



## TESIS DE DOCTORADO

**Regulación por esteroides ováricos de la proliferación y de la apoptosis en cáncer de colon en comparación al cáncer mamario**

### DOCTORANDO

**Corina Verónica Sasso**

Lic. en Biología Molecular  
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia  
Universidad Nacional de San Luis

### DIRECTOR DE TESIS

**Dr. Rubén Carón**  
Investigador Independiente  
CONICET

Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer  
Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)  
Centro Científico y Tecnológico Mendoza (CCT - Mendoza)  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)  
Mendoza, Argentina 2016



*A mis padres por el cariño y el apoyo de siempre*

*A los hombrecitos que iluminan mis días*

## Agradecimientos

*Al Dr. Carón por acompañarme en este camino. Por brindarme su asesoramiento científico, su apoyo incondicional y sobretodo por su buena predisposición, cariño y humildad.*

*Al IMBECU por ofrecerme el lugar para formarme, para seguir creciendo y aprendiendo. Gracias por permitirme conocer a las excelentes personas que lo conforman. Especialmente al grupo del Lab 4, por ser tan buenas compañeras y estar siempre cuando las necesité: a Cotí, Euge, Flavia S, Virginia, Leila, Fiore y Flavia B ¡Son de oro chicas! Sin ustedes este logro personal no habría sido posible. También a Eduardo, Diego y Vicky por su buena onda y por compartir la oficinita día a día en estos 6 años.*

*A todos los investigadores, especialmente a Graciela, Belén, Carlos, Marta, Susana, Mariel, Niubys, Laura y Silvína, por sus consejos y asistencia cuando lo necesité.*

*A todos los becarios, sobre todo a Gise C, Mage, Mayra, Gise P, Andrés, Daiana, Guille, Esteban, Flavia, Romí, Jose y Belén por los momentos compartidos.*

*A Darío y Elisa por su asesoramiento y ayuda en los experimentos. A Elina, Juan y Orlando por su colaboración con los animales y su buena predisposición de siempre. A Patricia por su paciencia y apoyo de todos los días en cuanto a las cuestiones administrativas, y no tanto.*

*A los amigos por estar presentes siempre, y por comprender cuando no podía ir a las juntas porque “estaba con la tesis”: Stefi, Cotí, Juli, Seba, Martí, Cele, Matí.*

*Al CONICET por haberme brindado el apoyo financiero para poder realizar esta tesis. Y a PROBIOL por haberme asesorado durante todo el doctorado, y permitido llegar a esta instancia.*

*A mis padres, por ser siempre tan incondicionales y apoyarme en todo lo que hago. Gracias por haberme dejado volar y cumplir este*

*sueño. A toda mi familia: mis hermanos, cuñadas y sobrinos por ser tan maravillosas personas y brindarme la familia tan linda que tengo.*

*A mi amor, compañero y colega por el aguante de siempre. Gracias por ser mi pilar en los momentos más difíciles. Gracias por escucharme, aconsejarme y acompañarme durante todo este camino. Sin tu aliento esto no podría haber sido posible.*

*Y al amor más puro que conocí hace un par de años, mi hijo, por enseñarme que el amor no tiene límites y por ser la fuerza que me permitió culminar este trabajo.*

**ÍNDICE****CONTENIDO**

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN DE TESIS.....	II
ABSTRACT .....	III
CAPÍTULO I .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
Esteroides ováricos .....	1
17 $\beta$ -estradiol .....	2
Receptores de estrógenos.....	4
Progesterona.....	6
Receptores de progesterona.....	7
Menopausia y terapia de reemplazo hormonal.....	8
CAPÍTULO II .....	10
CÁNCER DE COLON.....	10
Epidemiología.....	10
Clasificación de tumores de colon .....	11
Marcadores tumorales.....	13
Modelos de carcinogénesis de colon en animales.....	17
Participación de los esteroides ováricos en el cáncer de colon .....	18
Receptores de estrógenos.....	19
Receptores de progesterona.....	20
CAPÍTULO III .....	22
CÁNCER DE MAMA.....	22
Epidemiología.....	22
Clasificación de tumores de mama .....	23
Marcadores tumorales.....	23
Modelos de carcinogénesis de mama en animales.....	24
Participación de los esteroides ováricos .....	25
Receptores de estrógenos.....	26

Receptores de progesterona.....	27
Regulación cruzada entre receptores esteroidales.....	28
CAPÍTULO IV .....	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
Objetivo general .....	30
Objetivos específicos.....	30
CAPÍTULO V .....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Modelo animal de cáncer de colon.....	31
Modelo animal de cáncer de mama.....	33
Determinación de concentración hormonal .....	35
Análisis histológico .....	35
Inmunohistoquímica .....	36
Aislamiento de proteínas .....	37
Electroforesis en gel y transferencia a membrana (SDS-PAGE y Western Blot) .....	37
Cultivos celulares.....	38
Análisis Estadístico .....	39
CAPÍTULO VI .....	40
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°1 .....	40
RESULTADOS .....	40
Las dosis administradas de 17- $\beta$ -estradiol y progesterona correspondientes a la terapia de reemplazo hormonal se encuentran dentro de los valores fisiológicos .....	40
El tratamiento hormonal no influye en la incidencia tumoral de colon .....	43
El tratamiento combinado de E2+P4 retardó el día de sacrificio.....	44
El tratamiento hormonal no afecta la sobrevida libre de tumor .....	45
El tratamiento hormonal no produce cambios en el número de tumores .....	46
El volumen de los tumores es aumentado por el tratamiento con E2 .....	47
El tratamiento con E2 produce tumores más pesados .....	48
La densidad tumoral es similar en todos los tratamientos .....	49
Los tumores fueron clasificados en su mayoría como adenocarcinomas.....	50
Los tumores del grupo E2+P4 presentan menor índice mitosis/apoptosis .....	51
El tratamiento con E2+P4 disminuye la expresión de PCNA.....	53
El tratamiento combinado aumenta la expresión de caspasa 3 .....	56

El tratamiento con E2+P4 aumenta la expresión de PARP clivado .....	58
La apoptosis en el tratamiento combinado no es llevada a cabo por la vía intrínseca .....	60
El tratamiento E2+P4 produce apoptosis por la vía extrínseca .....	62
El tratamiento con E2 aumenta la expresión del RE $\alpha$ .....	62
El tratamiento con E2+P4 aumenta la expresión del RE $\beta$ .....	64
El tratamiento con E2 induce la expresión del receptor de progesterona .....	66
CAPÍTULO VII .....	69
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°2 .....	69
RESULTADOS .....	69
Las dosis administradas de 17- $\beta$ -estradiol y progesterona correspondientes a la terapia de reemplazo hormonal se encuentran dentro de los valores fisiológicos .....	69
El tratamiento con E2 aumenta la incidencia de tumores mamarios .....	72
La latencia tumoral tiende a ser menor en el grupo SHAM.....	73
El tratamiento sólo con P4 aumenta la sobrevida libre de tumor .....	74
El tratamiento con E2 aumenta la multiplicidad de tumores mamarios .....	75
El volumen de los tumores mamarios tiende a ser mayor en el tratamiento con P4.....	76
El tratamiento con P4 produce tumores más pesados .....	77
La densidad tumoral es similar en todos los tratamientos .....	78
Los tumores fueron clasificados como carcinomas de mama ductales.....	79
Los tumores provenientes de ratas con el tratamiento combinado crecen más rápido .....	80
Los tumores del grupo P4 presentan mayor índice mitosis/apoptosis.....	80
Los tumores provenientes del tratamiento combinado proliferan menos.....	82
El tratamiento combinado tiende a aumentar la expresión de caspasa 3 total .....	85
Los tumores del grupo E2+P4 presentan una menor relación Bax/Bcl-2 .....	87
El tratamiento con E2 aumenta la expresión del RE $\alpha$ en los tumores mamarios.....	89
No hay diferencias en la expresión del RE $\beta$ en los tumores mamarios según los diferentes tratamientos hormonales .....	91
El tratamiento con P4 no modifica la expresión de sus receptores en los tumores mamarios	93
CAPÍTULO VIII .....	96
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°3 .....	96
RESULTADOS .....	96
Los efectos de los esteroides ováricos sobre la carcinogénesis son diferentes entre el modelo experimental de cáncer de colon y el de cáncer de mama.....	96

Los esteroides ováricos producen diferentes comportamientos tumorales entre ambos modelos experimentales.....	97
Los esteroides ováricos regulan la expresión de sus receptores de manera diferente en ambos modelos experimentales.....	97
CAPÍTULO IX .....	98
RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°4 .....	98
RESULTADOS .....	98
El tratamiento con $10^{-11}$ M de E2 aumenta la proliferación de las células HCT116.....	98
El tratamiento con $10^{-7}$ M de E2 aumenta la proliferación de las células SW480 .....	100
El tratamiento con P4 no aumenta la proliferación de las células HCT116 .....	101
El tratamiento con P4 no aumenta la proliferación de las células SW480 .....	102
El tratamiento con E2 aumenta la proliferación en las células HCT116 .....	103
El tratamiento con E2 aumenta proliferación en las células SW480 .....	104
CAPÍTULO X .....	105
DISCUSIÓN.....	105
Establecimiento de un modelo animal de menopausia humana.....	105
Esteroides ováricos y epidemiología de cáncer de colon .....	106
Esteroides ováricos naturales y su efecto en la biología del cáncer de colon .....	107
Receptores de los esteroides ováricos y cáncer de colon.....	109
Acción de los esteroides ováricos naturales en modelos de cáncer de colon in vitro.....	111
Acción de los esteroides ováricos naturales en cáncer de mama.....	112
Esteroides ováricos naturales y epidemiología de cáncer de mama .....	113
Esteroides ováricos naturales y su efecto en la progresión del cáncer de mama .....	114
Receptores de los esteroides ováricos y cáncer de mama .....	115
CONCLUSIONES GENERALES .....	117
PERSPECTIVAS .....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	119

**ABREVIATURAS**

**DMBA** 7,12-dimetilbenzantraceno

**DMH** 1,2-dimetilhidracina

**E2** 17- $\beta$  estradiol

**OVX** ovariectomía

**P4** progesterona

**RE** receptor de estrógeno

**RE $\alpha$**  receptor de estrógeno alfa

**RE $\beta$**  receptor de estrógeno beta

**RP4** receptor de progesterona

**RP4-A** receptor de progesterona A

**RP4-B** receptor de progesterone B

**SHAM** operación simulada de ovariectomía

**V** vehículo

## **RESUMEN DE TESIS**

Estudios epidemiológicos describen a los estrógenos como protectores en el desarrollo de cáncer de colon en mujeres postmenopáusicas tratadas con terapia de reemplazo hormonal, pero los mecanismos responsables de esta protección se desconocen. Además, el rol de progesterona ha sido mínimamente estudiado y los resultados son controversiales. Por otro lado, el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas está asociado positivamente con los niveles circulantes de esteroides ováricos. Por lo antedicho, el objetivo general de esta tesis fue estudiar los mecanismos responsables de la protección hormonal ejercida por los esteroides ováricos sobre el cáncer de colon y su regulación diferencial con el cáncer de mama. Para ello se utilizaron ratas Sprague Dawley expuestas a los carcinógenos 1,2-dimetilhidracina (colon) y 7,12-dimetilbenzantraceno (mama). Luego fueron ovariectomizadas y tratadas con estradiol (E2, 60 µg/kg), progesterona (P4, 10 mg/kg) y E2+P4 (60 µg/kg y 10 mg/kg). Se demostró que el tratamiento con E2 y P4 no previno el desarrollo tumoral de colon. El tratamiento con E2+P4 produjo una disminución en la expresión de PCNA, un aumento del índice apoptótico y una mayor expresión de caspasa 3, PARP clivado y REβ en los tumores, no observándose estos resultados para los tratamientos hormonales individuales. Se concluyó que E2+P4 reducen la proliferación y aumentan la apoptosis en los tumores de colon a través de la acción del REβ. Por otro lado, en el experimento de cáncer de mama se demostró que E2 es necesario para promover el desarrollo tumoral, pero P4 modula a la baja sus efectos. La expresión disminuida de PCNA en los tumores por E2+P4 se condice con un mayor índice apoptótico, una tendencia a mayor expresión de caspasa 3 y menor expresión Bax/Bcl-2. Además, E2+P4 provocó una baja relación de las isoformas de los RE. Esto podría indicar que los efectos apoptóticos ejercidos por E2+P4 son conducidos por el REβ en los tumores de mama. Se concluye que E2 y P4 natural tienen una participación activa y moduladora sobre la carcinogénesis de colon y de mama. Cuando son administrados de manera individual, sus efectos son diferentes entre el modelo experimental de cáncer de colon y de mama. En cambio, su acción conjunta produce efectos antiproliferativos en ambos tipos de tumores, demostrando un efecto protector de E2 y P4 natural que sería conducido por REβ.

