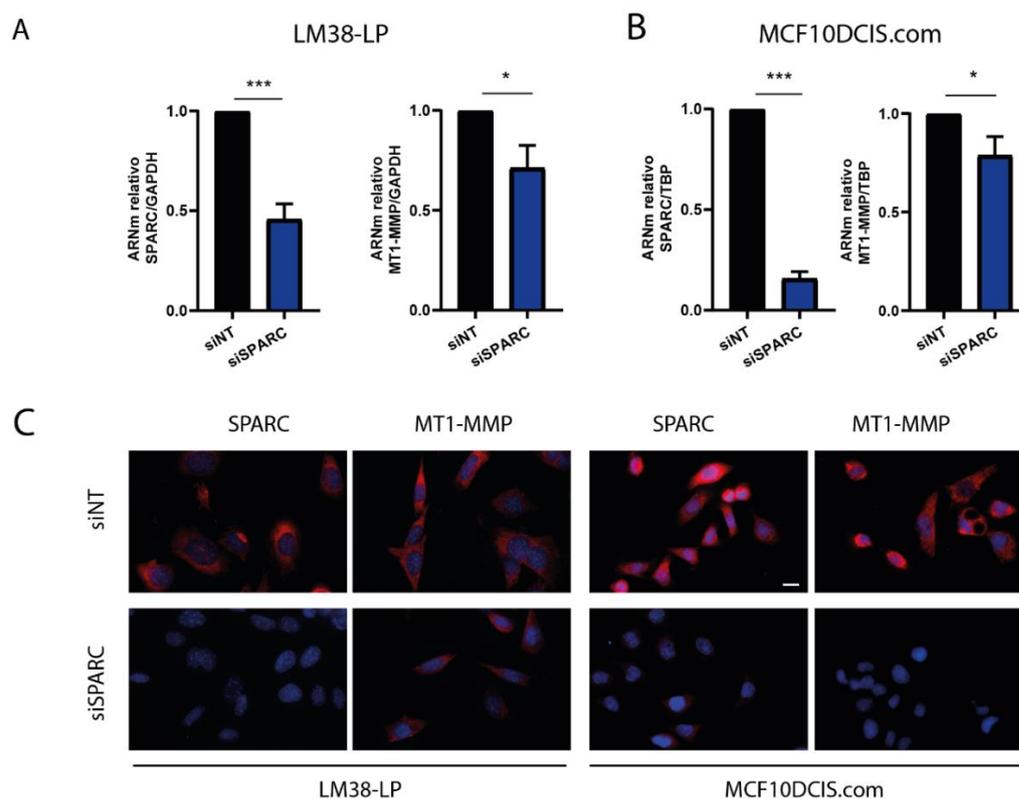


Figura 43.- Asociación a nivel transcripcional de SPARC y MT1-MMP. (A) Expresión de SPARC y MT1-MMP en la línea celular LM38-LP tras silenciar transitoriamente la expresión de SPARC. Valores correspondientes a las medias \pm SEM, $n = 3$ experimentos independientes de cantidades relativas de ARNm normalizadas frente a GAPDH y relativizadas a su LCR. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ mediante la prueba t de una cola. (B) Expresión de SPARC y MT1-MMP en MCF10DCIS.com tras silenciar transitoriamente SPARC. Valores correspondientes a las medias \pm SEM, $n = 2$ experimentos independientes de cantidades relativas de ARNm normalizadas frente a GAPDH y relativizadas a su LCR (prueba T, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$). (C) Imágenes representativas que muestran la marcación de SPARC y MT1-MMP frente al silenciamiento de SPARC en ambas líneas. Barra de aumento: $10\mu\text{m}$.

observaron luego del silenciamiento de la línea MCF10DCIS.com por ambas técnicas de detección (Figura 43 B y C). Este resultado valida el hecho de que la expresión de SPARC y MT1-MMP estarían asociadas y que en primera medida SPARC estaría regulando la expresión de MT1-MMP.

Para estudiar funcionalmente el rol de SPARC y MT1-MMP, se realizó un ensayo de degradación de la gelatina. Al analizar la funcionalidad de MT1-MMP, se observó que al disminuir la expresión de SPARC disminuyó así también la capacidad de degradación de las células comparado contra el control (Figura 44). Estos resultados estarían sugiriendo que SPARC estaría favoreciendo la capacidad invasiva de las células tumorales a través de MT1-MMP.

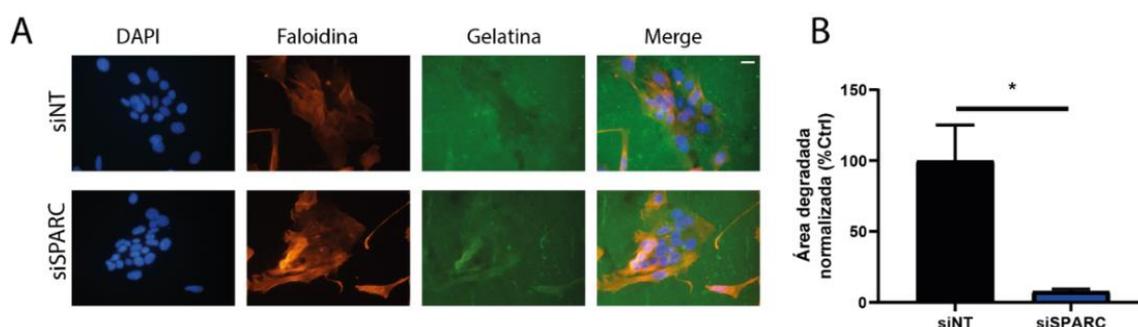


Figura 44.- Evaluación del silenciamiento de SPARC sobre la capacidad de degradación focal de la línea LM38-LP. (A) Imágenes representativas de células en gelatina. Azul: DAPI, Verde: Gelatina, Rojo: Faloidina. Barra de aumento: 10 μ m. (B) Cuantificación de la degradación de gelatina fluorescente por células totales en células LM38-LP silenciadas o no silenciadas para SPARC. Se muestra la cuantificación de 1 ensayo (n=2). *p<0,05 mediante la prueba t de una cola.

SPARC y la vía molecular de TGF-B como actores claves en el proceso de progresión tumoral

Con el objetivo indagar en el mecanismo de acción de SPARC en nuestro modelo, utilizamos la plataforma bioinformática STRING para evidenciar la existencia de asociaciones proteicas que puedan explicar como SPARC y MT1-MMP están actuando en el proceso de progresión. Para ello, a partir de un set de datos de cáncer de mama del TCGA, se evaluó la co expresión de genes con cada uno de los 4 genes candidatos obtenidos en nuestro análisis transcriptómico (SPARC, COX-2, CLCA2 y MT1) en seis grupos de muestras: tejido normal adyacente (NAT, n=103) y subtipos tumorales Luminal A (LumA, n=473), Luminal B (LumB, n=205), Her2 (n=86), Normal-like (NL, n=73)

y Basal (n=185). De esta comparación surgieron 3 genes en común: MYLK, EGFR, y ADAMTS9 (Figura 45 A).

Se obtuvo además una lista de genes co expresaron significativamente con cada uno de ellos en los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama. Al compararse estas listas obtenidas, SPARC y MMP14 (MT1-MMP) mostraron la mayor proporción de genes en común: COL6A2, AEBP1, COL5A1, MMP2, BMP1, COL1A2, COL6A1, COL1A2, PCOLCE, COL3A1, ST3GAL2, SYDE1 y GPR124 (Figura 45 B). Se evaluó entonces la asociación entre los 3 genes comunes a los 4 genes, más los 13 genes comunes a (MT1-MMP) MMP14 y SPARC, más los 4 genes candidatos en la plataforma STRING. Luego del análisis se observó que el 80% de estos genes presentaban una fuerte asociación. La red mostró dos *clusters* definidos relacionados con genes implicados en la organización del colágeno, la degradación de la matriz y la vía molecular de TGF-B1 (Figura 45 C).

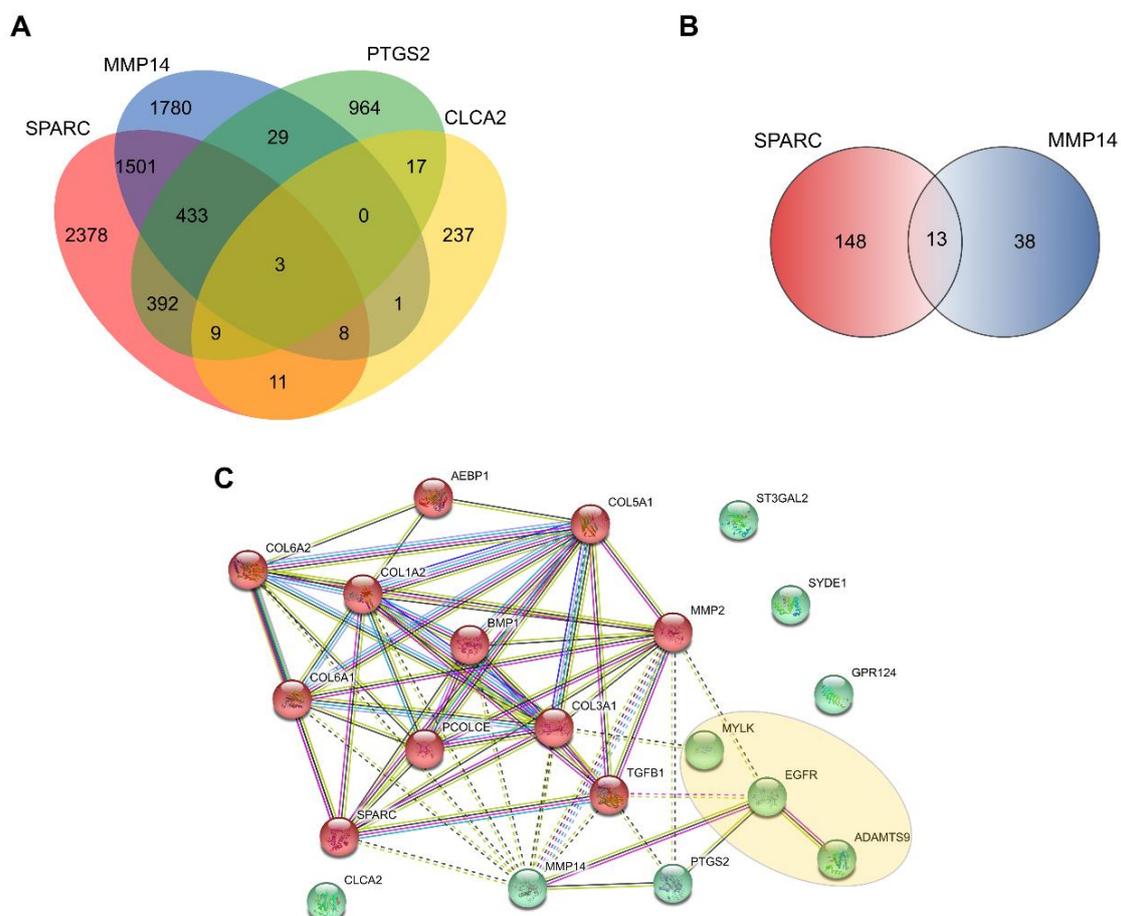


Figura 45.- Análisis de asociación de genes para identificar mediadores del efecto pro invasivo de SPARC. (A) Diagrama de Euler que representa el número de genes co expresados con cada uno de los 4 genes y la superposición entre ellos. (B) Número de genes co expresados por SPARC y MMP14 en los 6 grupos de muestras considerados. (C) Representación en red de las relaciones entre los 20 genes seleccionados.

Para continuar corroborando bioinformáticamente la relación entre estos genes y su rol asociado a la progresión, se analizó en un set de datos de líneas celulares de cáncer de mama GSE48213¹³⁹, según su clasificación molecular se diferenciaron en luminales y basales. Se pudo observar que la expresión de MT1-MMP, SPARC y TGF-β1 fue significativamente mayor en aquellas líneas de tipo basal, asociados a un fenotipo más agresivo de la enfermedad (Figura 46). Este resultado les da sustento a nuestros resultados en muestras de pacientes, donde también se los asocia a los tumores triple negativos.