**ABSTRACT**

Epidemiological studies describe estrogens as protectors in the development of colon cancer in postmenopausal women treated with hormone replacement therapy, but the mechanisms responsible for this protection are unknown. In addition, the role of progesterone has been minimally studied and the results are controversial. On the other hand, the risk of breast cancer in postmenopausal women is positively associated with circulating levels of ovarian steroids. For the above, the general objective of this thesis was to study the mechanisms responsible for the hormonal protection exerted by ovarian steroids on colon cancer and its differential regulation with breast cancer. Sprague Dawley rats were exposed to carcinogens 1,2-dimethylhydrazine (for colon cancer model) and 7,12-dimethylbenzanthracene (for breast cancer model). Then, the rats were ovariectomized and treated with estradiol (E2, 60 µg/kg), progesterone (P4, 10 mg/kg) and E2+P4 (60 µg/kg and 10 mg/kg). The treatment with E2 and P4 did not prevent colon tumor development. Treatment with E2+P4 resulted in a decrease in PCNA expression, an increase in the apoptotic index and a higher expression of caspase 3, cleaved PARP and ERβ in the tumors, and these results were not observed for individual hormonal treatments. We concluded that E2+P4 reduce proliferation and increase apoptosis in colon tumors through ERβ action. On the other hand, the breast cancer experiment showed that E2 is necessary to promote tumor development, but P4 downregulates this effect. Decreased expression of PCNA in tumors by E2+P4 is associated with a higher apoptotic index, a tendency for greater expression of caspase 3 and lower Bax/Bcl-2 expression. Furthermore, E2+P4 caused a low ERα/ERβ ratio. This may indicate that the apoptotic effects exerted by E2+P4 are driven by ERβ in breast tumors. We conclude that natural E2 and P4 have an active and modulating role in colon and breast carcinogenesis. When administered individually, their effects are different between the colon and breast cancer experimental models. In contrast, their joint action produces antiproliferative effects in both types of tumors, demonstrating a protective effect of natural E2 and P4 that would be driven by ERβ.

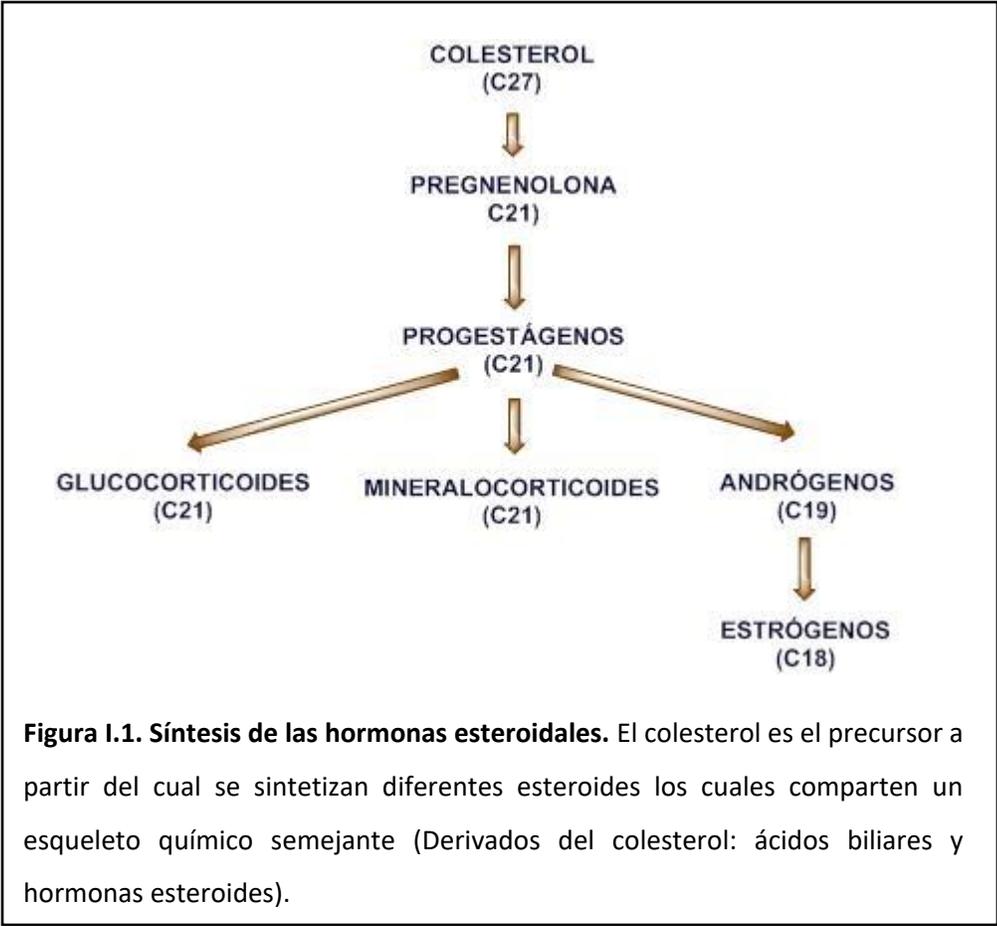
## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

Los procesos biológicos están mediados por señales de comunicación, entre ellas las hormonas que son sustancias químicas que regulan la actividad de células y órganos. Las hormonas se secretan desde las células en que son producidas o almacenadas hacia el torrente sanguíneo, y así viajan a distancia pudiendo alcanzar las células que son blanco de su acción, dentro del organismo. Estas células poseen receptores específicos que permiten la unión de la hormona y de esta manera se desencadena su efecto. Por ello son esenciales en la regulación y coordinación de numerosos procesos fisiológicos, que comprenden desde cambios metabólicos hasta la reproducción y el crecimiento entre otros (Curtis 2008). Esta tesis se centrará en el estudio de las hormonas sexuales femeninas, las cuales serán definidas como esteroides ováricos durante el desarrollo de la misma.

#### **Esteroides ováricos**

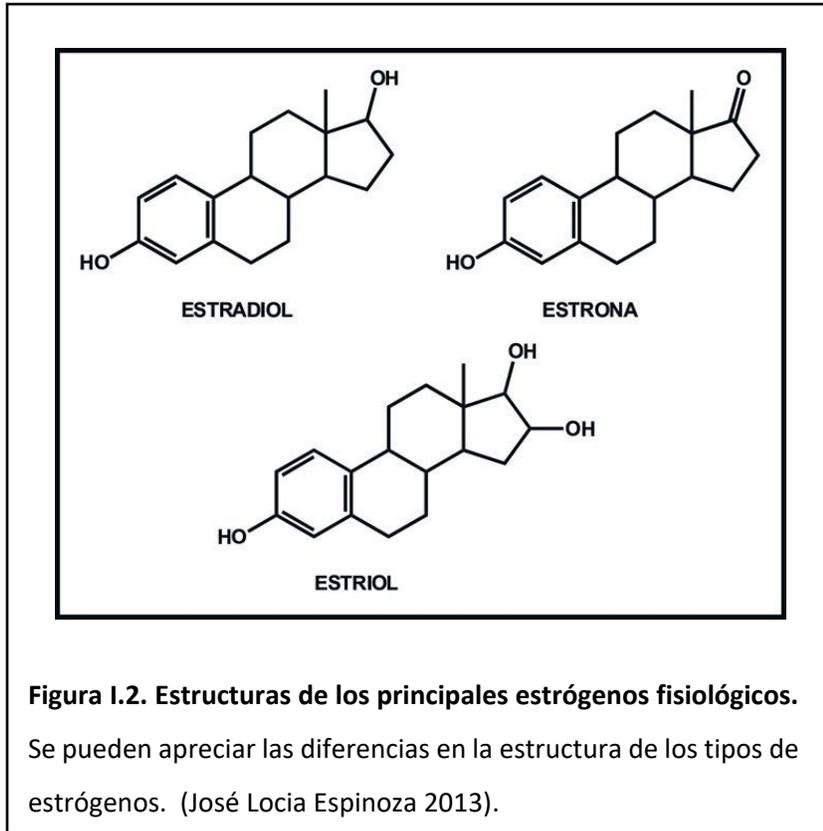
La producción de los esteroides se inicia en la vida fetal y se continúa durante la infancia a bajos niveles hasta llegar a la pubertad (Pombo Arias 1997). Éstos son producidos en el ovario, fundamentalmente en las estructuras foliculares y en los cuerpos lúteos. El ovario sintetiza y secreta 3 grupos de esteroides, tal cual se muestra en la figura I.1: andrógenos (C-19 esteroides), estrógenos (C-18 esteroides) y progestágenos (C-21 esteroides) a partir de colesterol, concretamente el proveniente de las lipoproteínas de baja densidad o LDL (Llusiá 1995).



Dentro de los diversos esteroides ováricos que existen, los principales son el 17β-estradiol y la progesterona los cuales son de interés para esta tesis y serán descritos a continuación.

**17β-estradiol**

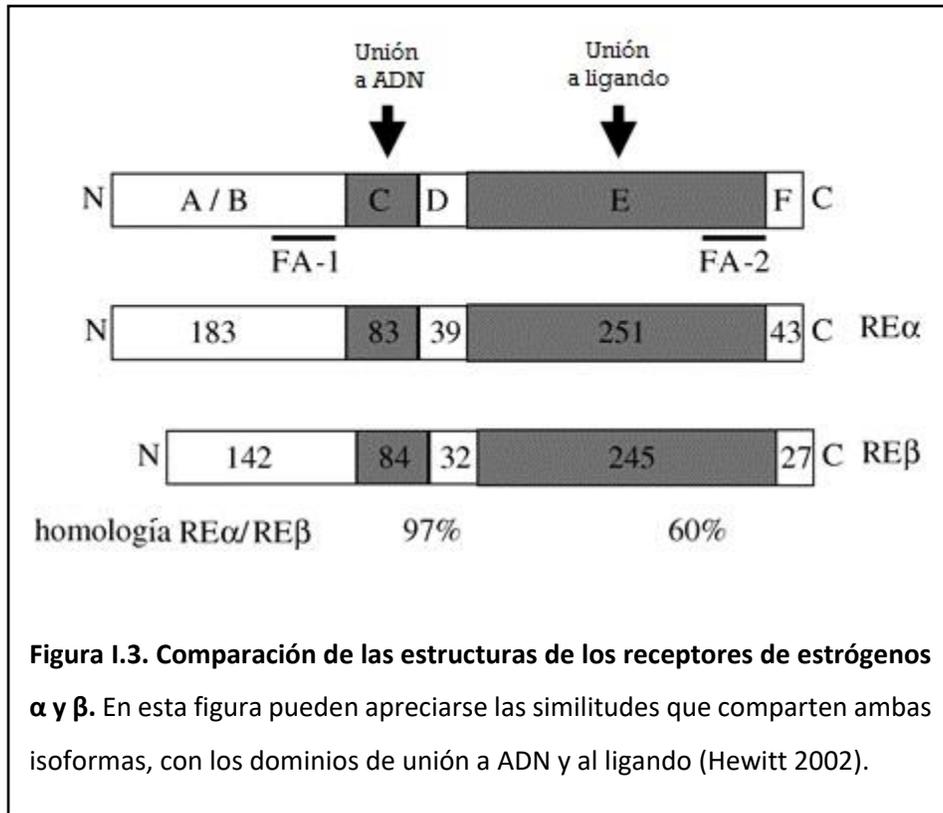
Existen tres tipos de estrógenos principales: 17β-estradiol (E2), estrona y estriol (figura I.2). Dentro de ellos, el E2 es el más abundante y es sintetizado principalmente en el ovario mientras que en mujeres postmenopáusicas su producción se da en tejidos extragonadales. En cambio, la estrona tiene como fuente principal a los tejidos periféricos, en tanto que el estriol se produce mayormente en el hígado. Los estrógenos también se producen en cantidades menores en glándulas adrenales y tejido adiposo (José Locía Espinoza 2013).



Entre los efectos de los estrógenos se encuentran el control en los depósitos de grasa corporal, el desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria, la estimulación de la proliferación celular del útero, las trompas de Falopio, el epitelio vaginal y la maduración de los ovarios. También se encuentran implicados en el control de la conducta sexual femenina a nivel del sistema nervioso central. Por otro lado, además de participar en la función reproductiva, los estrógenos son necesarios para el mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico y de la masa ósea, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, y participan en aspectos relacionados con la fisiología vascular siendo factores cardioprotectores, entre otras funciones (Peter Vrtačnik 2014). Los estrógenos también influyen procesos patológicos de enfermedades hormono-dependientes tales como cáncer de mama, endometrio, colon y ovario (Matthews 2003). Concretamente el E2 regula todos estos procesos primero a través de la difusión de la membrana plasmática de las células blanco y luego por la señalización de receptores específicos intracelulares.

## Receptores de estrógenos

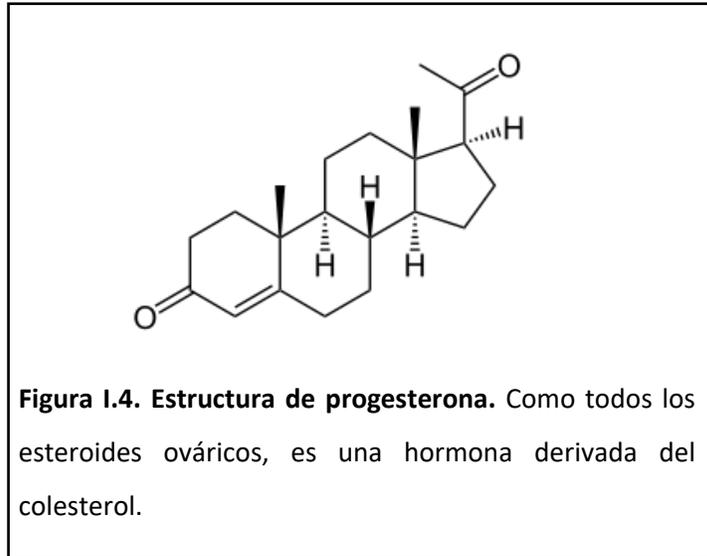
Las acciones biológicas del E2 son mediadas por la unión a sus receptores, los cuales poseen dos isoformas: alfa ( $RE\alpha$ ) o beta ( $RE\beta$ ). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y tienen un alto grado de homología en sus secuencias y en su estructura tridimensional. Están compuestos de seis dominios funcionales, cada uno con funciones autónomas, tal como se muestra en la figura I.3: la porción N-terminal (dominio A/B) juega un rol en las interacciones proteína-proteína y en la activación de la transcripción de genes; el dominio de unión a ADN (dominio C) dirige la dimerización del receptor y la unión al ADN en los promotores que contienen el elemento de respuesta a estrógenos (ERE); el dominio D que funciona como una bisagra y contribuye a la dimerización del receptor; el dominio C-terminal contiene el dominio de unión a ligando (dominio E) que une E2 y coopera con el dominio A/B para sincronizar la transcripción de genes; y por último el dominio F que puede modular la actividad transcripcional. Además, se han identificado dos funciones activadoras de la transcripción (FAs): la región FA-1 está localizada en la porción N-terminal y es capaz de regular la transcripción de genes basados en ERE, aún en ausencia de ligando. La región FA-2 situada en la región C-terminal media la activación transcripcional dependiente de ligando por la unión de E2. Ambos FAs coordinan la expresión de genes dictando el patrón de asociación de los RE, ya sea con co-activadores o co-represores (Acconcia 2011).



Ambas isoformas del receptor pueden llevar a cabo sus acciones tanto por efectos genómicos como no-genómicos, y esto depende de la localización intracelular de los receptores. Para la activación de la vía genómica, la unión de E2 provoca la translocación de los receptores al núcleo, donde ocurre la transcripción génica de ERE. En cambio, en la activación de la vía no-genómica, E2 produce una señalización rápida e involucra la activación de varias vías de transducción de señales tales como PLC/PKC; Src/ERK, PI3K/AKT, p38/MAPK; JAK/STAT, etc. La naturaleza de estas vías y el papel que desempeñan en la función celular difieren entre el RE $\alpha$  y el RE $\beta$ . En particular, las señales rápidas generadas del complejo E2-RE $\alpha$  conducen a la célula al ciclo celular y representan la principal determinante de los efectos proliferativos y de supervivencia del E2. En contraste, los efectos rápidos generados por el complejo E2-RE $\beta$  sacan a la célula del ciclo celular, representando la clave para entender los efectos antiproliferativos inducidos por el E2 (Acconcia et al. 2005; Bardin et al. 2004).

## Progesterona

La progesterona (P4, figura I.4) es producida por el ovario bajo la influencia de las hormonas hipotálamo-hipofisarias (hormona folículo-estimulante y hormona luteinizante), principalmente por el cuerpo amarillo que se forma durante la segunda mitad del ciclo menstrual; y a partir del tercer mes del embarazo, por la placenta.

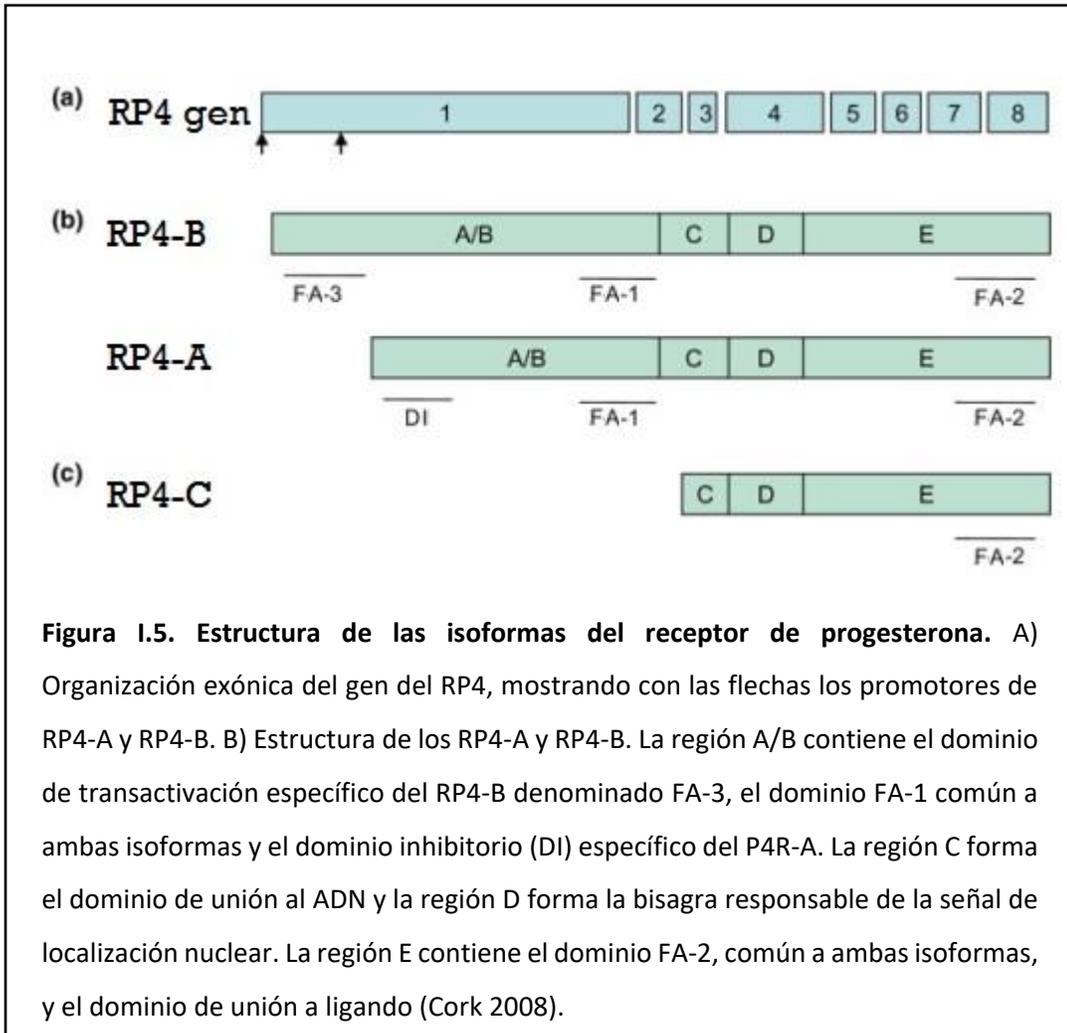


La secreción de la P4 comienza antes de la ovulación, desde el folículo destinado a la liberación del óvulo. Cuando no se produce el embarazo, el cuerpo lúteo involuciona, disminuyen los niveles de P4 y comienza la menstruación. Si el óvulo es fertilizado, el trofoblasto comienza a secretar una hormona conocida como gonadotropina coriónica humana en la circulación materna, prolongando así la vida funcional del cuerpo lúteo. A partir de la segunda o tercera semana del embarazo, la placenta en desarrollo secreta estrógenos y P4 en colaboración con las glándulas suprarrenales fetales y entonces el cuerpo lúteo ya no es esencial para que prosiga la gestación. La placenta continúa produciendo estrógenos y P4 en gran cantidad hasta el momento del parto. Esta hormona ejerce una multiplicidad de acciones biológicas en sus tejidos blanco, previamente sensibilizados por los estrógenos. La síntesis de la progesterona comienza con la conversión del colesterol a pregnenolona por el citocromo P 450. Una vez sintetizada la pregnenolona,

esta puede tomar dos rutas protagonizadas por enzimas diferentes: la 3βHSD (3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa), que la convierte en P4 o la 17α-hidroxilasa (P450c17), que la convierte en 17α- hidroxipregnenolona (Orizaba-Chávez 2013).

**Receptores de progesterona**

Los efectos de P4 se producen luego de la unión de la hormona con su receptor intracelular (RP4). Este existe en dos isoformas, tal como se muestra en la figura I.5. Dichas isoformas difieren estructuralmente por la inclusión de un segmento N-terminal en la isoforma larga P4R-B. Esta región denominada segmento B está ausente en la forma corta P4R-A.



Las dos isoformas son codificadas por el mismo gen y generalmente son co-expresadas. El RP4-B es un potente activador de genes dependientes de P4 en diferentes células, mientras que RP4-A es un débil activador de estos genes. Cuando ambas isoformas del receptor están activadas, la isoforma A actúa como inhibidor de la acción de la isoforma B, disminuyendo el efecto de P4 en las células blanco (Rękawiecki et al. 2011).

El RP4 es miembro de la superfamilia de receptores nucleares y es un efector importante producto de la activación de los RE; en la mayoría de los casos E2 es requerido para la expresión de RP4. Adicionalmente, son necesarias las interacciones de los RP4 con co-activadores y represores transcripcionales para la función de factor de transcripción de estos receptores. Además, pueden sufrir modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, acetilaciones y ubiquitinaciones que pueden alterar su funcionamiento y localización. Estos receptores tienen dos mecanismos de acción: la vía genómica clásica, donde median la transcripción a través de la interacción con elementos de respuesta a P4 presentes en el ADN; y la vía no-genómica que es llevada a cabo por receptores presentes en la membrana plasmática. Dentro de los efectos no genómicos de P4 que se han descrito están los cambios en el flujo de iones y calcio intracelular y la rápida y transitoria activación de la vía MAPK, entre otros segundos mensajeros. Sin embargo, las interacciones directas de los RP4 con componentes de la vía no-genómica y subsecuente activación de vías de señalización son integradas con las acciones genómicas.

### **Menopausia y terapia de reemplazo hormonal**

La menopausia es una condición endocrina provocada por la disminución de la actividad ovárica, la cual ocurre en todas las mujeres y está caracterizada por una progresiva disminución de los niveles de estrógeno. Es por esto que la menopausia es el punto en donde la menstruación cesa permanentemente como resultado de la pérdida de la actividad folicular ovárica. Mientras que los folículos ováricos producen estrógeno y P4 (hormonas con actividad autocrina y paracrina), la menopausia causa varios cambios fisiológicos debido a la disminución de estas hormonas. La deficiencia de estrógeno implica síntomas vasomotores, atrofia urogenital, disminución cognitiva, así como también mayor

riesgo de enfermedades como aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, osteoporosis y enfermedad de Alzheimer. En cambio, P4 actúa modulando los efectos de los genes de respuesta a estrógenos, actuando en varios casos en el control y reducción del riesgo de cánceres dependientes de estrógenos como por ejemplo el cáncer de mama, útero y ovario. Con el fin de minimizar el daño causado por la ausencia de la actividad hormonal, se desarrolló la terapia de reemplazo hormonal, la cual es ampliamente utilizada por mujeres de todo el mundo y en algunos casos sin criterios preestablecidos. Hasta mediados de la década de los años ochenta, la terapia utilizaba sólo E2, de esta manera reduciendo síntomas vasomotores, vaginitis y osteoporosis. Sin embargo, estudios posteriores indicaron que este tratamiento estaba asociado con un aumento significativo de la incidencia de carcinoma endometrial, relacionado por la continua estimulación de hiperplasia endometrial por la acción de estrógenos en ausencia de los efectos opuestos de las progestinas. Desde ese estudio, se comenzó a utilizar la combinación de estrógenos y P4 en la terapia de reemplazo hormonal. Sin embargo, en algunas mujeres esta terapia puede generar más efectos nocivos que beneficiosos. Esto depende de la presencia de factores de riesgo preexistentes, el tipo de esteroides utilizados y la duración del tratamiento entre otras cosas. Además de controlar los síntomas de la menopausia, la terapia de reemplazo hormonal tiene varios efectos secundarios como irritación en la piel, sangrado irregular, náuseas, vómitos y depresión. La terapia conteniendo estrógenos y progestinas impone un riesgo de 26 % de desarrollar cáncer de mama que el régimen sólo con estrógenos, pero disminuye el riesgo de padecer cáncer de colon en un 20 a un 40 % (Rossouw 2002). Estas observaciones han llevado a desarrollar múltiples trabajos investigando el rol de la terapia de reemplazo hormonal en dichas patologías.