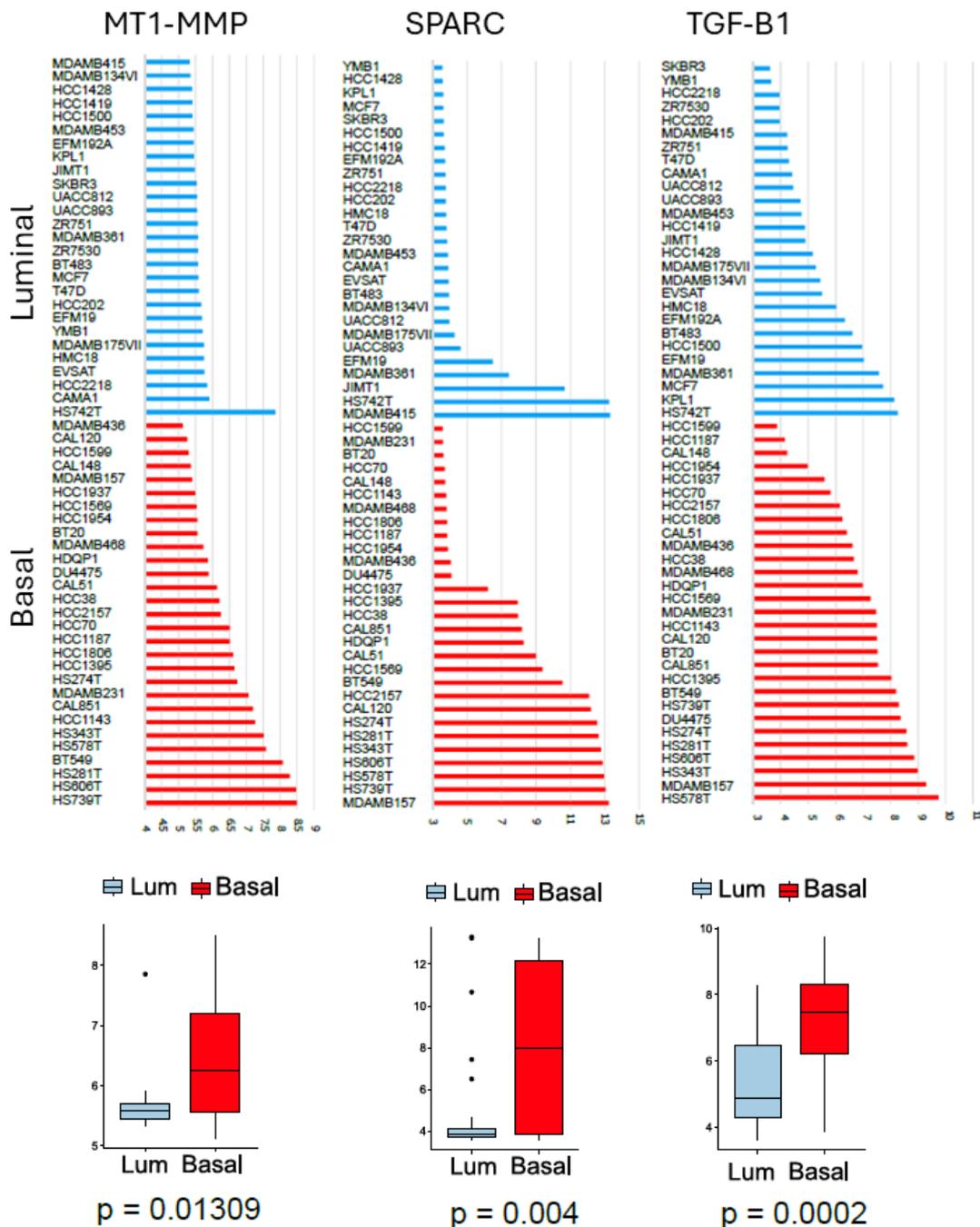


Figura 46.- Expresión de MT1-MMP, SPARC y TGF-B1 en líneas celulares. Análisis de la expresión de MT1-MMP, SPARC y TGF-B1 a partir de datos de líneas celulares de cáncer de mama de bases de datos públicas.

De acuerdo con estos resultados bioinformáticos, quisimos evaluar la implicancia de la vía molecular TGF-B1 en la progresión tumoral dependiente de SPARC y MT1-MMP. Además, como se mencionó en el capítulo 2a en el modelo murino se demostró la importancia del TGF-B1 en la cooperación y progresión tumoral. El tratamiento con TGF-B1 aumento en un 40% la viabilidad de las LM38-LP en comparación con el control, viabilidad que se redujo en presencia del inhibidor del TGFBR1, solo en la línea LM38-LP (Figura 35 B). Dado que el modelo murino LM38-LP fue en línea con las observaciones derivadas de análisis *in silico* en cáncer de mama, resulta altamente útil para evaluar las interacciones entre vía molecular de TGF-B y SPARC en la progresión temprana del cáncer de mama.

Se estudió el efecto de la inhibición del TGFBR1 sobre la expresión de SPARC y MT1-MMP. Por *western blot* se evaluó la fosforilación de SMAD 2/3, una de las principales SMAD que se fosforila frente a la activación de la vía canónica de TGF-B¹²⁷. Al silenciar SPARC en la línea LM38-LP se observó una disminución en el nivel de fosforilación de SMAD 2/3 en comparación con el control (Figura 47 A). Estos resultados sugieren que la sobreestimulación de la vía canónica de TGF-B está mediada al menos en parte por SPARC.

Por su parte, estudiamos si la activación del receptor podría darse por la interacción directa con SPARC, para ello se trataron a las células LM38-LP con rTGF-B1 y rSPARC. Se observó que el tratamiento con rTGF-B1 exógeno produjo un aumento en la fosforilación de SMAD 2/3, como era de esperarse, pero el tratamiento con rSPARC no produjo el mismo efecto ni solo ni en combinación, lo que podría inferir que la vía está saturada en cuanto al SPARC exógeno como posible activador de la misma (Figura 47 B).

Notablemente, se observó que la inhibición del TGFBR1 condujo a una bajada en la expresión de SPARC en conjunto con una baja en la expresión de MT1-MMP a nivel proteico por Western blot y de ARNm mediante qPCR, mientras que no se observó un efecto significativo frente al tratamiento con TGF-B exógeno (Figura 47 B y C). Pudimos observar dicha bajada en la expresión transcripcional también en la línea humana MCF10DCIS.com (Figura 47 D). Estos resultados sugieren que una hiperactivación del TGFBR1 conduce a una expresión aumentada y sostenida de SPARC y en consecuencia de MT1-MMP.

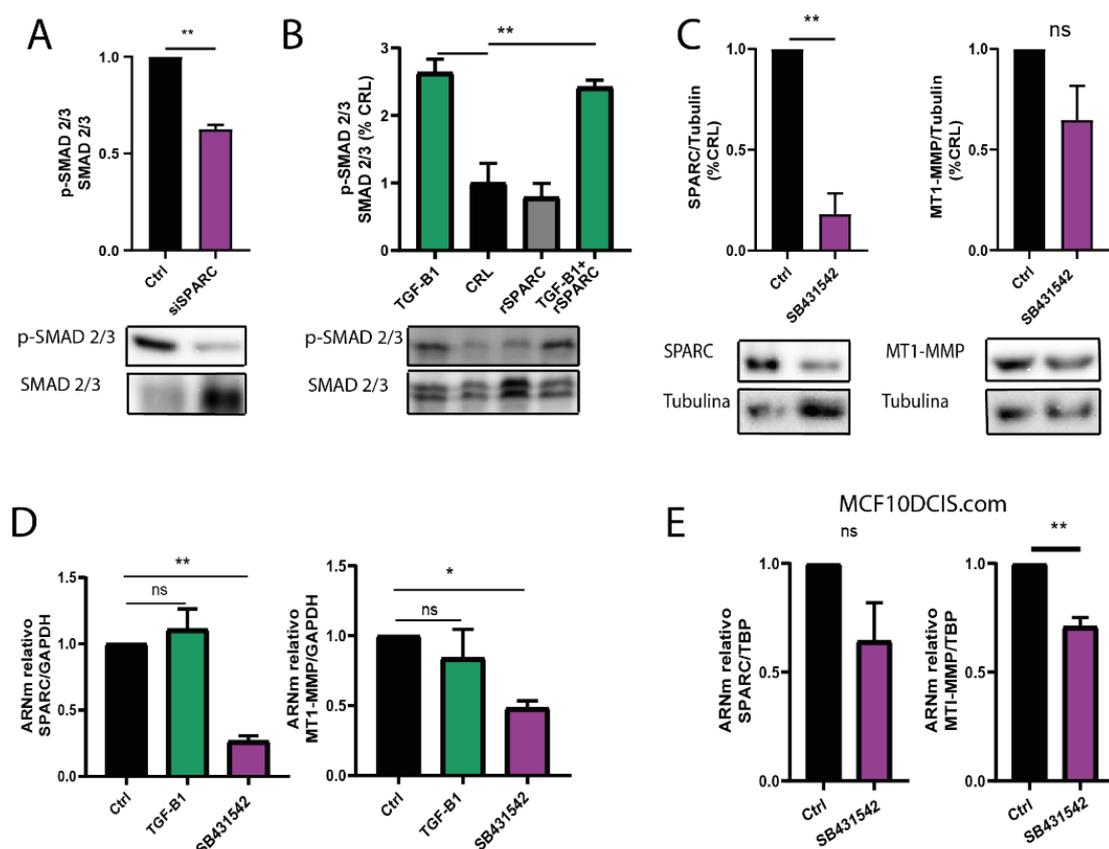


Figura 47.- Rol de la vía molecular TGF-B1 en el proceso protumoral de SPARC. (A) Se determinó la fosforilación de SMAD 2/3 en células LM38-LP transitoriamente silenciadas para SPARC mediante Western Blot. Imágenes representativas y cuantificación (prueba t no apareada, de dos colas, $**p=0,0033$). (B) Evaluación de la fosforilación de SMAD 2/3 en células LM38-LP mediante Western Blot en células tratadas con rTGF-B1 (2ng/ml) y rSPARC (1 μ g/ml) durante 30 min. Imágenes representativas y cuantificación (prueba t no apareada, de dos colas, $**p=0,0033$). (C) Niveles proteicos SPARC y MT1-MMP en células LM38-LP tras el tratamiento con SB431542 (20ng/ml). Valores correspondientes a las medias \pm SEM, n = 3. (prueba t, $**p<0,001$). (D) Expresión de SPARC y MT1-MMP en células LM38-LP tras el tratamiento con TGF-B1(2ng/ml) y SB431542 (20ng/ml). Valores correspondientes a medias \pm SEM, n = 3 experimentos independientes de cantidades relativas de ARNm normalizadas frente a GAPDH y relativizadas a su Ctrl (ANOVA de una vía, $***p<0,0001$). (E) Expresión de SPARC y MT1-MMP en células MCF10DCIS.com tras el tratamiento con SB431542 (20ng/ml). Valores correspondientes a medias \pm SEM, n = 3 experimentos independientes de cantidades relativas de ARNm normalizadas frente a TBP y relativizadas a su Ctrl (prueba t, $**p<0,001$).

Efecto de la inhibición del TGFBR1 a la migración e invasión

Sabiendo entonces que MT1-MMP estaría mediando el rol pro invasivo de SPARC vía TGF-B1, se buscó analizar el impacto de la vía del TGF-B1 y SPARC en los procesos de invasión y la migración que son críticos en la progresión tumoral temprana. Se evaluó la funcionalidad de la metaloproteasa de membrana, entre ellas MT1-MMP frente al tratamiento con inhibidores específicos de TGFBR1 como son el SB431542 y Galunisertib¹⁵⁰. Este último inhibidor, está aprobado por FDA y está siendo utilizado en ensayos clínicos de manera tal que es posible trasladarlo a la clínica de una manera más sencilla.

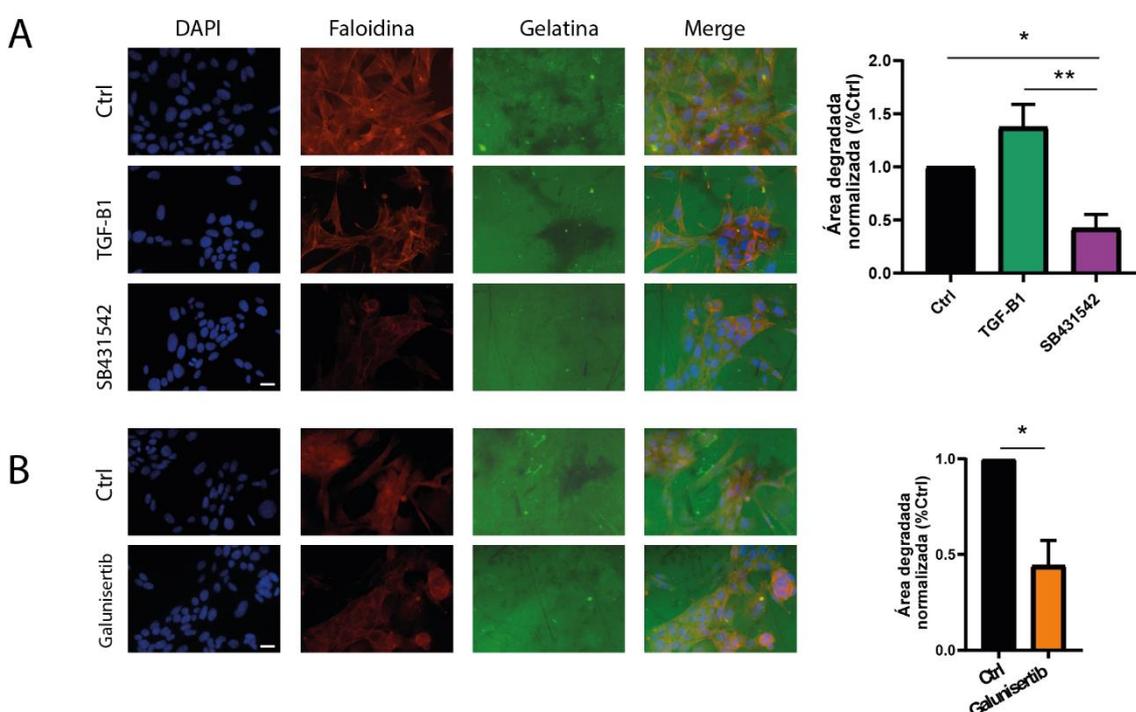


Figura 48.- Efecto de la inhibición del receptor 1 de la vía de TGF-B sobre la invasión. (A) Imágenes representativas de células en gelatina. Azul: DAPI, Verde: Gelatina, Rojo: Faloidina. Barra de aumento: 10µm. Cuantificación de la degradación de gelatina fluorescente por células totales en células LM38-LP tratadas o no con TGF-B1 y SB431542, (n=4). *p<0,05, **p<0,001 utilizando ANOVA-una vía. (B) Imágenes representativas de las células en el ensayo de gelatina. Cuantificación de la degradación de gelatina fluorescente por células totales en LM38-LP tratadas o no con Galunisertib (n=3). *p<0,05, utilizando la prueba t de una cola.

La capacidad degradativa de la línea celular LM38-LP aumento frente al tratamiento con TGF-B1, mientras que los inhibidores del TGFBR1, SB431542 y Galunisertib, la redujeron (Figura 48 A y B). Para determinar el impacto de la modulación de la vía del TGF-B en la capacidad de migración de las LM38-LP, se realizó un ensayo de

seguimiento en tiempo real de célula individual. Las células LM38-LP tratadas con TGF-B1 recombinante aceleraron su velocidad media al migrar en un entorno de colágeno tipo I en comparación con el control, mientras que SB431542 disminuyó su velocidad media (Figura 49 A). El mismo resultado se observó en la línea celular MCF10DCIS.com (Figura 49 B).

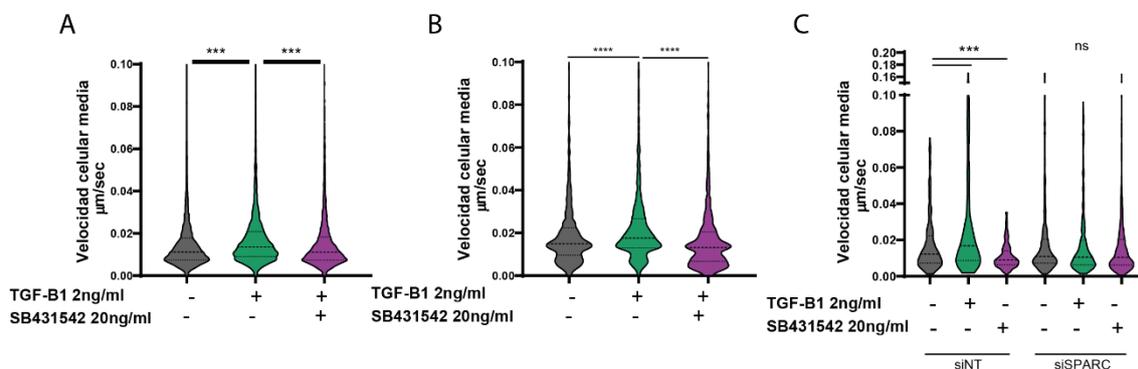


Figura 49. - Evaluación del efecto de la vía molecular de TGF-B y SPARC sobre la migración. Ensayo de migración celular en colágeno 3D de células (A) LM38-LP y (B) MCF10DCIS.com tratadas o no con TGF-B1 y SB431542. Gráfico de violín de velocidad celular media, *** $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test. (C) Ensayo de seguimiento unicelular en 2D en células LM38-LP silenciadas para SPARC tratadas o no con TGF-B1 y SB431542. Gráfico de violín de velocidad celular media, *** $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test.

Por su parte se evaluó el efecto del silenciamiento de SPARC en la línea LM38-LP en un ensayo de migración 2D, donde las células fueron tratadas con el TGF-B1 y su inhibidor. Sorprendentemente, cuando comparamos el efecto del TGF-B1 recombinante y del SB431542 las células siSPARC no mostraron diferencias significativas entre tratamientos en contraste a lo observado en el control (Figura 49 C). De este modo, SPARC desempeñaría un papel fundamental en el proceso de migración a través de la vía TGF-B. Estos resultados demuestran que la vía del TGF-B juega un papel crucial en los procesos de migración e invasión, estrechamente asociada con MT1-MMP, y SPARC, ambos actores esenciales en estos procesos.

Efecto In vivo de la inhibición del TGFBR1

Se analizó la vinculación de SPARC y la vía molecular de TGF-B en el modelo intraductal singénico. En los tumores invasores que se obtuvieron luego de cinco semanas post inoculación intraductal, SPARC y el TGFBR1 mostraron un patrón similar de expresión asociado al frente de invasión, como también se observó previamente en la Figura 37 D en cuanto a la expresión de TGF-B1 (Figura 50 A). Este resultado apoya la

idea de que la vía molecular TGF-B1 tendría un rol clave en la progresión tumoral temprana de manera dependiente de SPARC y a su vez, demuestra que el modelo intraductal singénico es un buen modelo para poner a prueba el efecto de la inhibición de TGFBR1 en tumores SPARC positivos.

Además, se analizó en bases de datos publicas la existencia de alguna correlación entre el ligando y receptor de la vía molecular de TGF-B y SPARC. Dado que estamos trabajando *in vitro* e *in vivo* con tumores hormono independientes como son los generados a partir la línea LM38-LP y MCF10DICS.com, para el análisis se utilizaron un set de datos de cáncer de mama de tipo basal del TCGA. En concordancia con los observado en nuestros experimentos, SPARC correlacionó positivamente en cuanto a su expresión tanto con TGF-B1 como con TGFBR1 (Figura 50 B).

Los resultados *in vitro* demostraron la existencia de una asociación funcional entre SPARC y la vía del TGF-B en los procesos asociados a la progresión del cáncer de mama, que abrió la puerta a estudiar sus contribuciones en la progresión *in situ*-Invasor. Se evaluó entonces el impacto del Galunisertib, inhibidor del TGFBR1, en la progresión temprana en tumores SPARC positivos, generados luego de la inoculación intraductal de

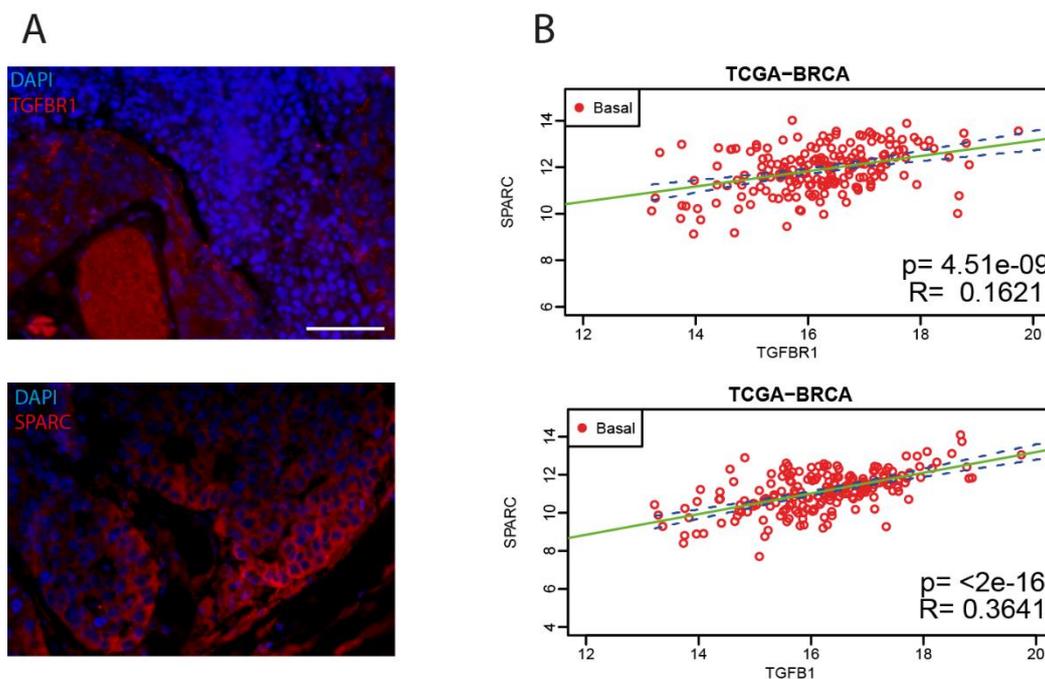


Figura 50.- Evaluación de la expresión de SPARC y TGFBR1 en el modelo intraductal LM38-LP y en bases de datos públicas. (A) Cortes de tumores LM38-LP invasores marcados por inmunofluorescencia contra TGFBR1 y SPARC. Barra de aumento: 100 μ m. (B) Análisis de correlación entre TGFBR1 y TGFBR1 contra SPARC a partir de un set de datos de cáncer de mama de tipo basal obtenidos a partir de TCGA.

la línea celular LM38-LP. Utilizando la técnica de montaje completo de la glándula mamaria (*whole mount*) donde las mismas son teñidas con rojo carmine para identificar los focos tumorales, y la tinción de H&E, se pudieron observar tumores con características *in situ*, es decir confinados dentro de ducto mamario, y tumores en un estadio invasor que excedían los límites del ducto y abarcaban el estroma mamario (Figura 51 A y B). Galunisertib disminuyó la proporción de tumores invasores en comparación con el grupo control (Figura 51 C). El área tumoral media por glándula positiva fue significativamente mayor entre DCIS e IDC en los animales del grupo control en comparación con los animales tratados con Galunisertib (Figura 51 D).

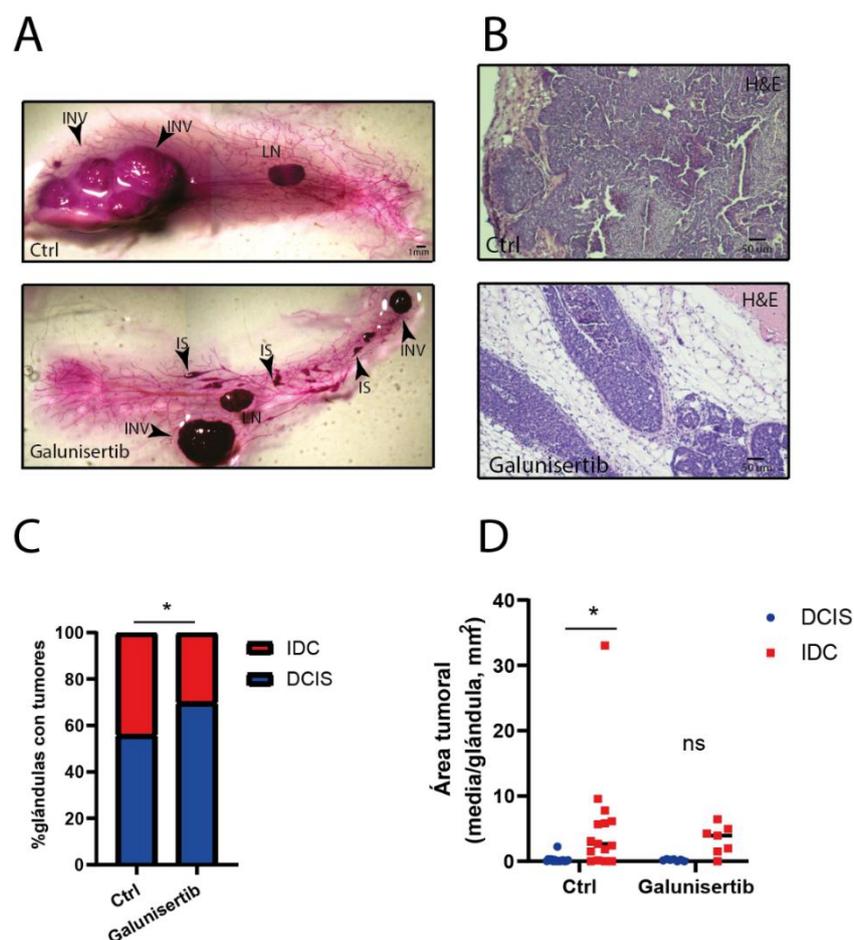


Figura 51.- Efecto del Galunisertib en la transición *in situ*-invasora. (A) Glándulas enteras teñidas con carmín analizadas 4-5 semanas después de la inyección de la línea celular LM38-LP indicada (Ctrl o tratada con Galunisertib). IS: *in situ*; INV: invasivo; LN: ganglio linfático. Barra de escala, 1 mm. (B) Tinción de H&E de las glándulas inoculadas intraductalmente 4-5 semanas después de la inyección de la línea celular LM38-LP indicada. Barra de escala: 50 μ m. (C) Proporción de tumores con características *in situ* e invasoras según grupo Ctrl contra Galunisertib. Prueba de Fisher, $p = 0,0391$. (D) Área tumoral por glándula comparando el estado de progresión en el grupo Ctrl y tratado con Galunisertib. ANOVA de 2 vías, prueba de comparaciones múltiples de Tukey, $p = 0,0418$.

Por último, en los tumores tratados con Galunisertib se observó una disminución en la proporción de celular proliferativas a partir de la marcación de Ki67. Sumado a ello se corrobora que Galunisertib disminuyó la marcación nuclear de SMAD4 en las células tumorales, dando cuenta de su efectividad en la inhibición de la vía canónica de TGF-B. En concordancia con lo descrito *in vitro*, Galunisertib disminuyó intensidad de la marca tanto de SPARC como MT1-MMP (Figura 52 A-B). Estos resultados nos llevan a proponer que la inhibición de la vía del TGF-B como posible blanco molecular de la progresión temprana de tumores SPARC-positivos.