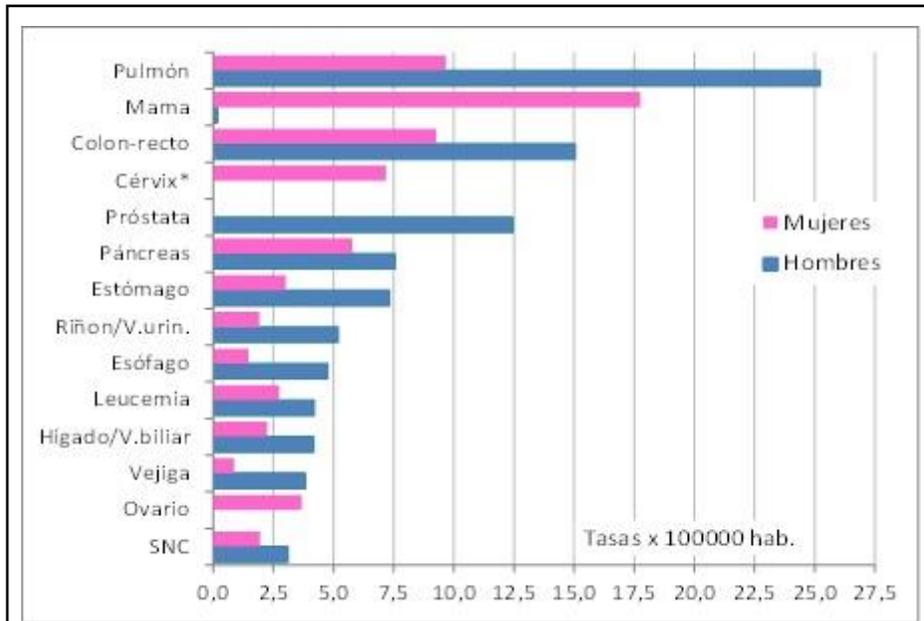
## **CAPÍTULO II**

### **CÁNCER DE COLON**

#### **Epidemiología**

Los tumores malignos junto con las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de muerte, más aún en regiones en desarrollo donde la prevención y tratamientos del cáncer son menos accesibles y/o efectivos. Esta enfermedad se produce, en la mayoría de los casos, en personas mayores de 50 años, con un pico de incidencia entre 65 y 75 años; por lo tanto, el envejecimiento de la población generará una mayor proporción de personas con edad de padecerlo y este factor debe ser tenido en cuenta en el análisis y la proyección de las políticas de control de la enfermedad. El cáncer de colon es uno de los tumores con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, con una proyección y preocupación crecientes para las próximas décadas. Ocupa el tercer lugar en incidencia de tumores malignos detrás del cáncer de pulmón y de mama, con aproximadamente 1.300.000 nuevos casos por año, y el cuarto lugar en mortalidad con más de 641.000 muertes anuales, luego del cáncer de pulmón, de estómago y de hígado (Ferlay et al. 2010). En las mujeres, el cáncer de colon es la segunda neoplasia más frecuente en el mundo luego del cáncer de mama (570.000 casos, el 9,4 % del total) y es la tercera causa de muerte por tumores malignos después del cáncer de mama y de pulmón (288.000 defunciones, un 8,6 % del total). Es el tercer cáncer más común en el mundo en los hombres (664.000 casos, 10 % del total) después del cáncer de pulmón y de próstata, y la cuarta causa más común de muerte por tumores malignos (321.000 muertes, un 7,6 % del número total de muertes por cáncer) luego del cáncer de pulmón, de próstata y de estómago. Las tasas de incidencia de cáncer de colon en el mundo son sustancialmente mayores en hombres que en mujeres (1,4:1) y también las tasas de mortalidad son mayores en hombres (Gualdrini 2011). En Argentina, según estimaciones del Instituto Nacional del Cáncer, las tasas de incidencia y mortalidad en hombres son de 30 y 15 casos por cada 100.000 habitantes respectivamente, mientras que en mujeres son de 19 y 9 casos por cada 100.000 habitantes (INC 2016), observándose

la misma tendencia a nivel mundial en la prevalencia de este tipo de cáncer en el sexo masculino (figura II.1).



**Figura II.1: Mortalidad por cáncer en hombres y mujeres según principales localizaciones tumorales.** Tasas estandarizadas por edad según población mundial estándar por 100.000 habitantes. Fuente: SIVER/INC– Ministerio de Salud de la Nación, en base a registros de mortalidad de la DEIS. Argentina, 2016.

Por todos estos datos en la actualidad el cáncer de colon y recto es un problema serio de salud pública en el mundo y en la Argentina.

### Clasificación de tumores de colon

La mayoría de las neoplasias que tiene su origen en el intestino grueso son adenocarcinomas epiteliales derivados de células epiteliales columnares de la capa mucosa del colon y del recto (tabla II.1). Dichos adenocarcinomas por lo general tienen su origen en pólipos que son producto de un aumento en la proliferación celular y displasia. La mayoría de los pólipos aparecen de manera esporádica y en personas de edad avanzada, siendo la

excepción en personas jóvenes, donde dicha enfermedad está asociada a un síndrome familiar. Hallazgos como son diferenciación endocrina, aspecto en anillo de sello y diferenciación de células escamosas son apariencias frecuentes en cáncer colorrectal (Arcos, 2009).

Tumores epiteliales (5)	Tumores no epiteliales (5)	Tumores secundarios (5)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Adenoma:</b> Tubular, vellosos, tubulovellosos y serrados.</li> <li>- <b>Carcinoma:</b> Adenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, carcinoma medular y carcinoma indiferenciado.</li> <li>- <b>Carcinoide (neoplasia endocrina bien diferenciada):</b> Célula EC-neoplasia productora de serotonina, célula L- tumor productor de péptido glucagón.</li> <li>- <b>Adenocarcinoma-carcinoide mixto</b></li> <li>- <b>Otros</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Lipoma</b></li> <li>- <b>Leiomioma tumor estromal gastrointestinal</b></li> <li>- <b>Leiomiomasarcoma</b></li> <li>- <b>Angiosarcoma</b></li> <li>- <b>Sarcoma de Kaposi</b></li> <li>- <b>Melanoma maligno</b></li> <li>- <b>Otros</b></li> <li>- <b>Linfomas malignos:</b> Linfoma de Cel-B zona marginal o tipo MALT, linfoma de células del manto, linfoma de Cel-B largo y difuso linfoma de Burkitt, otros.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Pólipos:</b> Hiperplásicos (metaplásicos), Peutz-Jeghers y Juvenil</li> </ul>

**Tabla II.1.** Clasificación histopatológica del cáncer colorrectal. Arcos y Acevedo Tirado, 2009.

El cáncer de colon está asociado a una cascada de mutaciones genéticas que progresivamente van alterando la replicación del ADN y acelerando la replicación de los colonocitos. La acumulación progresiva de múltiples mutaciones genéticas resulta en transición de la mucosa normal a adenoma benigno, luego a displasia severa hasta carcinoma. Los cánceres de colon son clasificados como bien diferenciados, moderadamente diferenciados o pobremente diferenciados en función del grado de preservación de la arquitectura glandular normal y las características citológicas.

El sistema de clasificación que se emplea con más frecuencia para el cáncer de colon es el sistema **TNM** del *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*. El sistema TNM se basa en tres piezas clave de información:

- La profundidad del tumor (T) primario: si ha crecido dentro de la pared del intestino y si se ha expandido hacia las áreas adyacentes.
- Si el cáncer se propagó a los ganglios (nódulos [N]) linfáticos regionales adyacentes.
- Si el cáncer se propagó a otros órganos del cuerpo (metástasis, [M]). Los lugares más comunes de propagación son el hígado y los pulmones.

Los números y las letras después de la T, N y M proporcionan más detalles sobre cada uno de estos factores. Los números más altos significan que el cáncer está más avanzado. Otro factor que puede afectar su tratamiento y pronóstico es el grado. La escala utilizada para clasificar por grados a los cánceres colorrectales va del 1 al 4: el grado 1 (G1) significa que el cáncer se parece mucho al tejido normal colorrectal, mientras que el grado 4 (G4) significa que el cáncer se ve muy anormal. Los grados 2 y 3 (G2 y G3) están en algún lugar intermedio. Generalmente, el grado se simplifica como de bajo grado (G1 o G2) o de alto grado (G3 o G4).

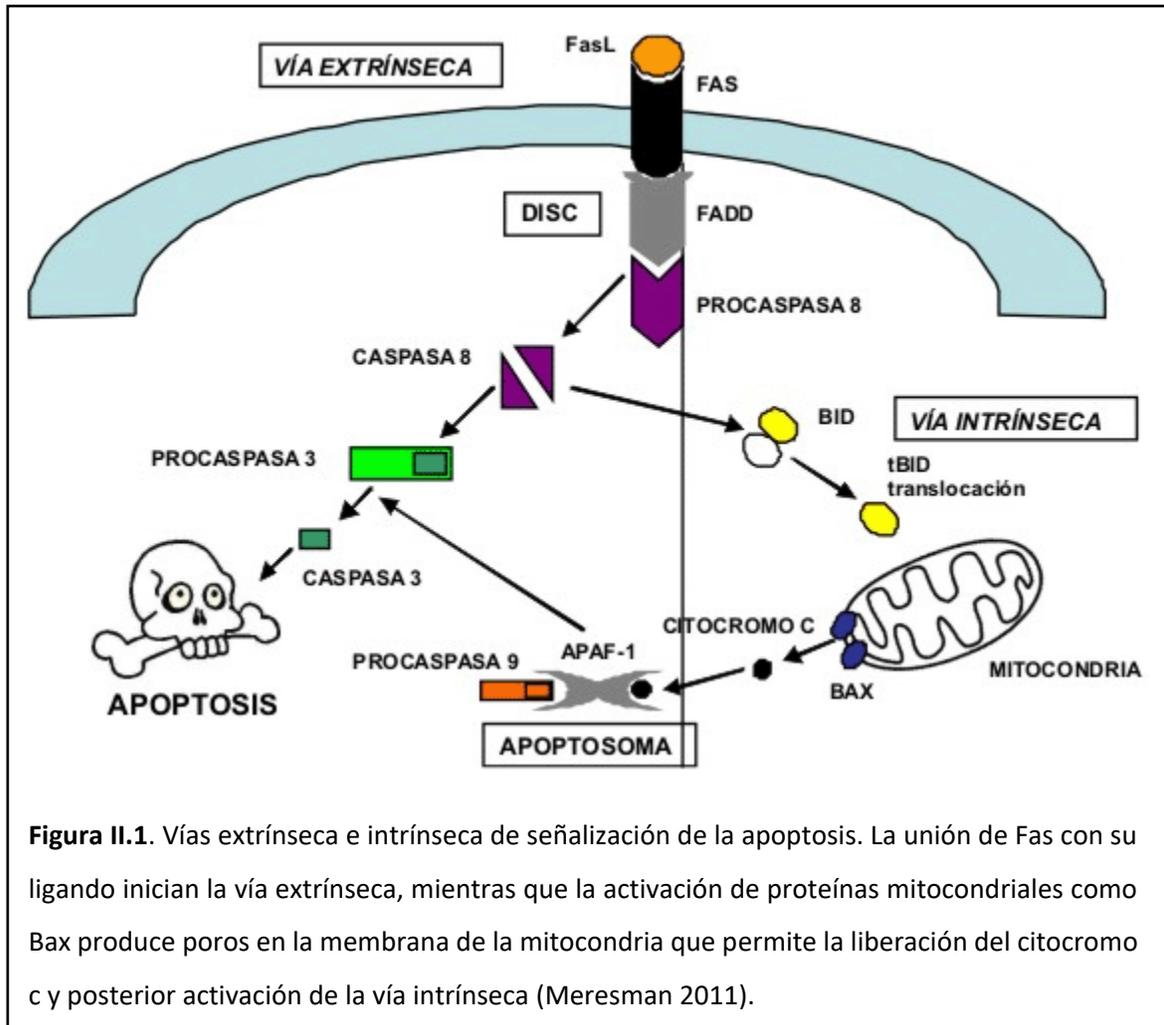
### **Marcadores tumorales**

Los marcadores tumorales son sustancias producidas tanto por las células normales como por las células cancerosas; sin embargo, se producen en concentraciones más altas en enfermedades cancerosas. Estas sustancias pueden encontrarse en la sangre, orina, materia fecal, en tejido tumoral o en otros tejidos o líquidos del cuerpo de algunos pacientes con cáncer. La mayoría de los marcadores de tumores son proteínas. Sin embargo, más recientemente, los patrones de expresión de los genes y los cambios de ADN han empezado a usarse como marcadores. En el cáncer colorrectal los marcadores más precisos son el CEA (antígeno carcinoembrionario) y Ca.19.9. Su determinación permite realizar un seguimiento del tumor tras su tratamiento, y para detectar recidivas, pero no son válidos para realizar un diagnóstico precoz. (Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos de América (NIH), 2015).