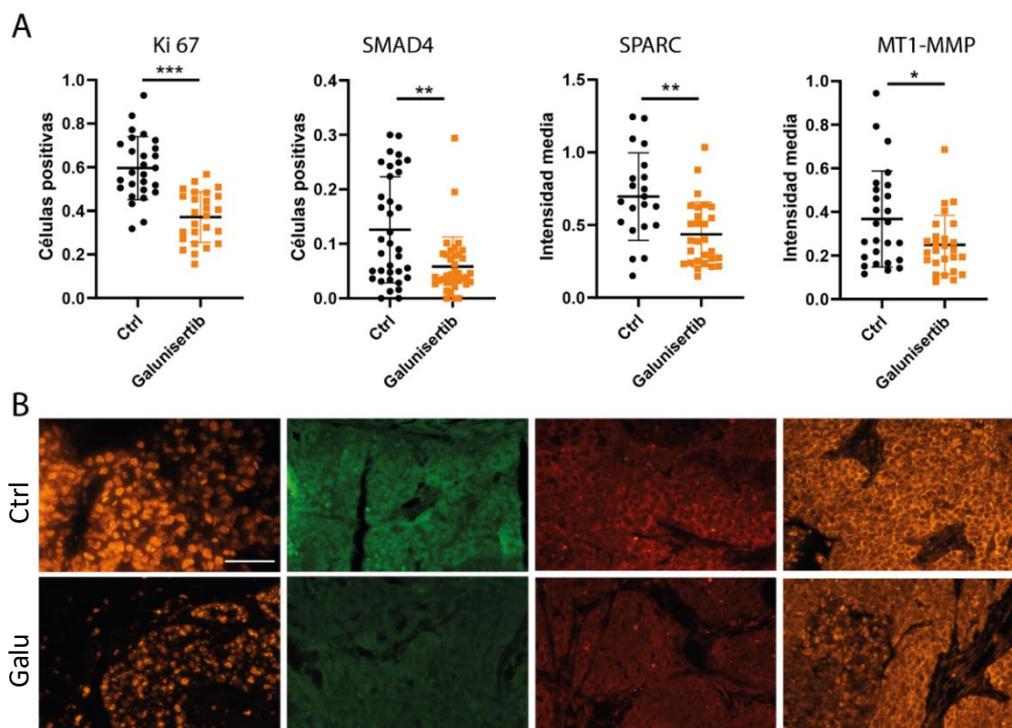


Figura 52.- Valoración de distintos marcadores de interés en cortes de tumores intraductales. (A) Proporción de células positivas para los marcadores Ki-67, SMAD-4, SPARC y MT1-MMP. La tinción se realizó por inmunofluorescencia en secciones de tejido parafinados de tumores tratados o no con Galunisertib, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, prueba de Mann-Whitney. (B) Se muestran imágenes ilustrativas. Barra de escala: 50 μm .

Conclusiones capítulo 2b

A partir del establecimiento de un modelo intraductal que imita fehacientemente la patología mamaria en cuanto a la progresión tumoral temprana, se pudieron diferenciar dos poblaciones, donde MT1-MMP^{Alto} estaba asociada a mayor agresividad. Posteriormente, se cruzaron estos datos con los obtenidos previamente, a partir de un análisis transcriptómico de cohortes de pacientes con tumores DCIS de alto grado y de donde surgieron los tres genes candidatos: SPARC, COX2 y CLCA2. En primera medida pasamos a estudiar SPARC como posible candidato a tener un rol clave en la progresión temprana de cáncer de mama, basándonos en la evidencia que nos brindaron repositorios de datos públicos.

En la clínica estudiamos la expresión de SPARC en 3 cohortes de pacientes que presentaban los distintos estadios de la patología mamaria (desde sus etapas más precoces hasta el tejido ganglionar metastásico) con un total de 146 pacientes. Se determinó que SPARC está asociado en la transición temprana pero luego se perdería en el proceso metastásico al menos a nivel del ganglio axilar.

Posteriormente, se pasó a estudiar qué mecanismo podría estar actuando en esta progresión temprana vinculada a SPARC. Surgió entonces TGF- β como nexo entre SPARC y el proceso invasión que estaría llevando a cabo MT1-MMP. *In vivo* se pudo corroborar que la inhibición de TGFRI con Galunisertib disminuyó la transición *in situ*-invasora situado a este receptor como un posible blanco molecular para el tratamiento del carcinoma mamario precoz (Figura 53).

Como conclusión final, SPARC surge como un posible marcador predictivo durante la progresión temprana del cáncer de mamá, aunque es necesario evaluar la progresión de los pacientes aquí estudiados para validarlo como tal. Además, se sitúa al TGFBR1 como posible blanco terapéutico para aquellas pacientes con tumores de mama en estadios tempranos SPARC positivos.

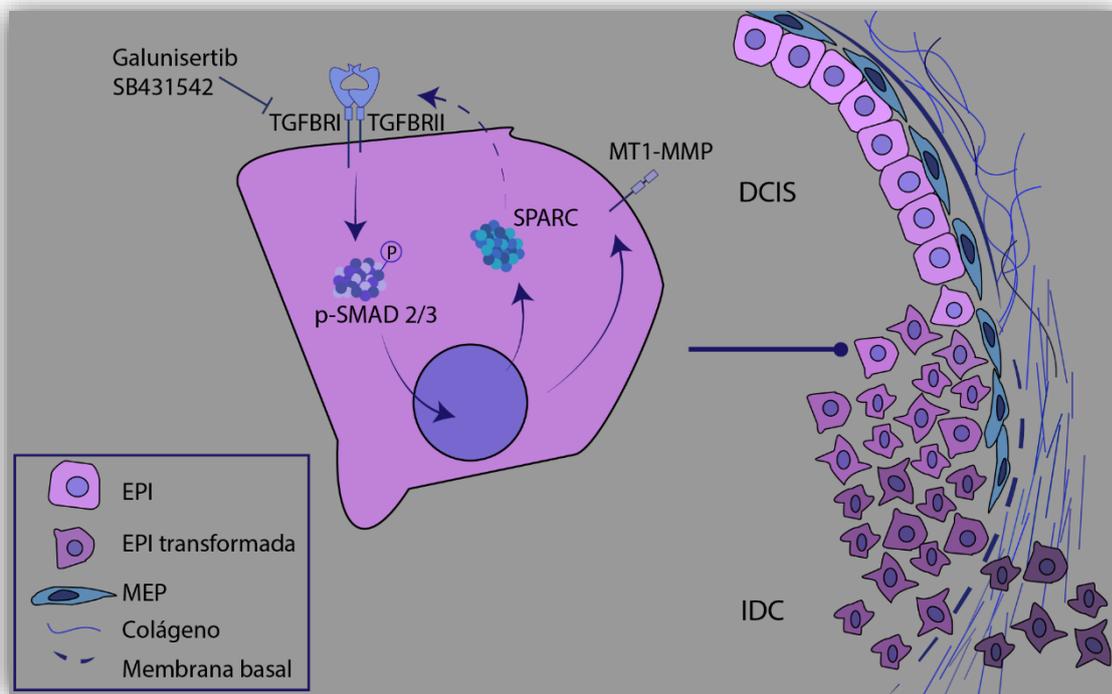


Figura 53.- Diagrama resumen. La activación canónica del TGFBR1 en la célula neoplásica provocaría un aumento en la expresión tanto de SPARC como de MT1-MMP que favorecería la progresión del estadio *in situ* al estadio invasor. En consecuencia, se propone al Galunisertib como terapia blanco de pacientes con tumores DCIS-SPARC+.

Discusión

El NO como actor pro tumoral en cáncer de mama

En la actualidad y en nuestro país, el cáncer de mama continúa teniendo un gran impacto en la población femenina. La preocupación actual acerca del abordaje de la enfermedad se centra en: la concientización de la detección precoz, la identificación de tratamientos personalizados, y la resistencia a las terapias ya utilizadas. El subtipo triple negativo, si bien tiene una frecuencia de aparición que ronda entre el 10-15% de los cánceres detectados, es el grupo de peor pronóstico y a su vez no tiene una terapia blanco-específica¹⁵¹. En este contexto clínico es necesario continuar identificando nuevos blancos moleculares de tratamiento y biomarcadores que nos permitan predecir el pronóstico de la enfermedad.

El NO es un radical libre que actúa como segundo mensajero, tiene un papel importante en procesos fisiológicos normales, como así también patológicos. La isoforma inducible iNOS, que se caracteriza por producir niveles micro molares de NO, suele activarse frente a una respuesta inmune y también en los procesos de cicatrización^{152,153}. En un contexto tumoral, la alta producción de NO está dada por la activación de iNOS afectando el balance redox de las células. La alta producción de NO produce cambios a nivel del ADN y cambios post traduccionales, que desregulan vías moleculares desencadenando efectos oncogénicos¹⁵⁴.

En base a esta premisa, en la presente tesis se buscó estudiar el efecto en la inhibición de la producción del NO sobre distintas características asociadas a procesos tumorales usando modelos celulares hormono independientes y de inoculación en el *fat pad*¹⁵⁵. Las líneas celulares LM3, LMM3 (murinas) y MDA-MB-231 (humana) presentan una mayor expresión de la enzima iNOS, en comparación con las líneas LM2 (murina) y MCF10DCIS.com (humana). En cáncer de mama se ha descrito que la sobre expresión de iNOS está asociada a mal pronóstico, particularmente en aquellos subtipos que no expresan receptores hormonales¹⁵⁶. Se ha propuesto que esta asociación de iNOS con un peor pronóstico en cáncer de mama ER negativos puede estar ligada al hecho de que en este subtipo de pacientes el NO regule la expresión de IL-8, que a su vez induce un fenotipo más agresivo de la enfermedad asociado a invasión, infiltración de neutrófilos y la densidad de vasos capilares^{157,158}. Sin embargo, no está del todo claro el mecanismo

por el cual se ve mayor expresión de IL-8 en aquellos tumores hormono independientes con alta expresión de iNOS^{156,158}. Sería interesante evaluar a futuro la contribución de IL-8 en la progresión tumoral asociada a la producción de NO en nuestro modelo murino hormono independiente.

Para evaluar el efecto de la modulación de la producción de NO utilizamos un inhibidor de NOS no selectivo, el L-NAME, el cual está reportado que inhibe débilmente a estas enzimas, pero puede ser hidrolizado rápidamente en el organismo y tener mayor efecto¹⁵⁹. En las líneas murinas pudimos comprobar que la producción de NO en niveles micro molares estaba principalmente ligada a la expresión de iNOS, dado que fue la isoforma con mayor expresión proteica. Esto habilita a pensar que, aunque se usó un inhibidor general de las NOS el efecto que vemos sea consecuencia de la modulación de iNOS. El tratamiento con L-NAME efectivamente disminuyó la producción de NO, es decir que inhibió la funcionalidad de la iNOS en las líneas murinas. A su vez, a nivel transcripcional disminuyó la expresión de esta enzima en la línea murina, LMM3 y la línea humana MDA-MB-231. Estos resultados concuerdan con los previamente reportados en células mesogliales, donde el tratamiento con donores e inhibidores de iNOS modulan la expresión de la enzima^{160,161}, lo cual indica que el NO autorregula la expresión de iNOS.

En cuanto a los efectos *in vitro* el L-NAME, se vio una bajada en la actividad metabólica en las líneas murinas y humanas iNOS positivas mientras que el tratamiento con el donador de NO, DETA-NO, aumentó su viabilidad. En particular en las líneas murinas esta disminución en la viabilidad dada por el tratamiento con L-NAME no se vio asociada a apoptosis. Nuestros resultados apoyan los previamente descritos por Granados-Principal *et al.* donde se demostró que la inhibición de iNOS, ya sea por inhibidores generales de NOS (entre ellos L-NAME) o específicos de iNOS como el 1400w, generan una disminución en la proliferación y migración de líneas receptor de estrógeno negativas como las MDA-MB-231 y las SUM159⁸⁶.

Al ver que la modulación del NO afectó la viabilidad de las líneas iNOS positivas, se procedió a estudiar si la disminución en la proliferación estaba ligada a la modulación de vía molecular mitogénica de MAPK. Se observó que en las líneas iNOS positivas tanto murinas como humana, el tratamiento con el inhibidor L-NAME disminuyó

significativamente la fosforilación de ERK 1/2 y en consecuencia, la activación de esta vía. Glynn *et al.* demostró previamente que en células de cáncer de mama MDA-MB-231 con características basales, el tratamiento con el DETA-NO aumentaba la fosforilación del receptor EGFR, que es uno de los receptores implicados en la activación de vías mitogénicas ligadas a ERK¹⁵⁶. Se ha descrito que Ras puede sufrir modificaciones post traduccionales mediadas por NO como la S- nitrosilación y desencadenar la activación de ERK 1 /2¹⁶². Esta reacción química ocurre cuando se produce la adición de un grupo NO al tiol del residuo de cisteína, formando un nitrosotiol¹⁶³. Se ha visto que este proceso puede sortear la activación directa del receptor EGFR y activar la vía río abajo a partir de RAS¹⁶⁴. La S- nitrosilación de Ras modula la propagación de la vía de las MAPK, incluso en cáncer de mama de tipo basal, favoreciendo la progresión de fenotipos agresivos de la enfermedad⁷². Estos resultados sugieren que el efecto proliferativo que promueve el NO generado a partir de la sobreexpresión de iNOS estaría mediado en parte por la activación de la vía de ERK.

Al analizar el efecto *in vivo* de la inhibición de la producción del NO sobre la progresión del cáncer mama, en línea con lo observado *in vitro*, se observó que el L-NAME disminuyó la velocidad de crecimiento solo de los tumores generados a partir de las líneas murinas iNOS positivas. Otros trabajos mostraron una disminución en el crecimiento de tumores de líneas iNOS positivas y ER-negativas como MDA-MB-231⁸⁶. La ventaja del modelo que se utilizó en esta tesis es que es singénico, de manera que el ratón portador es inmunocompetente y el microambiente es similar al del origen del tumor coincidiendo con la fisiología real. Dentro de las características que el tumor puede adquirir para promover la enfermedad, la generación de un microambiente pro tumoral es clave para contribuir al avance de la enfermedad. En el siguiente apartado se discutirá el rol del estroma frente a la modulación del NO en este modelo tumoral.