- Marcadores proliferativos: un parámetro de la sobrevida en el cáncer colorrectal lo constituye el análisis de proliferación celular, expresado por el

porcentaje de células en fase S del ciclo celular (Locker et al. 2006). Si bien no son utilizados de rutina en la clínica del cáncer colorrectal, numerosos estudios los proponen como marcadores pronóstico en esta enfermedad, incluyendo también a marcadores de muerte celular (Qasim et al. 2012; Khodapasand et al. 2015; Melling et al. 2016). Por ello en esta tesis, se han analizado marcadores de proliferación celular tales como PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) y Ki67. El primero se encuentra en el núcleo, actuando como cofactor de la polimerasa  $\delta$ , ayudando a incrementar la procesividad de la síntesis de la cadena líder durante la replicación del ADN. El Ki67 identifica células que se encuentran en las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), no reconociendo células en etapa de descanso (G0). La positividad del Ki-67 se correlaciona con el grado de diferenciación histológica, invasión vascular, posibilidad de metástasis, recurrencia temprana y pobre sobrevida en el cáncer de mama. Además, dentro de los marcadores proliferativos se encuentra Bcl-2, una proteína que se encuentra anclada a la membrana externa mitocondrial, característica que ha sido relacionada con su propiedad anti-apoptótica.

- Marcadores apoptóticos: La muerte celular por apoptosis es una muerte fisiológica, que se puede presentar ya sea porque el organismo requiere para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y la célula muere en beneficio del organismo. En este caso, la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso. La apoptosis puede llevarse a cabo por dos vías: la vía extrínseca o la vía intrínseca (figura II.2).



**Figura II.1.** Vías extrínseca e intrínseca de señalización de la apoptosis. La unión de Fas con su ligando inician la vía extrínseca, mientras que la activación de proteínas mitocondriales como Bax produce poros en la membrana de la mitocondria que permite la liberación del citocromo c y posterior activación de la vía intrínseca (Meresman 2011).

La vía extrínseca se encuentra involucrada a interacciones mediadas por receptores transmembrana como los receptores de muerte, caracterizados por presentar un dominio extracelular y un segundo dominio de localización citoplasmática conocido como el dominio de la muerte, que es el responsable de la apoptosis. En cambio, la vía intrínseca se induce dentro de la célula y puede ser desencadenada por daño en el ADN, grandes aumentos en la concentración de calcio citosólico o estrés celular, así como un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria. Esto activa a miembros de la familia Bcl-2 que gobiernan la permeabilización de la membrana mitocondrial, conduciendo a la apoptosis. Con respecto al cáncer, los factores más decisivos para su desarrollo son las alteraciones en los

mecanismos y porcentajes de la proliferación celular y de la apoptosis (García García, 2006). El crecimiento tumoral podría definirse con la siguiente ecuación: % de células acumuladas = % de proliferación celular - % de muerte celular. Las modernas técnicas de inmunohistoquímica utilizan anticuerpos monoclonales y policlonales para poder detectar marcadores tisulares que permite informar el porcentaje de proliferación y el porcentaje de apoptosis existente en una determinada muestra de tejido perteneciente a una lesión cancerosa o precancerosa. Así, la detección molecular de marcadores informa sobre la situación más o menos grave del paciente respecto de su proceso canceroso. Dentro de los marcadores apoptóticos analizados en esta tesis se encuentran:

✓ **PARP:** es una poli ADP-ribosa polimerasa, involucrada en la reparación del ADN ante el estrés ambiental. De esta manera ayuda a las células a mantener su viabilidad. Pero esta proteína puede ser clivada por muchas caspasas, siendo un blanco específico de las caspasa 3, lo que facilita el desensamble celular y sirve como marcador apoptótico.

✓ **Caspasa 3:** es una proteína miembro de la familia de las caspasas, que son enzimas involucradas en el proceso de apoptosis. Las caspasas existen como proenzimas inactivas, que sufren un proceso proteolítico dando como resultado dos subunidades que al dimerizar forman la enzima activa. Al principio del proceso de apoptosis, las caspasas 8, 9 y 10 activan a la caspasa 3, que luego cliva a PARP y a otras caspasas como la 6 y 7. Esta enzima actúa tanto en la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis.

✓ **Caspasa 8:** esta enzima está involucrada en la vía extrínseca de la apoptosis, la cual es mediada por la activación de receptores de membrana, como la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular. Los ligandos de muerte son

constitutivamente homotriméricos; la unión a sus receptores conduce a la formación de un complejo que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD y caspasa 8, formando el complejo DISC. La formación de DISC conduce a la activación de caspasas iniciadoras tales como caspasa 8, la cual una vez clivada y activada, produce la activación de la caspasa 3, efectora de la apoptosis.

✓ **Caspasa 9:** enzima involucrada en la vía intrínseca de la apoptosis. Puede ser activada por una gran variedad de estímulos internos de la célula, que conducen a la unión del citocromo c, el cual se une y activa a la proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma. Este último es el encargado de clivar y activar a la caspasa 9, la cual finalmente activa a la caspasa 3, efectora de la apoptosis.

✓ **Bax:** proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2, involucradas en la vía intrínseca de la apoptosis. Una vez activada, Bax oligomeriza en la membrana mitocondrial, dando como resultado la liberación de citocromo c y otras proteínas de estos organelas, que contribuyen a la activación de caspasas.

### **Modelos de carcinogénesis de colon en animales**

La habilidad de inducir tumores de colon en animales ha provisto la oportunidad de estudiar varios aspectos del proceso carcinogénico. Estos modelos han permitido esclarecer información sobre la iniciación, promoción y progresión tumoral, incluyendo mecanismos detallados de transformación celular y los eventos subsecuentes que conducen a la formación de lesiones neoplásicas. Los modelos pueden ser químicamente inducidos o genéticamente modificados (Tanaka 2009). El primer reporte de la 1,2-dimetilhidracina (DMH) como un inductor químico del cáncer de colon fue reportado por Druckey en el año

1970 (Druckey, 1970). A partir de allí, DMH ha sido ampliamente usada para inducir adenocarcinoma de colon y recto en roedores con alta incidencia y especificidad (Druckrey et al. 1967; Nalini et al. 1997; Venkatachalam et al. 2016). La DMH es un inductor indirecto, ya que es metabolizado a azoximetano que es el agente directo que produce la alquilación del ADN en las células epiteliales del colon (Jucá et al. 2014). La histopatología de los tumores desarrollados con este carcinógeno es similar a la observada para los tumores de colon esporádicos humanos (LaMont y O’Gorman 1978; Pozhariski et al. 1979; Ahnen 1985; Rogers y Nauss 1985; Jackson et al. 1999) y es un modelo altamente versátil para estudios de quimioprevención, genética y biología del cáncer de colon (Bissahoyo et al. 2005).

### **Participación de los esteroides ováricos en el cáncer de colon**

Las altas tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de colon en el mundo llevaron a enfocar la atención sobre cuál podría ser la causa que provoca una menor tasa en las mujeres. En el año 1991 se lanzó Women's Health Initiative (WHI) que consistió en un estudio observacional a partir de una serie de ensayos clínicos que involucraron 161.808 mujeres postmenopáusicas sanas y que duró 15 años. Los ensayos clínicos fueron designados para evaluar los efectos de la terapia de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas, la modificación de su dieta, los suplementos de calcio y vitamina D en la enfermedad cardíaca y el riesgo de padecer cáncer de mama y colon. Se determinó que las mujeres que recibieron estrógenos más progestinas presentaron una disminución del 20 % al 40 % de riesgo de padecer cáncer de colon, mientras que las mujeres que recibieron sólo estrógenos, no se observó diferencia con respecto al grupo placebo (Rossouw 2002). Estas observaciones llevaron a postular a los esteroides ováricos como protectores en el desarrollo de cáncer.

Diferentes estudios en animales también demostraron un menor riesgo de contraer cáncer de colon en presencia de estrógenos (Weyant et al. 2001; Foster 2013). Sin embargo, una vez desarrollada esta patología, estudios in vivo han indicado que los estrógenos inhiben la proliferación del cáncer de colon, mientras que otros sugieren que provocan

efectos mitogénicos en esta patología (Weige et al. 2009). Dichas controversias pueden deberse a las diferencias en los modelos experimentales en cuanto a la iniciación de la terapia (si es antes o posterior a la inducción carcinogénica), tipos y dosis de esteroides utilizados, duración del experimento, entre otros.

Con respecto a la acción de los esteroides ováricos sobre líneas celulares de cáncer de colon, se han reportado resultados controversiales. Estudios llevados a cabo con estrógenos, muestran que estos inhiben, así como también estimulan el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer de colon (Fiorelli et al. 1999). Con respecto a P4 también hay controversia en los resultados obtenidos, ya que algunos autores reportan una acción inhibitoria, y otros una acción estimuladora del crecimiento celular (Nakayama et al. 2000; Motylewska y Mełen-Mucha 2009). Todos estos resultados obtenidos hasta el momento en cuanto a los esteroides ováricos y su acción en líneas celulares de cáncer de colon son conflictivos y esto puede ser debido a los diferentes tipos de células utilizados, con expresiones variables de sus receptores hormonales, y en las diferentes concentraciones y tipos de hormonas utilizadas. Por ello es necesario aportar estudios que confirmen los efectos que producen, y cuáles son los factores que afectan a los mismos.

### **Receptores de estrógenos**

Hace algunos años se creía que la función primaria de E2 era el desarrollo de las características sexuales secundarias femeninas y la subsecuente regulación de la función reproductora. Sin embargo, en la actualidad es bien conocida su participación en otros aspectos fisiológicos, ya sean femeninos o masculinos, y en diferentes enfermedades incluyendo el cáncer. Los efectos oncogénicos de E2 han sido ampliamente estudiados en cáncer de mama y ovario, pero poco se sabe de su acción en cáncer de colon (Marino 2014). En cuanto a sus receptores, se sabe que el RE $\beta$  es el receptor predominante en el colon (Campbell-Thompson 2001; Konstantinopoulos 2003; Wong 2005) y que su expresión se pierde durante la progresión del cáncer de colon, sugiriendo que cumpliría un rol importante en la progresión de esta enfermedad (Foley, 2000; Wada-Hiraike O 2006).

Experimentos llevados a cabo en ratones knockout para RE $\beta$  concluyen que la pérdida del mismo conduce a un aumento de proliferación, pérdida de diferenciación y disminución de la apoptosis en el epitelio de colon, sugiriendo un importante rol de este receptor en la organización y mantenimiento estructural del colon (Wada-Hiraike O 2006). Por otro lado, en líneas celulares de cáncer de colon también se ha reportado que expresan mayormente RE $\beta$  tras una estimulación con E2 (10-1000 nmol/L), con una inducción de apoptosis dependiente de la dosis (Marino 2014). Los mecanismos propuestos para la activación de la apoptosis a través del RE $\beta$  varían según la línea celular estudiada. Estos mecanismos incluyen la fragmentación del ADN y la condensación nuclear (Qiu 2002), cambios en la relación de proteínas Bcl-2/Bax (Linsalata 2005), y el aumento de la expresión de caspasas 8 y 9. Con respecto al RE $\alpha$ , se ha reportado que su expresión es mínima en colon normal y en células de cáncer de colon (Campbell-Thompson 2001; Waliszewski 1997). Por ello todos los estudios apuntan a que los efectos protectores de E2 en la carcinogénesis de colon son llevados a cabo por el RE $\beta$ .

### **Receptores de progesterona**

Además de los efectos conocidos del E2 sobre la tumorigénesis de colon, también debemos considerar a P4 como otro de los esteroides ováricos implicados en esta enfermedad. Hay algunos trabajos que reportan la ausencia de la expresión de los RP4 en tumores de colon y ningún efecto de las progestinas sobre la carcinogénesis en modelos animales (Heijmans 2011). Sin embargo, otros trabajos detectan la implicancia de P4, donde la expresión de los RP4 aumenta en orden de colon normal-adenoma-adenocarcinoma, demostrando un rol de los receptores en esta enfermedad (Qasim 2011). Hay algunos trabajos que proponen a los progestágenos como agentes quimiopreventores sobre el cáncer de colon, como es el caso del acetato de medroxiprogesterona (Tanaka 2008), pero poco se sabe sobre el rol de la P4 natural, ya que dichos trabajos han utilizado derivados sintéticos de esta hormona. También se sabe que estos pueden provocar efectos diferentes a los causados por la P4 natural. Es por ello que hay tanta controversia en la bibliografía, lo que dificulta la comparación de resultados debido a que diferentes progestinas pueden

asociarse a distintos tipos de estrógenos y a diferentes regímenes de administración (Campagnoli 2005). Los efectos celulares de P4 en colonocitos han sido mínimamente estudiados, y la relación entre P4 y los RE aún no está dilucidada (Barzi 2013).