En conclusión, fue posible determinar que la producción de NO asociada en este caso principalmente a iNOS, tendría un papel clave en la progresión del cáncer de mama ER-negativo, en las cuales el NO estimularía la activación de la vía de MAPK promoviendo el crecimiento tumoral.

NO y microambiente

El microambiente tumoral juega un papel clave en la carcinogénesis y progresión tumoral, ya que puede fomentar o inhibir el crecimiento y propagación del cáncer de acuerdo con el fenotipo que adquiera según el contexto. En los tumores obtenidos luego de la inoculación de las líneas celulares murinas en el *fat pad* de la glándula mamaria, se pudo observar una bajada en la expresión de iNOS como consecuencia del tratamiento con inhibidor L-NAME. Como mencione previamente se ha descrito que el NO es capaz de auto regular las vías que lo producen y es por ello que su inhibición puede venir aparejada de una disminución en la expresión de iNOS como observamos en nuestro modelo^{160,161}.

Sumado a la disminución del tamaño tumoral, el tratamiento con L-NAME generó un aumento de la reacción desmoplásica con un marcado aumento del depósito de colágeno asociado a la activación estromal, sólo en tumores iNOS positivos. Esto nos llevó a evaluar el rol de los fibroblastos en este proceso de progresión tumoral mediado por la modulación de la producción de NO. *In vitro* los fibroblastos murinos NIH-3T3 demostraron ser sensibles a la modulación del NO. El incremento en la viabilidad de los fibroblastos bajo tratamiento con L-NAME no estaría siendo mediado por la vía mitogénica de las MAPK. Pensando en la idea de que un tumor es una especie de herida que nunca se cura, estos resultados dan una idea de que en este contexto el NO favoreciendo la proliferación de la célula neoplásica, mientras está inhibiendo la activación de los CAFs cicatriciales, proceso que podría revertirse con la inhibición de la producción de NO. Es abundante la literatura que establece a los CAFs y las células neoplásicas en un diálogo que promueve el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis¹⁶⁵⁻¹⁶⁹. Sin embargo, existen otros modelos en los cuales se propone que la ausencia de esta población favorece la formación de tumores más invasivos, como sucede en páncreas^{170,171}. Esto expone un rol de los CAFs completamente dual y dependiente de contexto. En nuestro modelo y en relación con el NO es posible inferir que la inhibición de las NOS produce la activación de fibroblastos cicatriciales, que desencadenarían una reacción desmoplásica con intención de frenar la progresión del tumor. En los últimos años, se ha descrito que los CAFs constituyen una población heterogénea y dinámica de manera que puede intervenir favoreciendo o bloqueando el

avance de los tumores según el contexto particular¹⁷². A futuro, es necesario estudiar que poblaciones de CAFs están llevando a cabo este rol antitumoral para poder determinar si efectivamente están asociados a un fenotipo cicatricial.

En el modelo que se ha caracterizado en esta tesis, los tumores iNOS positivos presentaron una mayor proporción de TILs frente al tratamiento con el inhibidor L-NAME y en particular un marcado aumento de los linfocitos citotóxicos CD8+. Este fenotipo observado va de la mano con lo que ya está descrito en la literatura, donde se ha visto que el NO tiene un papel inmunosupresor¹⁷³. En un modelo de células de cáncer de colon se observó que altas concentraciones de NO en el microambiente tumoral induce la S-nitrosilación de CCL2, una quemoquina, que disminuye el reclutamiento de linfocitos CD8 en el tumor¹⁷⁴. De esta manera la inhibición de la producción de NO estaría induciendo un contexto inmunológico más activo y citotóxico mediado en principio por el reclutamiento de CD8+, queda a futuro evaluar la proporción de poblaciones inmunes para entender de manera más global la modulación del sistema inmune mediada por el NO, ya que además de disminuir las poblaciones de células citotóxicas puede estar favoreciendo el reclutamiento de células de inmunosupresoras^{175,176}.

En resumen, la expresión de iNOS está asociada a mal pronóstico en varios tipos de cánceres y en particular dentro del cáncer de mama al fenotipo hormono independiente, siendo el que menos opciones terapéuticas dirigidas tiene. Se pudo determinar que en los modelos tumorales iNOS positivos, la inhibición de esta enzima produjo una disminución en el crecimiento tumoral que puede estar dada, al menos en parte, por una disminución de la activación de la vía mitogénica de MAPK. Sumado a ello la inhibición de la producción de NO indujo un microambiente cicatricial e inmunológicamente activo, que ayudaría a frenar el avance tumoral. De manera que el L-NAME estaría contribuyendo a la activación de un estroma antitumoral y podría proponerse como una terapéutica adyuvante en pacientes con tumores mamarios hormono independiente que sobre expresen iNOS y mejorar así los tratamientos ya existentes.

Establecimiento de un modelo intraductal singénico para el estudio de cáncer de mama de progresión temprana

Dentro de los objetivos de esta tesis se incluyó el establecimiento de marcadores pronósticos y de respuesta tratamiento de la progresión del cáncer de mama. Abordamos a iNOS y a la producción de NO como un posible blanco molecular, pero utilizando un modelo de cáncer de mama avanzado. Sin embargo, quisimos continuar con el estudio de posibles marcadores pronósticos y terapéuticos implicados en el estadio de progresión temprano. Para ello fue necesario desarrollar en nuestro laboratorio un modelo murino singénico, que permita estudiar los mecanismos involucrados en la progresión de los estadios iniciales.

Se tuvo en cuenta la técnica intraductal previamente descrita por Behbod y colaboradores, en la cual se inoculan directamente las células tumorales en el ducto de la glándula mamaria del ratón⁵⁷. Inicialmente se probaron varias líneas celulares murinas utilizando esta técnica, pero la única línea celular capaz de formar tumores *in situ* que progresaron espontáneamente a tumores invasores fue la línea bicelular LM38-LP. En el estadio invasor observamos un aumento significativo de linfocitos T de CD8+ en comparación con los tumores *in situ*. En la literatura se ha descrito en las lesiones en estadio invasor un aumento en la proporción de todas las células T, B, macrófagos y células PDL1 positivas en comparación con los focos *in situ*¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Se desprenden dos hipótesis según el contexto: una en la cual la micro invasión recluta un sistema inmune supresor favoreciendo la progresión y otro panorama en el cual se recluta un sistema inmune citotóxico para proteger contra el avance de la enfermedad⁶³. Es probable que se esté llevando a cabo un proceso de selección inducido por parte de las células de sistema inmune conforme progresa el tumor. Inicialmente estas células pueden estar suprimiendo el avance tumoral, pero a su vez las células tumorales pueden generar cambios en ese microambiente que promuevan un estroma más pro tumoral e inmuno suprimido que favorezca la progresión de la enfermedad. Los resultados aquí expuestos en torno a la caracterización del sistema inmune en el modelo singénico son escasos y es necesario evaluar a futuro las poblaciones celulares relacionadas con la supresión del sistema inmune para determinar un perfil inmunológico más global de este modelo tumoral.

La línea LM38-LP que fue establecida en nuestro Instituto tiene la particularidad de estar formada por los dos tipos celulares que conforman la glándula mamaria: células EPI y MEP^{65,66,68}. El hecho de estar formada por dos tipos celulares le conferiría una ventaja respecto a las líneas con poblaciones únicas, que si fueron capaces de formar tumores en el tejido graso de la glándula mamaria. Esto sugiere un diálogo o interacción entre las poblaciones EPI y MEP, que conferiría una ventaja para el desarrollo tumoral dentro del ducto mamario con un número muy bajo de células inoculadas. Por muchos años se les ha conferido a las células MEP un papel supresor tumoral, dado que se van perdiendo en la progresión del estadio *in situ* al estadio invasor^{62,180,181}. Sin embargo, Risom y colaboradores observaron lo contrario a lo esperado, en muestras de pacientes determinaron que aquellos DCIS más similares a la estructura normal del ducto donde la capa de células MEP era más continua, presentaban mayor riesgo de progresión que aquellos tumores DCIS que habían perdido en parte la población MEP, indicando que la pérdida parcial de la población MEP se asociaba a mejor pronóstico⁶³. A su vez Gudjonsson y colaboradores demostraron que las MEP asociadas a tumores no son capaces de polarizar a las células EPI, en principio por no producir laminina -1, de manera que podrían estar favoreciendo un fenotipo más mesenquimal en la célula EPI que a su vez se considera más invasor y agresivo¹⁸². Esto último nos habla de que las MEPs también son una población heterogénea y dinámica, y que pueden sufrir cambios que induzcan un fenotipo pro tumoral a lo largo de la enfermedad. Como plateo Wang y colaboradores existen distintos modelos que pueden explicar la transición temprana del cáncer de mama, dentro del modelo de invasión multi clonal una de las hipótesis que sigue la línea de nuestro modelo es el hecho de que múltiples sub clones cooperan mutuamente para progresar⁵⁴. Nuestros resultados sugieren que las células MEP les conferirían la ventaja a las células neoplásicas EPI de formar tumores intraductales.

Al analizar las características de la línea celular LM38-LP *in vitro*, se observó una mayor capacidad de supervivencia, mayor actividad invasiva y migratoria en comparación con las líneas establecidas de poblaciones únicas. Es interesante destacar además que la línea LM38-LP es la que mayor expresión de E-cadherina y alfa-SMA presenta en relación con las otras dos líneas celulares, lo cual se asocia a un mayor riesgo de progresión para pacientes con tumores DCIS ⁶³. Ambas proteínas median

interacciones intercelulares y con la matriz extracelular, E-cadherina media uniones célula-células, mientras que alfa-SMA está involucrada en la motilidad celular. Ambos procesos son claves en la formación de tumores, más aún en un ambiente tan adverso como es el ducto mamario, donde la célula debe valerse de varias estrategias para formar tumores intraductales que progresen espontáneamente a tumores invasores. Es interesante también mencionar que Berardi y colaboradores describieron en la línea LM38-LP presenta una componente con características de célula madre, lo cual nos da cuenta de la plasticidad de la línea ⁶⁸. La población con característica de célula madre es capaz de contribuir a la generación de células MEP asociadas a tumor que favorecen el desarrollo tumoral ¹⁸³. Queda a futuro profundizar en el rol de esta población en este modelo.

TGF-B1 como mediador del dialogo entre EPI y MEP

Basándonos en la hipótesis de la existencia de factores solubles que pudieran estar involucrados en el diálogo entre la célula EPI y MEP y que estén favoreciendo la formación y progresión de los tumores, evaluamos si los medios condicionados de las líneas generaban algún estímulo o inhibición a nivel la de proliferación de las líneas tumorales. Observamos que el medio condicionado de la línea enriquecida en MEP generaba un aumento en la actividad metabólica de la línea bicelular y que además venía aparejado de un aumento del índice proliferativo, evaluado mediante la expresión de PCNA. TGF-B1 ha sido previamente descrito como un mediador clave en el diálogo entre poblaciones EPI y MEP usando un modelo celular de cáncer de mama humano, donde se vio que el co-cultivo favorece un fenotipo más maligno¹⁴⁸. Basándonos en estos antecedentes, quisimos evaluar entonces si el TGF-B podía ser un factor clave en la progresión tumoral en nuestro modelo. El medio condicionado de la línea enriquecida en MEP indujo la inhibición de la proliferación en células MV-1-Lu, efecto que fue revertido por la presencia de un inhibidor de TGFRI siendo posible atribuirle este efecto a la presencia de TGF-B1 en el medio condicionado.

La línea bicelular LM38-LP fue la más sensible al tratamiento con el TGF-B1 recombinante y con el inhibidor de TGFRI. En la línea bicelular no se observó una asociación clara de la expresión de TGF-B1 con alguna de las poblaciones. Por su parte

la inhibición del TGFRI en esta línea mostro un cambio morfológico con relación a la disposición celular, las células se ubicaron de manera más compacta y con una disposición de las fibras de actina en forma de enjambre, coincidente con un fenotipo más epitelial. Como ya se describió previamente, el TGF-B1 sería necesario para el mantenimiento de la característica basal de las células CD44+ por lo que la inhibición de esta vía produce un fenotipo más epitelial¹⁸⁴. De manera que el TGF-B1 generado por la célula MEP podría estar sosteniendo un fenotipo mesenquimal e invasivo en la célula neoplásica EPI que le confiera la ventaja de colonizar el ducto mamario.

De esta manera se generó un buen modelo intraductal singénico capaz de imitar la patología humana y que podrá utilizarse para estudiar factores claves en la transición *in situ*- invasora. A su vez el diálogo entre las poblaciones EPI y LEP sería clave en la tumorigénesis del ducto mamario, donde TGF-B1 podría ser uno de los actores implicados en esta ventaja adaptativa de la línea bicelular.

Identificación de nuevos blancos moleculares en la progresión temprana del cáncer de mama

La detección de los estadios tempranos de la enfermedad ha avanzado en los últimos años debido a las mejoras que se han dado en el campo del diagnóstico por imágenes, en particular la mamografía, que permiten detectar hasta un 95% de cánceres en estadios tempranos. Generalmente las lesiones DCIS se encuentran asociadas a microcalcificaciones agrupadas, que están presentes en el 30% de los cánceres de mama y en un 55% de los casos no palpables^{185,186}. Además, es importante recalcar que aún no existen marcadores que ayuden a identificar específicamente que carcinomas ductales *in situ* progresaran hacia el estadio invasor. En la clínica, esta problemática genera un sobre tratamiento en aquellos DCIS que no van a progresar o una desestimación en aquellos que deberían recibir tratamientos más específicos para evitar las recaídas. De allí surge la importancia de identificar nuevos blancos moleculares para poder mejorar el diagnóstico y las terapias ya existentes en el tratamiento del cáncer de mama temprano.