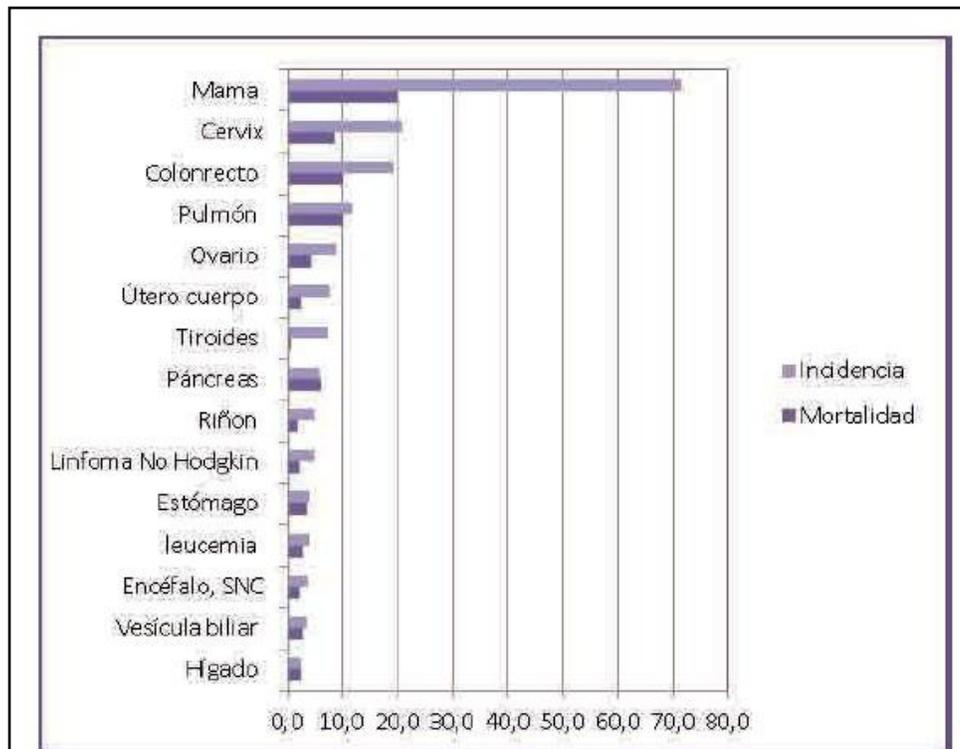
Por lo antedicho, se cree necesario poder aportar resultados que permitan esclarecer el rol de los esteroides ováricos en esta enfermedad, principalmente de P4 natural sobre el desarrollo del cáncer de colon, y cómo E2 influencia sus efectos, a través de la regulación de los receptores hormonales.

## CAPÍTULO III

### CÁNCER DE MAMA

#### Epidemiología

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo, representa el 16 % de todos los cánceres femeninos. Se estima que en 2004 murieron 519.000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, el 69 % de las defunciones se registran en los países en desarrollo. En la Argentina, el cáncer de mayor incidencia en mujeres es el de mama, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres (SIVER/INC en base a los datos de Globocan 2012. Argentina, 2016, figura III.1).



Fuente: Globocan 2012, IARC.

**Figura III.1: Incidencia y mortalidad por principales sitios tumorales en mujeres de Argentina.** Tasas ajustadas por edad por cien mil habitantes según población estándar internacional. Fuente: SIVER/INC en base a los datos de Globocan 2012. Argentina, 2016.

Se calcula que hay 18.700 casos nuevos por año (18 % del total y 36 % del total de cánceres en mujeres). Con respecto a la mortalidad por cáncer de mama en la Argentina, ha disminuido de forma sostenida y estadísticamente significativa, a un ritmo de 0,8 % anual en el período 2000-2011 y 2.1 % anual entre 2012 y 2014. En el año 2014 la tasa provincial de mortalidad por cáncer de mama en Mendoza fue la segunda más alta a nivel país (22 por cada 100.000 mujeres). A nivel nacional la tasa de mortalidad bruta fue de 25,95 y la estandarizada por edad según población mundial de 17,76 por cada 100.000 mujeres.

### **Clasificación de tumores de mama**

La Organización Mundial de la Salud clasifica al cáncer de mama según su lugar de origen, carácter y patrón estructural. Esta enfermedad puede originarse en diferentes partes de la mama. Los tumores de origen epitelial son los más comunes, dentro de los cuales se los puede clasificar en ductales (la enfermedad se desarrolla en los conductos que llevan la leche hacia el pezón, son la mayoría de los casos) o lobulillares (se originan en las glándulas que producen leche y son menos comunes). En algunos casos, un solo tumor de mama puede ser una combinación de diferentes tipos o ser una mezcla de *in situ* y cáncer invasivo. Dentro de los tipos invasores hay una gran clasificación de los mismos, siendo los carcinomas ductales los más comunes, seguidos por los lobulillares, mucinosos, medulares, papilares y tubulares, entre otros. El grado histológico de cada tumor (alto, intermedio o bajo) es un factor importante para determinar el pronóstico. Se valora la apariencia general del tumor (formación tubular), las áreas de mayor atipia (pleomorfismo nuclear) y las áreas con mayor actividad mitótica (índice mitótico).

### **Marcadores tumorales**

Un paso importante en la evaluación de un cáncer de mama es analizar el tumor extirpado durante la biopsia (o cirugía) para ver el estado de los siguientes marcadores: receptores de estrógenos, receptores de progesterona y receptor HER2/neu. En base a los resultados, el cáncer de mama puede clasificarse como uno de los tipos siguientes:

- Receptor hormonal positivo.

- HER2/neu positivo.
- Triple negativo (RE, RP, y Her2/neu negativos).

El estado de RE, RP y HER2/neu es importante para determinar el pronóstico y predecir la respuesta a la terapia endocrina y dirigida a HER2.

Además, las pruebas de ploidía pueden ayudar a determinar el pronóstico, pero estas pruebas pocas veces cambian el tratamiento y son consideradas como opcionales. Por lo general, no son recomendadas como parte de la evaluación rutinaria. La tasa de división de células cancerosas también se puede calcular mediante una prueba Ki67. Si la fracción de células de fase S o el índice de marcador Ki67 es alto, significa que las células cancerosas se están dividiendo más rápidamente, lo que indica que es un tipo de cáncer más agresivo.

Con respecto a la apoptosis, se sabe que representa no solo un blanco vital en la terapia del cáncer, sino también un biomarcador de suma importancia que hasta el momento ha sido ampliamente inexplorado (Spiliotaki et al. 2014; Kadam & Abhang 2016). En esta tesis se han analizado los mismos marcadores que se analizaron para cáncer de colon, y que han sido descritos en el capítulo anterior.

### **Modelos de carcinogénesis de mama en animales**

La rata es un organismo modelo bien establecido para estudiar la etiología, prevención y tratamiento del cáncer de mama. Hay diversos métodos para el desarrollo tumoral, tales como modelos animales con alteraciones genéticas que producen tumores espontáneos, modelos con transplantes celulares y tratamientos con carcinógenos químicos. Dentro de estos últimos, en la década de 1960 se reconoció al 7,12-Dimetilbenz[ $\alpha$ ]antraceno (DMBA) de ser capaz de inducir cáncer de mama en ratas (Huggings et al. 1961). Desde allí que ha sido ampliamente utilizado como carcinógeno mamario, y es un modelo establecido en nuestro laboratorio (López-Fontana et al. 2013; Sasso et al. 2014; Fontana et al. 2017). Los carcinomas mamarios producidos por DMBA muestran características similares al adenocarcinoma de la mama humana, tales como progresión histológica y dependencia de hormonas ováricas (Sharma et al. 2011). Una vez

ingerido, el DMBA es oxidado por enzimas del complejo P450, produciendo metabolitos que forman aductos covalentes con el ADN, los cuales llevan a mutaciones que pueden conducir al cáncer.

### **Participación de los esteroides ováricos**

Actualmente se considera crítico poder dilucidar el rol de los esteroides ováricos en la carcinogénesis mamaria, para un cuidado preventivo en mujeres; como así también para el entendimiento de la patofisiología de esta enfermedad. Ya está ampliamente demostrado que una exposición aumentada a E2 durante la vida de una mujer aumenta su riesgo de padecer cáncer de mama. Mientras que el rol de P4 en la tumorigénesis inducida por carcinógenos no se ha estudiado tan extensamente como el rol de E2. La importancia de P4 en el desarrollo tumoral mamario utilizando roedores ovariectomizados no está claro. Como sucede con E2, la divergencia obtenida en los resultados puede ser debida tanto a la forma de administración y las concentraciones de suero obtenidos con diferentes métodos (Stires et al. 2016). Muchos estudios proponen a P4 como proliferativa en la glándula mamaria normal, sin embargo, su rol en el cáncer mamario es controversial. La Women's Health Initiative mostró que el tratamiento de mujeres con estrógenos equinos y acetato de medroxiprogesterona actúan de manera sinérgica para promover el cáncer mamario comparado con estrógenos solos, conduciendo a la hipótesis que los progestágenos incrementan el riesgo de cáncer de mama. Estudios subsecuentes se enfocaron en el tiempo de administración y en los efectos de diferentes tipos de progestágenos, indicando que ciertas progestinas pueden incrementar el riesgo de cáncer, pero P4 natural no (Fournier 2005; Lee et al. 2016). Estos estudios epidemiológicos han aumentado la complejidad del rol de P4 en cáncer mamario y la necesidad de dilucidar las interacciones entre E2 y P4.

Los efectos de E2 y P4 en líneas celulares de cáncer de mama ya han sido ampliamente estudiados. Se ha descrito que P4 tiene efectos bifásicos en la proliferación celular, ya que las células cultivadas con P4 sufren un aumento abrupto en su proliferación, por un incremento de las ciclinas de las fases G1/S y G2. Luego de 48 horas se observa un período de inhibición del crecimiento celular, con un aumento de p27 y un arresto del ciclo en G1/S.

Por lo tanto, la respuesta de las líneas celulares de cáncer de mama a P4 es tanto proliferativa como inhibitoria, en claro contraste con los efectos claramente mitogénicos ya descritos para E2 en las mismas líneas celulares (Lange & Yee 2008). Por esta razón se ha descrito que P4 actúa primariamente como un agente acelerador del crecimiento, dependiendo del contexto celular, donde podría sensibilizar a las células a la acción de otros factores de crecimiento y citoquinas.

### **Receptores de estrógenos**

Los estrógenos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las glándulas mamarias y han sido asociados con la promoción y el crecimiento del cáncer de mama. Por ejemplo, la exposición extendida a estrógenos durante la vida de las mujeres, ya sea por una menarca temprana, menopausia tardía o nuliparidad, se asocia con un mayor riesgo. El uso de la terapia de reemplazo hormonal también aumenta el riesgo de padecer esta enfermedad. La mayoría de los cánceres mamarios humanos son inicialmente dependientes de estrógenos y regresionan cuando son privados de dicha hormona. La presencia de cantidades significativas de RE $\alpha$  al momento del diagnóstico es tomado como indicativo de hormonodependencia (Huang et al. 2005). Se ha descrito que su sobreexpresión conduce a la sobreproliferación y tumorigénesis en la glándula mamaria (Frech 2005). Es por ello que el tratamiento con antagonistas del RE $\alpha$  como el tamoxifeno, es parte de la primera línea para la terapia adyuvante. Claramente, son necesarios factores adicionales complementarios para definir la terapia precisa para los pacientes y para derivar en estrategias terapéuticas novedosas. Uno de ellos podría ser el RE $\beta$  que debería ser explorado por su valor potencialmente predictivo (Haldosén 2014). A diferencia de la isoforma  $\alpha$ , los niveles de expresión del RE $\beta$  se ven disminuidos en los tumores mamarios (Zhao 2003; Girault 2004; Gruvberger-Saal 2007; Honma 2008). Altos niveles de expresión de este receptor se han asociado con una mejor respuesta a tamoxifeno y un mayor tiempo de supervivencia (Honma 2008). Este efecto puede deberse a la inhibición de la proliferación llevada a cabo por el RE $\beta$ , a través de una disminución en las ciclinas A y D y

un aumento en los inhibidores p21 y p27, involucrados en la regulación del ciclo celular. Además, la sobreexpresión del RE $\beta$  previene la formación tumoral en modelos animales (Paruthiyil 2004). También se ha descrito que el RE $\beta$  puede contrarrestar los efectos del RE $\alpha$  en la glándula mamaria.