Partiendo de la expresión diferencial de MT1-MMP en los tumores invasores del modelo intraductal xenogénico se pudieron aislar dos poblaciones celulares. A partir de

la secuenciación completa y enriquecimiento funcional observamos que los genes sobre expresados en la población MT1-MMP^{Alto} estaban vinculados a funciones relacionadas con interacciones célula-célula y célula-matriz. Los procesos relacionados a la capacidad que adquiere la célula de adherirse, migrar e invadir son todos mecanismos asociados al proceso de EMT. Recientemente se ha propuesto que la progresión temprana del cáncer de mama se llevaría a cabo en dos oleadas de transformación. Una etapa inicial, incluso anterior al proceso de invasión, en la que la célula neoplásica podría usar la EMT para colonizar los ductos y proliferar dentro de ellos para generar lesiones multifocales; y una segunda etapa en la cual las células ganan nuevamente características mesenquimales que le permiten invadir fuera del ducto mamario¹⁸⁷.

Abba y colaboradores caracterizaron previamente una cohorte de tumores DCIS de alto grado donde establecieron dos subgrupos C1 y C2, donde C1 estaba asociado a un fenotipo más agresivo de la enfermedad¹⁰¹. Al cruzarse los datos entre los genes sobre expresados en la subpoblación MT1-MMP^{Alto} del modelo xenogénico contra los subgrupos C1 y C2, encontramos 3 genes en común con el subgrupo de peor pronóstico: SPARC, CLCA2 y COX-2. Particularmente al analizar la correlación de estos genes utilizando bases de datos publicas encontramos que SPARC y MT1-MMP mostraban la mejor correlación, por lo cual decidimos continuar nuestra investigación analizando el rol de estas dos proteínas en la progresión temprana del cáncer de mama. Algunos trabajos también mostraron asociación en la expresión de estas proteínas en células de glioblastoma U87MG, en las cuales la sobre expresión de SPARC aumentaba a su vez la expresión de MT1-MMP a nivel transcripcional y a nivel de proteína en la membrana plasmática, aparejado de la activación y secreción de MMP2 y el clivaje de galectina 3, llevando a los autores a proponer esta estrategia como posible mecanismo de invasión en glioblastoma¹⁸⁷. Además, se ha descrito que SPARC es una proteína que promueve la pérdida de adhesión celular regula la fibrogénesis, depósito y remodelación del colágeno, incluso modula la expresión de metaloproteasas y ensamblaje de la matriz extracelular¹⁸⁸⁻¹⁹¹.

Si bien la evidencia apoya nuestro hallazgo, el rol de SPARC en el proceso de transición *in situ*-invasor no ha sido abordado. Estudiamos la expresión de SPARC en 2 cohortes de pacientes cuyo tejido tumoral incluía una componente *in situ*. Se observó

un aumento en la expresión de SPARC en la componente *in situ* respecto al tejido no tumoral adyacente al tumor y una expresión aún mayor en las lesiones infiltrantes. Por su parte al analizar una tercera cohorte que incluía pacientes con tumores invasores con metástasis axilar, pudimos observar que la expresión de SPARC era mayor en los tumores invasores, pero se perdía en la metástasis. Estos resultados nos sugieren que SPARC estaría asociado a la transición temprana del cáncer de mama, pero luego se perdería en el proceso metastásico, al menos a nivel del ganglio axilar. Szynglarewicz y colaboradores establecieron en una cohorte de 209 pacientes diagnosticadas con DCIS donde la alta expresión de SPARC a nivel de las células neoplásicas, fibroblastos y células mioepiteliales correlacionaba con la aparición de lesiones infiltrantes post cirugía (lumpectomía o mastectomía), lo que les permite concluir que SPARC sería un factor pronóstico¹⁹². En nuestro caso analizamos la expresión de SPARC en lesiones *in situ* e infiltrantes sincrónicas, aunque es cierto que en su mayoría no son muestras puramente DCIS y pueden comportarse distinto a las que se encuentran asociadas a lesiones infiltrantes. Queda a futuro el análisis entre el nivel de expresión de SPARC y la evolución clínica de las pacientes de nuestra institución.

Posteriormente se buscó estudiar el mecanismo a través del cual SPARC podría estar mediado en la progresión temprana del cáncer de mama. Estudiamos entonces la funcionalidad de SPARC inicialmente *in vitro*, en las líneas capaces de formar tumores *in situ* en ratones (LM38-LP). El silenciamiento de SPARC tanto en la línea murina como en la humana provocó una bajada en la expresión de MT1-MMP tanto a nivel transcriptómico como proteico y particularmente en la línea murina, esta bajada en la expresión se vio aparejada de una bajada en la capacidad de las células de degradar focalmente, la cual está íntimamente relacionada a la actividad de las metaloproteasas de membrana. De manera que el rol pro invasivo de SPARC estaría mediado por MT1-MMP. Esta relación ha sido previamente descrita en células de glioblastoma¹⁹³. Por su parte Christine Gilles y colaboradores describieron que, en células de cáncer de mama, pero en este caso en una línea positiva para receptores hormonales como es MCF-7 y que a su vez eran negativas para la expresión de SPARC, al sobre expresar MT1-MMP se ve que el tratamiento con péptidos recombinantes de SPARC modula la expresión de la enzima proteolítica¹⁹⁴. Es interesante también mencionar otro posible mecanismo de

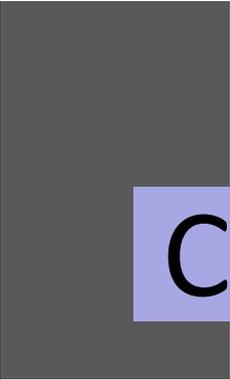
regulación entre estas dos proteínas dado que otra proteína de la familia de SPARC, denominada SPOCK2, también se vinculó con la regulación de MT1-MMP, ya que se reportó que interacciona directamente con MT1-MMP a través del dominio SPARC-EC¹⁹⁵. Este dominio particularmente es común a la familia de proteínas SPARC y comparte un 24% de homología con el dominio EC de SPARC¹⁹⁶. La asociación que vemos entre SPARC y MT1-MMP en nuestros modelos y lo descrito en la literatura, nos lleva a hipotetizar que SPARC podría estar interaccionando directamente con MT1-MMP y modular así el proceso de invasión, lo cual sería un mecanismo interesante para evaluar a futuro.

Luego estudiamos utilizando herramientas bioinformáticas posibles vías moleculares involucradas. Surgió entonces TGF-B como nexo entre SPARC y el proceso invasión. Previamente ya se describió en esta tesis que, en el modelo murino, TGF-B puede ser un posible actor dentro de los mecanismos de invasión, de manera que este hallazgo sustenta la hipótesis original y suma a SPARC como gen involucrado. Se pudo observar que el tratamiento con el inhibidor específico de TGFRI disminuyó tanto la expresión de SPARC como MT1-MMP en ambos modelos celulares, como así también afectó la migración y la invasión celular. Estos resultados estarían demostrando que la hiperactivación del TGFBR1 promovería la expresión de SPARC y MT1-MMP. A su vez el silenciamiento de SPARC generó una bajada en la fosforilación de SMAD2/3, que nos da cuenta de que SPARC podría estar induciendo la activación de la vía canónica de TGF-B. En relación a estos resultados, se ha reportado previamente la posible asociación de SPARC y la vía de TGF-B en otros modelos celulares. Schiemann y colaboradores propusieron en 2003 que SPARC, vía su dominio EC, estimula la fosforilación y traslocación al núcleo de las SMADs reguladas río abajo por TGFBR en células epiteliales y endoteliales, sugiriendo una interacción tanto directa como indirecta de SPARC con los receptores de la vía¹⁹⁷. Por su parte Francki y colaboradores, al año siguiente determinaron en células mesangiales que SPARC interaccionaría directamente con el receptor II de TGF-B solo en presencia de TGF-B1, induciendo la activación de la vía JNK y la vía canónica de TGF-B¹³⁰. Esto sugiere que SPARC podría estar promoviendo la activación de la vía de TGF-B de manera directa y en consecuencia favoreciendo la activación de transformaciones que lleven a la célula neoplásica a un fenotipo

mesenquimal, con la consecuente sobre expresión de proteasas como MT1-MMP. En contraparte Rivera y colaboradores en 2011 demostraron que SPARC induce la migración de los pericitos a través del bloqueo de la vía TGF-B por interacción con endoglin¹⁹⁸. Esto no resulta del todo sorprendente ya que es conocido que TGF-B tiene efectos contrapuestos dependiendo de su concentración y del estado de transformación de la célula blanco¹⁹⁹.

In vivo se pudo observar que la inhibición de TGFRI con Galunisertib disminuyó la transición *in situ*- invasora situando a este receptor como un posible blanco molecular para el tratamiento de pacientes que presenten tumores de mama en estadios iniciales que sean SPARC positivos. Se vieron efectos favorables en ensayos clínicos en cáncer colorrectal avanzado, donde la combinación de Galunisertib con neo adyuvancia mejoró la tasa de respuesta total²⁰⁰. Existe un ensayo clínico en curso donde se pretende evaluar el tratamiento de Galunisertib en combinación con Paclitaxel en pacientes con cáncer triple negativo metastásico, aunque aún no han mostrado resultados al respecto²⁰¹.

Como conclusión de este capítulo, SPARC emerge como una proteína implicada en la progresión temprana del cáncer de mamá. Además, se sitúa al TGFBR1 como posible blanco terapéutico para aquellas pacientes con tumores de mama tempranos que sean positivos para SPARC.



Conclusión



En la presente tesis fue posible estudiar distintos actores de la progresión tumoral en cáncer de mama. Para ello se abordó en principio la modulación del NO como actor clave en un modelo de progresión hormono independiente de estadios más avanzados de la enfermedad utilizando el modelo *fat pad* en ratones. La inhibición de la enzima iNOS, principal productora de NO en nuestro modelo celular, generó una disminución en el crecimiento de las células neoplásicas, al menos en parte mediado por la vía MAPK. Este efecto tiene lugar en paralelo a la activación de los fibroblastos que favorece el reemplazo del tejido neoplásico. De manera que la inhibición de la producción de NO en este modelo surge como potencial terapia en tumores mamarios hormono independientes.

Con el objetivo de estudiar posibles actores de la progresión temprana en cáncer de mama desarrollamos un nuevo modelo murino intraductal singénico capaz de imitar la patología mamaria de acuerdo a los distintos grados de invasión. El modelo celular LM38-LP, es un modelo mixto que nos permite hipotetizar un rol cooperativo de las poblaciones mamarias en la carcinogénesis ductal, donde TGF-B1 estaría teniendo un rol clave como mediador del diálogo entre las poblaciones celulares que componen la glándula mamaria.

SPARC surge como candidato implicado en la progresión temprana del cáncer de mama. Analizando distintas cohortes de pacientes pudimos encontrar que SPARC estaría involucrado en la transición *in situ* – invasor, pero se perdería en el proceso de diseminación a nivel de los nódulos axilares. Estudiando los mecanismos por los cuales SPARC y MT1-MMP estarían llevando a cabo este proceso, surgió la vía de TGF-B como mediadora del proceso de invasión que es esencial para progresar hacia el estadio invasor. De esta manera proponemos la inhibición de TGFRI como terapia potencial en aquellos pacientes con tumores SPARC positivos.

En el presente trabajo se ha desarrollado un modelo murino de gran relevancia, ya que imita fehacientemente la transición de un estadio *in situ* a un estadio invasor de cáncer de mama en un contexto inmunocompetente. Además, se han postulado nuevos blancos terapéuticos y posibles biomarcadores a través de estudios en muestras humanas y uso de bases de datos. Mas importante aún es el hecho de que los

marcadores postulados han podido ser validados en el modelo murino. Esto le otorga un gran valor a nuestro modelo intraductal para continuar con el abordaje del estudio de la progresión temprana del cáncer de mama, que será de mucho valor para contribuir al desarrollo de la medicina de precisión.



Bibliografía



1. Bray Bsc, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **74**, 229–263 (2024).
2. Odes, E. J. *et al.* Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *S. Afr. J. Sci.* **112**, 5–5 (2016).
3. NIH. What Is Cancer? (2021).
4. Cowell, C. F. *et al.* Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. *Mol. Oncol.* **7**, 859–869 (2013).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
7. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46 (2022).
8. Witsch, E., Sela, M. & Yarden, Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. **25**, 85–101 (2010).
9. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
10. Jiang, B. H. & Liu, L. Z. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* **102**, 19 (2009).
11. Santoni-Rugiu, E., Jensen, M. R. & Thorgeirsson, S. S. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expressing c-myc and transforming growth factor alpha. *Cancer Res.* **58**, 123–134 (1998).
12. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–1337 (2007).
13. Junttila, M. R. & Evan, G. I. p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 821–829 (2009).

14. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 611–622 (2005).
15. Baeriswyl, V. & Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 329–337 (2009).
16. Ferrara, N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 21–26 (2010).
17. Kazerounian, S., Yee, K. O. & Lawler, J. Thrombospondins in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 700–712 (2008).
18. Suhail, Y. *et al.* Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst.* **9**, 109 (2019).
19. Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **10**, 415–433 (2000).
20. Warburg, O. H., Dickens, F. & für Biologie, K. W.-I. *The Metabolism of Tumors: Investigation from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem.* (Constable, 1930).
21. WARBURG, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
22. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **23**, 537–548 (2009).
23. Semenza, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 51–56 (2010).
24. Li, X. *et al.* Lactate metabolism in human health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022 71 7**, 1–22 (2022).
25. Ghorani, E., Swanton, C. & Quezada, S. A. Cancer cell-intrinsic mechanisms driving acquired immune tolerance. *Immunity* **56**, 2270–2295 (2023).
26. Yuan, S., Norgard, R. J. & Stanger, B. Z. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov.* **9**, 837 (2019).
27. Costa, P. M. da S. *et al.* Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment. *Front. Cell Dev. Biol.* **11**, (2023).

28. Helmink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V. & Wargo, J. A. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat. Med.* **25**, 377–388 (2019).
29. Massagué, J. & Ganesh, K. Metastasis-Initiating Cells and Ecosystems. *Cancer Discov.* **11**, 971–994 (2021).
30. Globocan. Cancer today. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1&types=0_1&sort_by=value1&sexes=1_2 (2022).
31. Khan, Y. S., Fakoya, A. O. & Sajjad, H. Anatomy, Thorax, Mammary Gland. *StatPearls* (2023).
32. Cardiff, R. D. et al. *Mammary Gland. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, Second Edition* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-802900-8.00023-3.
33. 11 Breast Anatomy | Radiology Key. <https://radiologykey.com/11-breast-anatomy/>.
34. Estadísticas - Mortalidad | Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>.
35. Instituto Nacional del cancer - Argentina. Estadísticas - Incidencia. *Ministerio de Salud de Argentina* <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia> (2024).
36. Feng, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* **5**, 77 (2018).
37. Feng, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* **5**, 77–106 (2018).
38. Cancer Treatment - Clinical Practice Algorithms | MD Anderson Cancer Center. <https://www.mdanderson.org/for-physicians/clinical-tools-resources/clinical->

- practice-algorithms/cancer-treatment-algorithms.html.
39. Sørliie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–10874 (2001).
 40. Roy, M., Fowler, A. M., Ulaner, G. A. & Mahajan, A. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin.* **18**, 441–458 (2023).
 41. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, 1–18 (2010).
 42. Turner, K. M., Yeo, S. K., Holm, T. M., Shaughnessy, E. & Guan, J. L. Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **321**, C343–C354 (2021).
 43. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–2767 (2011).
 44. Pautas en Oncología 2023 – Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. <https://institutoroffo.uba.ar/pautas-en-oncologia-2023/>.
 45. NIH. Estadificación del cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion>.
 46. Feng, Y. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* **5**, 77 (2018).
 47. Katsura, C., Ogunmwonyi, I., Saha, S. & Katsura, C. Doctors in Training Breast cancer : presentation , investigation and management. 4–10 (2024).
 48. Giaquinto, A. N. *et al.* Breast Cancer Statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **72**, 524–541 (2022).
 49. Collins, L. C. *et al.* Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated

- after diagnostic biopsy: Results from the nurses' health study. *Cancer* **103**, 1778–1784 (2005).
50. Sanders, M. E., Schuyler, P. A., Dupont, W. D. & Page, D. L. The natural history of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of long-term follow-up. *Cancer* **103**, 2481–2484 (2005).
 51. Foschini, M. P. *et al.* Genetic clonal mapping of in situ and invasive ductal carcinoma indicates the field cancerization phenomenon in the breast. *Hum. Pathol.* **44**, 1310–1319 (2013).
 52. Hagio, K. *et al.* Genetic heterogeneity during breast cancer progression in young patients. *Breast Off. J. Eur. Soc. Mastology* **60**, 206 (2021).
 53. Casasent, A. K., Edgerton, M. & Navin, N. E. Genome evolution in ductal carcinoma in situ: invasion of the clones. *J. Pathol.* **241**, 208–218 (2017).
 54. Wang, J. *et al.* Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: molecular features and clinical significance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **9**, (2024).
 55. Zeng, L., Li, W. & Chen, C. S. Breast cancer animal models and applications. *Zool. Res.* **41**, 477–494 (2020).
 56. Regua, A. T., Arrigo, A., Doheny, D., Wong, G. L. & Lo, H. W. Transgenic Mouse Models of Breast Cancer. *Cancer Lett.* **516**, 73 (2021).
 57. Behbod, F. *et al.* An intraductal human-in-mouse transplantation model mimics the subtypes of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res.* **11**, R66 (2009).
 58. Valdez, K. E. *et al.* Human primary ductal carcinoma in situ (DCIS) subtype-specific pathology is preserved in a mouse intraductal (MIND) xenograft model. *J. Pathol.* **225**, 565–573 (2011).
 59. Krause, S., Brock, A. & Ingber, D. E. Intraductal Injection for Localized Drug Delivery to the Mouse Mammary Gland. *J. Vis. Exp.* e50692 (2013) doi:10.3791/50692.

60. Urtreger, A. J. *et al.* Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *Int. J. Oncol.* **11**, 489–496 (1997).
61. Galli, S. *et al.* Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* **17**, 1259–1265 (2000).
62. Barsky, S. H. & Karlin, N. J. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **10**, 249–260 (2005).
63. Risom, T. *et al.* Transition to invasive breast cancer is associated with progressive changes in the structure and composition of tumor stroma. *Cell* vol. 185 (2022).
64. Manzur T, Diament M, Vauthay L, Stillitani, García C, Fontanals A, K. S. Tumores murinos espontáneos de experimentación en el Instituto de Oncología 'Ángel H. Roffo'. *Animales de Experimentación. Rev Hispanoam.* **4**, 25–26 (1998).
65. Bumaschny, V. *et al.* Malignant myoepithelial cells are associated with the differentiated papillary structure and metastatic ability of a syngeneic murine mammary adenocarcinoma model. *Breast Cancer Res.* **6**, (2004).
66. Todaro, L. B. *et al.* A clinically relevant bi-cellular murine mammary tumor model as a useful tool for evaluating the effect of retinoic acid signaling on tumor progression. *Breast Cancer* **20**, 342–356 (2013).
67. Krasnapolski, M. A., Lodillinsky, C., Bal De Kier Joffé, E. & Eiján, A. M. Hypoxia-induced nitric oxide release by luminal cells stimulates proliferation and uPA secretion of myoepithelial cells in a bicellular murine mammary tumor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 1727–1738 (2015).
68. Berardi, D. E. *et al.* PKC δ Inhibition Impairs Mammary Cancer Proliferative Capacity but Selects Cancer Stem Cells, Involving Autophagy. *J. Cell. Biochem.* **117**, 730–740 (2016).
69. Miller, F. R., Santner, S. J., Tait, L. & Dawson, P. J. MCF10DCIS.com Xenograft

- Model of Human Comedo Ductal Carcinoma In Situ. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1185a – 1186 (2000).
70. Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M. & Charles, I. G. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.* **12**, 311–320 (2002).
71. Korde Choudhari, S., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A. R. & Joshi, V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J. Surg. Oncol.* **11**, 118 (2013).
72. Mishra, D., Patel, V. & Banerjee, D. Nitric Oxide and S-Nitrosylation in Cancers: Emphasis on Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl).* **14**, (2020).
73. Vakkala, M. *et al.* Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2408–2416 (2000).
74. Switzer, C. H. *et al.* S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer. *Mol. Cancer Res.* **10**, 1203–1215 (2012).
75. Sandes, E. O. *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase in tumoral and non-tumoral epithelia from bladder cancer patients. *Nitric oxide Biol. Chem.* **12**, 39–45 (2005).
76. Belgorosky, D. *et al.* Inhibition of nitric oxide is a good therapeutic target for bladder tumors that express iNOS. *Nitric oxide Biol. Chem.* **36**, 11–18 (2014).
77. Eijan, A. M. *et al.* Differential nitric oxide release and sensitivity to injury in different murine mammary tumor cell lines. *Int. J. Mol. Med.* **2**, 625–630 (1998).
78. Víteček, J., Lojek, A., Valacchi, G. & Kubala, L. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. *Mediators Inflamm.* **2012**, (2012).
79. Haynes, W. G., Noon, J. P., Walker, B. R. & Webb, D. J. Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J. Hypertens.* **11**, 1375–1380 (1993).

80. Annane, D. *et al.* Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet (London, England)* **355**, 1143–1148 (2000).
81. Garvey, E. P. *et al.* 1400W Is a Slow, Tight Binding, and Highly Selective Inhibitor of Inducible Nitric-oxide Synthase in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 4959–4963 (1997).
82. Sennequier, N., Wolan, D. & Stuehr, D. J. Antifungal imidazoles block assembly of inducible NO synthase into an active dimer. *J. Biol. Chem.* **274**, 930–938 (1999).
83. McMillan, K. *et al.* Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1506–1511 (2000).
84. López, A. *et al.* Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* **32**, 21–30 (2004).
85. Sikora, A. G. *et al.* Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1834 (2010).
86. Granados-Principal, S. *et al.* Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **17**, (2015).
87. Göke, M., Kanai, M. & Podolsky, D. K. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am. J. Physiol.* **274**, (1998).
88. Chang, H. Y. *et al.* Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12877–12882 (2002).
89. Okazaki, M., Yoshimura, K., Suzuki, Y. & Harii, K. Effects of subepithelial fibroblasts on epithelial differentiation in human skin and oral mucosa: heterotypically recombined organotypic culture model. *Plast. Reconstr. Surg.* **112**, 784–792 (2003).
90. Parsonage, G. *et al.* A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends*

- Immunol.* **26**, 150 (2005).
91. Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W. & Kalluri, R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1640–1646 (2006).
 92. LeBleu, V. S. & Kalluri, R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis. Model. Mech.* **11**, (2018).
 93. Resultados.
<https://www.cancer.gov/espanol/buscar/resultados?swKeyword=biomarcador>.
 94. Lodillinsky, C. *et al.* p63/MT1-MMP axis is required for in situ to invasive transition in basal-like breast cancer. *Oncogene* **35**, 344–357 (2016).
 95. Lodillinsky, C. *et al.* Metastasis-suppressor NME1 controls the invasive switch of breast cancer by regulating MT1-MMP surface clearance. *Oncogene* **40**, 4019–4032 (2021).
 96. Ohuchi, E. *et al.* Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J. Biol. Chem.* **272**, 2446–2451 (1997).
 97. Kajita, M. *et al.* Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Cleaves Cd44 and Promotes Cell Migration. *J. Cell Biol.* **153**, 893–904 (2001).
 98. Koshikawa, N. *et al.* Proteolytic processing of laminin-5 by MT1-MMP in tissues and its effects on epithelial cell morphology. *FASEB J.* **18**, 364–366 (2004).
 99. Woskowicz, A. M., Weaver, S. A., Shitomi, Y., Ito, N. & Itoh, Y. MT-LOOP-dependent localization of membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to the cell adhesion complexes promotes cancer cell invasion. *J. Biol. Chem.* **288**, 35149–35158 (2013).
 100. Wu, K. peng *et al.* MT1-MMP is not a good prognosticator of cancer survival: evidence from 11 studies. *Tumor Biol.* **35**, 12489–12495 (2014).
 101. Abba, M. C. *et al.* A Molecular Portrait of High-Grade Ductal Carcinoma In Situ.

- Cancer Res.* **75**, 3980–3990 (2015).
102. Alexanian, A. & Sorokin, A. Cyclooxygenase 2: Protein-protein interactions and posttranslational modifications. *Physiol. Genomics* **49**, 667–681 (2017).
 103. Dannenberg, A. J., Lippman, S. M., Mann, J. R., Subbaramaiah, K. & DuBois, R. N. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J. Clin. Oncol.* **23**, 254–266 (2005).
 104. Li, F. & Zhu, Y. T. HGF-activated colonic fibroblasts mediates carcinogenesis of colonic epithelial cancer cells via PKC-cMET-ERK1/2-COX-2 signaling. *Cell. Signal.* **27**, 860–866 (2015).
 105. Sun, H. *et al.* COX-2 expression in ovarian cancer: an updated meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 88152–88162 (2017).
 106. Montezuma, M. A. P. *et al.* COX-2 as a determinant of lower disease-free survival for patients affected by ameloblastoma. *Pathol. Res. Pract.* **214**, 907–913 (2018).
 107. Gurram, B. *et al.* Celecoxib Conjugated Fluorescent Probe for Identification and Discrimination of Cyclooxygenase-2 Enzyme in Cancer Cells. *Anal. Chem.* **90**, 5187–5193 (2018).
 108. Bartova, M. *et al.* COX-2, p16 and Ki67 expression in DCIS, microinvasive and early invasive breast carcinoma with extensive intraductal component. *Bratisl. Lek. Listy* **115**, 445–451 (2014).
 109. Guttlein, L. N. *et al.* Predictive outcomes for HER2-enriched cancer using growth and metastasis signatures driven by SPARC. *Mol. Cancer Res.* **15**, 304–316 (2017).
 110. Haworth, A. S. & Brackenbury, W. J. Emerging roles for multifunctional ion channel auxiliary subunits in cancer. *Cell Calcium* **80**, 125–140 (2019).
 111. Gruber, A. D. & Pauli, B. U. Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca²⁺-activated chloride channel CLCA2. *Cancer Res.* **59**, 5488–5491 (1999).
 112. Sasaki, Y. *et al.* CLCA2, a target of the p53 family, negatively regulates cancer cell

- migration and invasion. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 1512 (2012).
113. Purrington, K. S. *et al.* CLCA2 expression is associated with survival among African American women with triple negative breast cancer. *PLoS One* **15**, (2020).
 114. Lane, T. F. & Sage, E. H. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* **8**, 163–173 (1994).
 115. Bornstein, P. & Sage, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 608–616 (2002).
 116. Sasaki, T., Hohenester, E., Göhring, W. & Timpl, R. Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J.* **17**, 1625–1634 (1998).
 117. Martinek, N., Shahab, J., Sodek, J. & Ringuette, M. Is SPARC an evolutionary conserved collagen chaperone? *J. Dent. Res.* **86**, 296–305 (2007).
 118. Busch, E., Hohenester, E., Timpl, R., Paulsson, M. & Maurer, P. Calcium affinity, cooperativity, and domain interactions of extracellular EF-hands present in BM-40. *J. Biol. Chem.* **275**, 25508–25515 (2000).
 119. Zhang, F. *et al.* Downregulation of SPARC expression decreases cell migration and invasion involving epithelial-mesenchymal transition through the p-FAK/p-ERK pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cancer* **11**, 414–420 (2020).
 120. Thomas, R., True, L. D., Bassuk, J. A., Lange, P. H. & Vessella, R. L. Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 1140–1149 (2000).
 121. Schultz, C., Lemke, N., Ge, S., Golembieski, W. A. & Rempel, S. A. Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes glioma invasion and delays tumor growth in vivo. *Cancer Res.* **62**, 6270–6277 (2002).
 122. Nishie, A. *et al.* High expression of the Cap43 gene in infiltrating macrophages of human renal cell carcinomas. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7**, 2145–2151 (2001).

123. Shi, S. *et al.* Prognostic Significance of SPARC Expression in Breast Cancer: A Meta-Analysis and Bioinformatics Analysis. *Biomed Res. Int.* **2022**, (2022).
124. Kos, K. & Wilding, J. P. H. SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol.* **6**, 225–235 (2010).
125. Huminiecki, L. *et al.* Emergence, development and diversification of the TGF-signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol. Biol.* **9**, 1–17 (2009).
126. Massagué, J. TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616–630 (2012).
127. Massagué, J. TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791 (1998).
128. Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* **2009** *191* **19**, 128–139 (2008).
129. Schmierer, B. & Hill, C. S. TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 970–982 (2007).
130. Francki, A. *et al.* SPARC regulates TGF- β 1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J. Cell. Biochem.* **91**, 915–925 (2004).
131. Sun, W. *et al.* SPARC acts as a mediator of TGF- β 1 in promoting epithelial-to-mesenchymal transition in A549 and H1299 lung cancer cells. *BioFactors* **44**, 453–464 (2018).
132. Bao, J. M. *et al.* SPARC is a key mediator of TGF- β -induced renal cancer metastasis. *J. Cell. Physiol.* **236**, 1926–1938 (2021).
133. Xu, J., Xu, X. & Verstraete, W. Adaptation of E. coli cell method for micro-scale nitrate measurement with the Griess reaction in culture media. *J. Microbiol. Methods* **41**, 23–33 (2000).
134. Sakurai-Yageta, M. *et al.* The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J. Cell Biol.* **181**, 985 (2008).
135. Lodillinsky, C. *et al.* p63/MT1-MMP axis is required for in situ to invasive transition

- in basal-like breast cancer. *Oncogene* **35**, 344–357 (2016).
136. Teullière, J. *et al.* Targeted activation of B-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* **132**, 267–277 (2005).
 137. Salgado, R. *et al.* The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **26**, 259–271 (2015).
 138. Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nat. 2012 4907418* **490**, 61–70 (2012).
 139. Daemen, A. *et al.* Modeling precision treatment of breast cancer. *Genome Biol.* **14**, (2013).
 140. Kleinert, H., Schwarz, P. M. & Förstermann, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol. Chem.* **384**, 1343–1364 (2003).
 141. Welsh, J. E. Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Anim. Model. Study Hum. Dis.* 997–1018 (2013) doi:10.1016/B978-0-12-415894-8.00040-3.
 142. Bernátová, I., Pecháňová, O., Pelouch, V. & Šimko, F. Regression of chronic L-NAME-treatment-induced left ventricular hypertrophy: Effect of captopril. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**, 177–185 (2000).
 143. Gil Del Alcazar, C. R. *et al.* Immune Escape in Breast Cancer During In Situ to Invasive Carcinoma Transition. *Cancer Discov.* **7**, 1098–1115 (2017).
 144. Brownh, P. D., Wakefiel, L. M., Levinson, A. D. & Sporn, M. B. Physicochemical Activation of Recombinant Latent Transforming Growth Factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors* **3**, 35–43 (1990).
 145. Krasnapolski, M. A. Rol de la celula mioepitelial y su interaccion con el epitelio luminal en la progresion del cancer de mama. (Facultad de Ciencias Exactas y naturales - Universidad de Buenos Aires, 2009).

146. Like, B. & Massague, J. The antiproliferative effect of type beta transforming growth factor occurs at a level distal from receptors for growth-activating factors. *J. Biol. Chem.* **261**, 13426–13429 (1986).
147. Inman, G. J. *et al.* SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-B superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **62**, 65–74 (2002).
148. Lo, P. K. *et al.* Tumor-associated myoepithelial cells promote the invasive progression of ductal carcinoma in situ through activation of TGFB signaling. *J. Biol. Chem.* **292**, 11466–11484 (2017).
149. Moses, H. & Barcellos-Hoff, M. H. TGF-B Biology in Mammary Development and Breast Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a003277 (2011).
150. Herbertz, S. *et al.* Clinical development of galunisertib (Ly2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 4479–4499 (2015).
151. Zagami, P. & Carey, L. A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *npj Breast Cancer* **2022 81 8**, 1–10 (2022).
152. Luo, J. D. & Chen, A. F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 259–264 (2005).
153. Xue, Q., Yan, Y., Zhang, R. & Xiong, H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
154. Lundberg, J. O. & Weitzberg, E. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell* **185**, 2853–2878 (2022).
155. Puricelli, L., Colombo, L. L., Gomez, D. E., Vidal del, M. C. C. & Bal de Kier Joffe, E. Characterization of a new murine tumor variant with different in vivo behavior selected by its adhesive properties. *Tumori* **76**, 345–349 (1990).
156. Glynn, S. A. *et al.* Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor–negative breast cancer patients. *J. Clin. Invest.* **120**, 3843 (2010).

157. Benoy, I. H. *et al.* Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7157–7162 (2004).
158. Yao, C. *et al.* Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Int. J. Cancer* **121**, 1949–1957 (2007).
159. Griffith, O. W. & Kilbourn, R. G. Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods Enzymol.* **268**, 375–392 (1996).
160. Mühl, H. & Pfeilschifter, J. Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1 beta-stimulated rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* **95**, 1941 (1995).
161. Pérez-Sala, D., Cernuda-Morollón, E., Díaz-Cazorla, M., Rodríguez-Pascual, F. & Lamas, S. Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/cGMP pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**, (2001).
162. Simão, S., Agostinho, R. R., Martínez-Ruiz, A. & Araújo, I. M. Regulation of Ras Signaling by S-Nitrosylation. *Antioxidants 2023, Vol. 12, Page 1562* **12**, 1562 (2023).
163. Martínez-Ruiz, A., Cadenas, S. & Lamas, S. Nitric oxide signaling: Classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 17–29 (2011).
164. Carreira, B. P. *et al.* Nitric oxide stimulates the proliferation of neural stem cells bypassing the epidermal growth factor receptor. *Stem Cells* **28**, 1219–1230 (2010).
165. Alexander, J. & Cukierman, E. Stromal dynamic reciprocity in cancer: intricacies of fibroblastic-ECM interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **42**, 80–93 (2016).
166. Cirri, P. & Chiarugi, P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 195–208 (2012).
167. De Wever, O., Van Bockstal, M., Mareel, M., Hendrix, A. & Bracke, M. Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **25**, 33–46 (2014).

168. Han, Y., Zhang, Y., Jia, T. & Sun, Y. Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts. *Tumour Biol.* **36**, 1385–1394 (2015).
169. Mezawa, Y. & Orimo, A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell Tissue Res.* **365**, 675–689 (2016).
170. Özdemir, B. C. *et al.* Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates páncreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* **25**, 719–734 (2014).
171. Rhim, A. D. *et al.* Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **25**, 735–747 (2014).
172. Yang, D., Liu, J., Qian, H. & Zhuang, Q. Cancer-associated fibroblasts: from basic science to anticancer therapy. *Exp. Mol. Med.* **55**, 1322–1332 (2023).
173. Vedenko, A., Panara, K., Goldstein, G., Ramasamy, R. & Arora, H. Tumor Microenvironment and Nitric Oxide: Concepts and Mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1277**, 143–158 (2020).
174. Molon, B. *et al.* Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1949–1962 (2011).
175. Lodillinsky, C. *et al.* Bacillus Calmette Guerin Induces Fibroblast Activation Both Directly and through Macrophages in a Mouse Bladder Cancer Model. *PLoS One* **5**, e13571 (2010).
176. Langle, Y. V. *et al.* Effect of nitric oxide inhibition in Bacillus Calmette-Guerin bladder cancer treatment. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **98**, 50–59 (2020).
177. Lal, A. *et al.* FOXP3-positive regulatory T lymphocytes and epithelial FOXP3 expression in synchronous normal, ductal carcinoma in situ, and invasive cancer of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 381–390 (2013).
178. Kim, M. *et al.* Immune microenvironment in ductal carcinoma in situ: A comparison with invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* **22**, 1–12 (2020).

179. Toss, M. S. *et al.* The prognostic significance of immune microenvironment in breast ductal carcinoma in situ. *Br. J. Cancer* **122**, 1496–1506 (2020).
180. Jones, C. *et al.* Expression Profiling of Purified Normal Human Luminal and Myoepithelial Breast Cells: Identification of Novel Prognostic Markers for Breast Cancer. *Cancer Res.* **64**, 3037–3045 (2004).
181. Sirka, O. K., Shamir, E. R. & Ewald, A. J. Myoepithelial cells are a dynamic barrier to epithelial dissemination. *J. Cell Biol.* **217**, 3368–3381 (2018).
182. Gudjonsson, T. *et al.* Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J. Cell Sci.* **115**, 39–50 (2002).
183. Afify, S. M. *et al.* Cancer stem cells as the source of tumor associated myoepithelial cells in the tumor microenvironment developing ductal carcinoma in situ. *Biomaterials* **301**, (2023).
184. Shipitsin, M. *et al.* Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* **11**, 259–273 (2007).
185. Gajdos, C. *et al.* Mammographic appearance of nonpalpable breast cancer reflects pathologic characteristics. *Ann. Surg.* **235**, 246–251 (2002).
186. De Roos, M. A., Van Der Vegt, B., De Vries, J., Wesseling, J. & De Bock, G. H. Pathological and Biological Differences Between Screen-Detected and Interval Ductal Carcinoma in situ of the Breast. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 2097 (2007).
187. Rebbeck, C. A. *et al.* Gene expression signatures of individual ductal carcinoma in situ lesions identify processes and biomarkers associated with progression towards invasive ductal carcinoma. *Nat. Commun.* **13**, (2022).
188. Motamed, K. & Sage, E. H. SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway. *J. Cell. Biochem.* **70**, 543–552 (1998).
189. Murphy-Ullrich, J. E., Lane, T. F., Pallero, M. A. & Sage, E. H. SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the

- Ca(2+)-binding EF-hand. *J. Cell. Biochem.* **57**, 341–350 (1995).
190. Clark, C. J. & Sage, E. H. A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment--where there's SPARC, there's fire. *J. Cell. Biochem.* **104**, 721–732 (2008).
191. Nagaraju, G. P., Dontula, R., El-rayes, B. F. & Lakka, S. S. Molecular mechanisms underlying the divergent roles of SPARC in human carcinogenesis. *Carcinogenesis* **35**, 967–973 (2014).
192. Szynglarewicz, B. *et al.* Ductal carcinoma in situ on stereotactic biopsy of suspicious breast microcalcifications: Expression of SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) can predict postoperative invasion. *J. Surg. Oncol.* **114**, 548–556 (2016).
193. McClung, H. M. *et al.* SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neurosci. Lett.* **419**, 172–177 (2007).
194. Gilles, C. *et al.* SPARC/Osteonectin Induces Matrix Metalloproteinase 2 Activation in Human Breast Cancer Cell Lines¹. *Cancer Res.* **58**, 5529–5536 (1998).
195. Wang, C. *et al.* SPOCK2 modulates neuropathic pain by interacting with MT1-MMP to regulate astrocytic MMP-2 activation in rats with chronic constriction injury. *J. Neuroinflammation* **21**, (2024).
196. Bradshaw, A. D. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 480–488 (2012).
197. Schiemann, B. J., Neil, J. R. & Schiemann, W. P. SPARC Inhibits Epithelial Cell Proliferation in Part through Stimulation of the Transforming Growth Factor- β -Signaling System. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3977 (2003).
198. Rivera, L. B., Bradshaw, A. D. & Brekken, R. A. The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3165–3173 (2011).
199. Zhang, Y., Alexander, P. B. & Wang, X. F. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).

200. Yamazaki, T. *et al.* Galunisertib plus neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer: a single-arm, phase 2 trial. *Lancet. Oncol.* **23**, 1189–1200 (2022).
201. Study Details | Galunisertib and Paclitaxel in Treating Patients With Metastatic Androgen Receptor Negative (AR-) Triple Negative Breast Cancer | ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02672475>.