### **Receptores de progesterona**

Entender la acción de los RP4 en el cáncer de mama es de gran significancia clínica. Esto es evidenciado por ensayos clínicos de gran escala que se han conducido hace más de diez años y que han demostrado que las acciones de los RP4 aumentan el crecimiento del cáncer mamario. En dos ensayos independientes en mujeres bajo terapia de reemplazo hormonal, con regímenes de estrógenos y P4 sintética (acetato de medroxiprogesterona, noretisterona o norgestrel/levonorgestrel), presentaron un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama que las mujeres cuyos regímenes incluyeron solamente estrógenos y no progestinas (Collaborators 2003; Chlebowski et al. 2010). Los resultados de estos estudios permanecen todavía controversiales por varias razones, incluyendo el hecho de que las participantes ya estaban adentradas en la menopausia cuando comenzaron con la terapia de reemplazo hormonal. Además, aunque las progestinas sintéticas tratan de imitar las acciones de la P4 natural, producen alteraciones por su interacción con otros receptores tales como el de andrógenos o glucocorticoides, exhiben diferentes tiempos de vida media y son metabolizados de manera diferente a la P4 natural. Por lo tanto, pueden estar asociados con diferentes riesgos de cáncer mamario relativos a su contraparte natural. (Fournier et al. 2005; Lyytinen et al. 2009). Se ha reportado que P4 natural no aumenta el riesgo de cáncer mamario cuando es utilizada en terapia de reemplazo hormonal (Fournier 2008). Además, las dosis continuas de progestinas como parte de la terapia de reemplazo hormonal puede fallar en mimetizar la exposición cíclica del ligando natural in vivo. Sin embargo, tomando toda esta información, estos estudios son puntos de referencia que implican a los RP4 en el desarrollo y progresión del cáncer mamario, un descubrimiento que ha sido confirmado en estudios animales (Lanari et al. 2009; Lanari & Molinolo 2002). La evidencia clínica y pre-clínica sugiere que las progestinas incrementan el riesgo de cáncer

de mama en parte por el aumento en la proliferación de lesiones tempranas. Pero hay varios factores que pueden generar confusiones y discrepancias en los estudios de las acciones de los RP4 en este tipo de cáncer: las acciones específicas de las isoformas A o B que pueden superponerse y provocar efectos dispares. Estas isoformas son generalmente co-expresadas en el mismo tejido, en una relación 1:1. Sin embargo, en lesiones preneoplásicas y en muestras de pacientes con cáncer, esta relación se altera, frecuentemente por la pérdida de la isoforma B. Otro de los factores a tener en cuenta es que las acciones de los RP4 son diferentes si se trata de tejido normal o neoplásico, la falta de la diferenciación en la clínica de ambas isoformas, acciones independientes de ligando, el tipo de tratamiento hormonal (continuo o cíclico), fuente de la hormona (sintética o P4 natural) y diferenciación entre las acciones de los RP4 dependientes e independientes de los RE. Además, a pesar de la respuesta proliferativa dependiente de progestinas en modelos murinos, reportes previos mostraron efectos antiproliferativos o no-proliferativos de P4 en células humanas. Por ello la función de los RP4 es altamente dependiente del contexto molecular, y poder identificar modificadores de su acción es de importancia crítica para el avance del tratamiento del cáncer de mama (Hagan & Lange 2014).

### **Regulación cruzada entre receptores esteroidales**

Un paradigma emergente en la bioquímica de receptores esteroidales es la regulación cruzada entre los diferentes tipos de receptores, lo que les permite modular la señalización y las respuestas transcripcionales a sus correspondientes ligandos. Estudios recientes han demostrado que los receptores esteroidales (entre ellos RP4 y RE) participan en complejos unos con otros a un grado mucho mayor que el que se pensaba (Daniel et al. 2015; Giulianelli et al. 2012). Esta regulación cruzada es crítica para comprender la biología del cáncer mamario, ya que los RP4 y RE son capaces de modular sus actividades entre sí, lo cual posee implicancia en la respuesta de la terapia endocrina. Estudios recientes demuestran que RE y RP4-B forman un complejo con un coactivador PELP1, tanto en muestras tumorales como en líneas celulares. Esta interacción provoca la fosforilación de los RE, incrementa la proliferación celular y disminuye la sensibilidad al tratamiento con

tamoxifeno (Daniel 2015). En estudios similares, los complejos entre los RE y RP4 muestran una actividad transcripcional aumentada y una respuesta proliferativa ante las progestinas (Giulianelli 2012). Por último, estos estudios han demostrado que las células de cáncer mamario que poseen tanto RE como RP4-B pueden de hecho ser más sensibles al tratamiento hormonal. Quizás en ciertos casos de resistencia endocrina, los receptores esteroidales pueden sustituirse entre ellos o utilizar ligandos alternativos para llevar a cabo programas genéticos proliferativos y escapar de la inhibición de un tipo particular de receptor.

Por todo lo antedicho, es necesario poder esclarecer el rol de la P4 natural en cáncer de mama, ya que los resultados publicados hasta este momento aún son controversiales en esta enfermedad. Y además es importante poder describir cómo sus acciones son moduladas por E2.

## **CAPÍTULO IV**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **Hipótesis**

La acción individual y conjunta de  $17\beta$ -estradiol y progesterona altera la progresión tumoral *in vivo* en modelos animales de menopausia de cáncer de mama y colon.

#### **Objetivos**

##### **Objetivo general**

Entender los mecanismos responsables de la protección hormonal ejercida por los esteroides ováricos sobre el cáncer de colon y su regulación diferencial con el cáncer mamario.

##### **Objetivos específicos**

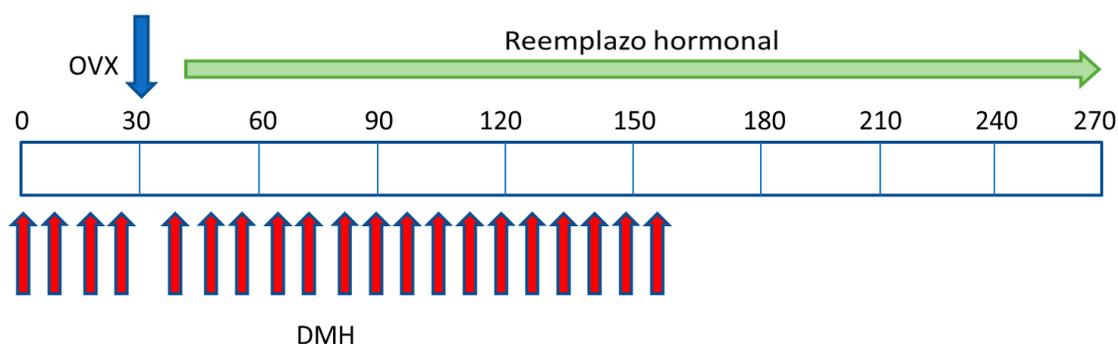
1. Determinar la regulación hormonal que ejercen los esteroides ováricos sobre la proliferación y la apoptosis en un modelo experimental de cáncer de colon en ratas ovariectomizadas y tratadas con  $17\beta$ -estradiol y progesterona.
2. Determinar la regulación hormonal que ejercen los esteroides ováricos sobre la proliferación y la apoptosis en un modelo experimental de cáncer de mama en ratas ovariectomizadas y tratadas con  $17\beta$ -estradiol y progesterona.
3. Comparar la regulación ejercida por los esteroides ováricos sobre la carcinogénesis mamaria y de colon.
4. Estudiar los efectos que ejercen los esteroides ováricos sobre la proliferación y la apoptosis en líneas celulares tumorales de colon tratadas con  $17\beta$ -estradiol y progesterona.

## CAPÍTULO V

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Modelo animal de cáncer de colon

Se utilizaron ratas hembras Sprague Dawley del bioterio de IMBECU, mantenidas en ciclos de luz (06:00 a 20:00 horas) y temperatura controladas (22-24 °C). Se las alimentó con comida para ratas (GEPESA, Córdoba, Argentina) y agua potable *ad libitum*. A los 45 días de edad fueron tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidracina (DMH (Sigma) 21 mg/kg) (día 0 de experimento), tal como describió anteriormente (Druckrey, 1970) y como se realizó previamente en nuestro laboratorio (Troncoso et al. 2011): inyecciones s.c., 20 dosis, una por semana. En el día 30 fueron ovariectomizadas (OVX) o sometidas a operación simulada de ovariectomía (SHAM, N=10). La extirpación quirúrgica de los ovarios se realizó mediante una incisión dorso lateral, anestesiando a los animales con una mezcla de Ketamina (45 mg/ml) y Xylazina (10 mg/ml). A partir del día 37 fueron inyectadas s.c. dos veces a la semana con estradiol (E2, 60 µg/kg, N=13), progesterona (P4, 10 mg/kg, N=14), E2 y P4 (E2+P4 60 µg/kg y 10 mg/kg respectivamente, N=13) o vehículo (V, aceite vegetal, N=10) hasta el momento de su sacrificio.



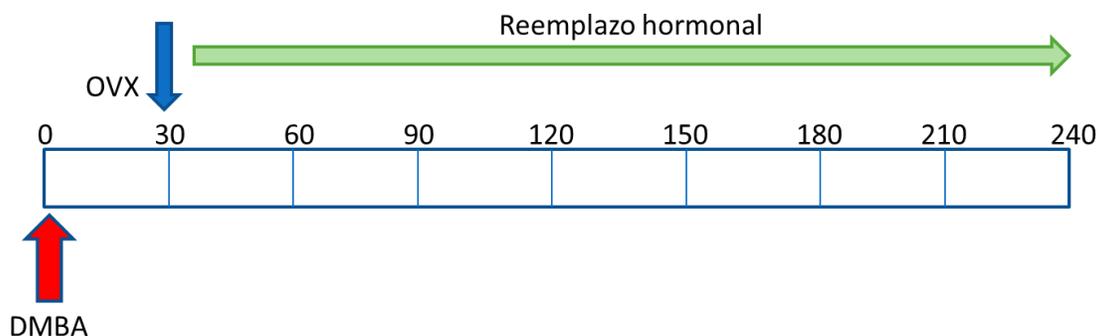
Los animales fueron ciclados, en el caso del grupo SHAM para controlar que tuvieran ciclos normales, y en el caso de los tratados, para evaluar la efectividad del tratamiento. Para ello

se tomó una muestra vaginal que se diluyó con agua y se observó al microscopio óptico a un aumento de 400 x. Las ratas fueron observadas diariamente y su peso corporal fue monitoreado una vez por semana para evaluar su evolución durante la inducción tumoral. Las ratas se sacrificaron por decapitación al presentar diarrea o pérdida de peso. Las ratas que no presentaron síntomas fueron sacrificadas a los 270 días de tratamiento. El tejido del colon se cortó longitudinalmente para exponer la parte interna o lumen donde se localizaron los tumores. Se contó el número de tumores por rata, el tamaño y características de cada uno y se procedió a recolectar muestras de sangre, tumores y tejidos circundantes. Una porción de tumor se fijó en formol al 10 % para luego ser deshidratado y montado en parafina, y otra porción se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior estudio. También se extirparon los úteros, donde se determinó su peso y se expresó en gramos por cada 100 gramos de peso corporal del animal. La **incidencia** fue calculada como el porcentaje de ratas que presentaron tumores dentro del período estudiado. Para calcular el **porcentaje de supervivencia libre de tumor** se graficó el día de sacrificio de los animales y se lo expresó como porcentaje de supervivencia. Para calcular el **número de tumores por rata** se procedió a contabilizar los tumores presentes en cada animal al momento del sacrificio según los diferentes tratamientos. Los tumores fueron medidos con calibre para medir el diámetro mayor (DM) y menor (dm) y calcular el **volumen tumoral** ( $VT=dm^2 \times DM/2$ ). El **peso tumoral** se expresó en gramos y en porcentaje de la relación peso tumoral sobre peso corporal de la rata. La **densidad tumoral** se calculó como la relación entre el peso tumoral y el volumen tumoral/1000. El **índice mitótico** se calculó como cantidad de figuras mitóticas presentes en diez campos analizados por microscopía a 400 x. El **índice apoptótico** fue calculado como cantidad de figuras apoptóticas presentes en diez campos analizados por microscopía a 400 x. La relación entre el índice mitótico y apoptótico (**M/A**) calculó dividiendo el índice mitótico sobre el apoptótico de cada tumor. El mantenimiento y manejo de los animales se realizó de acuerdo a la guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (publicación NIH N8 86-23, revisado 1985 y 1991), los requisitos del Reino Unido para la ética de la experimentación animal (ley de procedimientos científica con animales 1986). El protocolo de manejo de animales con el

que se desarrolló esta tesis fue aprobado por el comité de institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Nacional de Cuyo (CICUAL), nota número 0011463/2011.

### Modelo animal de cáncer de mama

Se utilizaron ratas hembras Sprague Dawley del bioterio de IMBECU, mantenidas en ciclos de luz (06:00 a 20:00 horas) y temperatura controladas (22-24 °C). Se las alimentó con comida para ratas (GEPESA, Córdoba, Argentina) y agua potable *ad libitum*. A los 55 días de edad se les administró el carcinógeno 7,12-Dimetilbenz[ $\alpha$ ]antraceno (DMBA (Sigma) 15 mg/rata) (día 0) tal como ha sido llevado a cabo en nuestro laboratorio anteriormente (López-Fontana et al. 2013; Sasso et al. 2014; Fontana et al. 2017): por sonda intragástrica conectada a jeringa de 3 ml y en el día 30 fueron ovariectomizadas (OVX) o sometidas a operación simulada de ovariectomía (SHAM, N=13). La extirpación quirúrgica de los ovarios se realizó mediante una incisión dorso lateral, anestesiando a los animales con una mezcla de Ketamina (45 mg/ml) y Xylazina (10 mg/ml). A partir del día 37 las ratas OVX fueron inyectadas subcutáneamente dos veces a la semana con estradiol (E2, 60  $\mu$ g/kg, N=10), progesterona (P4, 10 mg/kg, N=9), E2 y P4 (E2+P4, a las mismas dosis, N=8) o vehículo (V, aceite vegetal, N=9) hasta el momento de su sacrificio.



Los animales fueron ciclados, en el caso del grupo SHAM para controlar que tuvieran ciclos normales, y en el caso de los tratados, para evaluar la efectividad del tratamiento. Para ello se tomó una muestra vaginal que se diluyó con agua y se observó al microscopio óptico a un aumento de 400 x. Además, los animales fueron pesados y observados semanalmente

hasta la aparición de tumores palpables de mama. Las ratas que desarrollaron tumores fueron sacrificadas cuando los tumores alcanzaron un volumen superior a  $1000 \text{ mm}^3$  y el resto fue sacrificado a los 240 días de experimento, por decapitación. Se contó el número de tumores por rata, el tamaño y características de cada uno y se procedió a recolectar muestras de sangre, tumores y tejidos circundantes. Una porción de tumor se fijó en formol al 10 % para luego ser deshidratado y montado en parafina, y otra porción se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior estudio. También se extirparon las glándulas mamarias y los úteros, donde estos últimos se pesaron y se expresó su peso en gramos por cada 100 gramos de peso corporal del animal. La **incidencia** fue calculada como el porcentaje de ratas que presentaron tumores dentro del período estudiado. La **latencia** fue considerada como el tiempo transcurrido desde la administración del DMBA hasta la aparición del primer tumor mamario. Para calcular el **porcentaje de supervivencia libre de tumor** se graficó el día de sacrificio de los animales y se lo expresó como porcentaje de supervivencia. Para calcular el **número de tumores por rata** se procedió a contabilizar los tumores presentes en cada animal al momento del sacrificio según los diferentes tratamientos. Los tumores fueron medidos con calibre para medir el diámetro mayor (DM) y menor (dm) y calcular el **volumen tumoral** ( $VT = dm^2 \times DM / 2$ ). El **peso tumoral** se expresó en gramos y en porcentaje de la relación peso tumoral sobre peso corporal de la rata. La **densidad tumoral** se calculó como la relación entre el peso tumoral y el volumen tumoral/1000. La **velocidad de crecimiento tumoral** se expresó en  $\text{mm}^3/\text{día}$  y fue calculada a partir de la relación entre el volumen tumoral y la diferencia en días desde la detección del tumor y el sacrificio del animal. El **índice mitótico** se calculó como cantidad de figuras mitóticas presentes en diez campos analizados por microscopía a 400 x. El **índice apoptótico** fue calculado como cantidad de figuras apoptóticas presentes en diez campos analizados por microscopía a 400 x. La relación entre el índice mitótico y apoptótico (**M/A**) calculó dividiendo el índice mitótico sobre el apoptótico de cada tumor.

El mantenimiento y manejo de los animales se realizó de acuerdo a la guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (publicación NIH N8 86-23, revisado 1985 y 1991), los requisitos del Reino Unido para la ética de la experimentación animal (ley de

procedimientos científica con animales 1986). El protocolo de manejo de animales con el que se desarrolló esta tesis fue aprobado por el comité de institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Nacional de Cuyo (CICUAL), nota número 0011463/2011.

### **Determinación de concentración hormonal**

Las ratas sometidas a los tratamientos hormonales fueron sacrificadas el día que debían recibir la dosis hormonal, mientras que las no tratadas fueron sacrificadas en diestro. Se eligió esta fase del ciclo estral ya que los niveles hormonales se encuentran en concentraciones basales. Al momento del sacrificio de las ratas se recolectó la sangre troncal, el suero se separó por centrifugación y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se utilizaron los kits Coat-A-Count® de Siemens para medir los niveles séricos de estradiol y progesterona, según instrucciones del fabricante.

### **Análisis histológico**

Al momento del sacrificio de las ratas se extirparon los tejidos normales y tumores de colon o mama, los cuales fueron fijados en formol al 10 % durante 24 horas, deshidratados en soluciones de etanol, aclarados con xilol e incluidos en parafina. La realización de los cortes histológicos se llevó a cabo con un micrótopo Carl Zeiss HYRAX M 25 Rotary 56 en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de la Universidad Nacional de Cuyo, en el marco de una pasantía para aprendizaje y perfeccionamiento. Se realizaron cortes de entre 3-5  $\mu\text{m}$ , los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina para su posterior observación al microscopio óptico. Se realizó un análisis histopatológico de los tumores bajo la supervisión de la Médica Patóloga Silvana Semino. Se definieron el tipo y grado tumoral, el grado de inflamación, fibrosis, necrosis y se determinaron los índices mitótico y apoptótico mediante el recuento (400 x, 10 campos) de figuras apoptóticas y figuras mitóticas en zonas de tejido epitelial. Se tomaron imágenes de los tumores con un microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corp., Japón) equipado con una cámara digital micrometrics SE Alta Calidad (Accu-Scope, Commak, NY 11725).

## Inmunohistoquímica

Se cortaron secciones seriadas de 3-5  $\mu\text{m}$  y se montaron en portaobjetos recubiertos con 3-aminopropiltriétoxosilano (Sigma-Aldrich). Para desenmascarar a los antígenos se utilizó un protocolo de recuperación de antígenos con calor (40 minutos en buffer citrato 0,01 M, pH 6), tal como ha sido llevado a cabo en nuestro laboratorio (López-Fontana et al. 2013; Arbocco et al. 2016). Luego de realizar dos lavados con agua destilada, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena por el tratamiento con azida sódica al 0,1 % por 30 minutos. Se realizó un lavado en autobuffer por 15 minutos y se bloqueó con leche descremada al 10 % por 30 minutos. Luego se lavaron las secciones de tejido y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (descritos en la tabla V.I) diluido en buffer 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,15 M NaCl, 0,04 % azida sódica y 1 % BSA, pH 7,6; durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Se utilizó el sistema de detección VECTASTAIN® Elite ABC-Peroxidasa de Vector Laboratories, Inc, EE.UU en una dilución 1:400 y como sustrato de la peroxidasa ImmPACT™ DAB, Vector Laboratories, Inc, EE.UU en una dilución 1:50. Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina para revelar los núcleos. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corp., Japón) equipado con una cámara digital micrometrics SE Alta Calidad (Accu-Scope, Commak, NY 11725) bajo aumentos 100 x y 400 x.

Anticuerpo	N° de catálogo	Fabricante	Dilución
Bax	ab32503	Abcam	1:700
Bcl-2	sc-7382	Santa Cruz	1:50
Caspasa 3	ab4051	Abcam	1:400
Ki67	ab15580	Abcam	1:500
PARP	ab32138	Abcam	1:250
PCNA	M0879	Dako	1:600
RE $\alpha$	ab32063	Abcam	1:200
RE $\beta$	ab3577	Abcam	1:750
RP4	sc-539	Santa Cruz	1:100

**Tabla V.I. Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica.** Se detalla la dilución utilizada, número de catálogo y el fabricante.

### **Aislamiento de proteínas**

Al momento del sacrificio de las ratas se extirparon los tejidos normales y tumores de colon o mama, los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las proteínas totales se extrajeron por homogeneización en 2 volúmenes de buffer de lisis (Tris 50 mM, pH 7.5, sacarosa 250 mM, benzamidina 10 mM, NaF 10 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, glicerofosfato 20 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, PMSF 1 mM, p-nitrofenilfosfato 10 mM, y aprotinina, leupeptina, y pepstatina a 2 mg/L) en baño de hielo, utilizando un homogeneizador Ultraturrax (Arbocco et al. 2016). El homogeneizado se centrifugó a 12.500 g durante 30 minutos, se separó el sobrenadante y se congeló en varias alícuotas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las proteínas se cuantificaron utilizando el método micro BCA de Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, EE.UU.

### **Electroforesis en gel y transferencia a membrana (SDS-PAGE y Western Blot)**

Las muestras proteicas se hirvieron 5 minutos en buffer de siembra. Se sembraron 50  $\mu\text{g}$  de proteínas para los tumores de mama, y 80  $\mu\text{g}$  de proteínas para los tumores de colon. Se separaron mediante SDS-PAGE utilizando un voltaje constante de 110 V, y se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P de Merck Millipore) durante toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  con voltaje constante de 22 V. Luego de la transferencia se bloquearon con seroalbúmina bovina (Sigma) al 0,5 % por 30 minutos y se procedieron a incubar con los anticuerpos primarios que figuran en la tabla V.II durante toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en agitador orbital. Al otro día se realizaron cinco lavados con TBS-T y se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (PR), anti-ratón o anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) según correspondiera, por 1 hora y media a temperatura ambiente en agitador orbital. Las membranas se lavaron y revelaron por quimioluminiscencia (Chemidoc Imaging System de Bio-Rad), utilizando luminol y ácido cumárico (Sigma). Las bandas se

cuantificaron por densitometría con el programa ImageJ (NIH [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>]), y los valores fueron normalizados con  $\beta$ -actina y  $\beta$ -tubulina.

Anticuerpo	N° de catálogo	Fabricante	Dilución
Bax	ab32503	Abcam	1:1000
Bcl-2	sc-7382	Santa Cruz	1:500
Caspasa 3	ab4051	Abcam	1:500
Caspasa 8	ab25901	Abcam	1:1000
Caspasa 9 clivada	#9507	Cell Signaling	1:1000
PARP clivado	ab32064	Abcam	1:2000
RE $\alpha$	ab32063	Abcam	1:2500
RE $\beta$	ab3577	Abcam	1:3000
RP4	sc-539	Santa Cruz	1:200
$\beta$ -actina	sc-47778	Santa Cruz	1:3000
$\beta$ -tubulina	ab52623	Abcam	1:10000
Anti-conejo-PR	sc-2004	Santa Cruz	1:2000
Anti-ratón-PR	sc-2005	Santa Cruz	1:2000

**Tabla V.II. Anticuerpos utilizados en Western Blot.** Se detalla la dilución utilizada, número de catálogo y el fabricante.

### Cultivos celulares

Se utilizaron las líneas celulares tumorales humanas de colon HCT116 y SW480, las cuales fueron cultivadas en DMEM/F12 (Sigma) sin rojo fenol con 10 % de suero fetal bovino charcolizado, 1/0,1 % penicilina/estreptomina en estufa a 37 °C, en atmósfera saturada en vapor de agua y con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Tratamientos hormonales: las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de P4 ( $10^{-7}$  a  $10^{-11}$  M) y/o E2 ( $10^{-7}$  a  $10^{-11}$  M) por 24, 48 y 72 horas.

Ensayos de viabilidad/proliferación: A) Para el ensayo con azul Tripán se cultivaron 50.000 células en placas de 12 pocillos, las cuales fueron tratadas con las diferentes concentraciones hormonales. Al finalizar el experimento, se utilizó una disolución 1:1 con

10  $\mu$ l del cultivo y azul de tripán, y se contó con la cámara de Neubauer para determinar el número de células viables expresadas por mililitro. B) Para el ensayo reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán, las células se cultivaron en placa de 96 pocillos donde fueron sometidas a los diferentes tratamientos. Luego se les colocó 50  $\mu$ l de MTT y se las incubó 4 horas a 37 °C. Finalizada esta incubación se eliminó el sobrenadante, se les añadió 100  $\mu$ l de isopropanol y se leyó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

### **Análisis Estadístico**

Los datos se analizaron con ANOVA I mediante el programa GraphPad Prism, versión 5.03 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA-USA) con posterior análisis de Neuman-Keuls para las variables paramétricas, y el test de Kruskal Wallis y Dunn's para las no paramétricas. Los porcentajes de incidencia se analizaron por el test de Fisher. Para ciertos resultados puntuales se utilizaron análisis más específicos, los cuales se describen en los resultados.

## **CAPÍTULO VI**

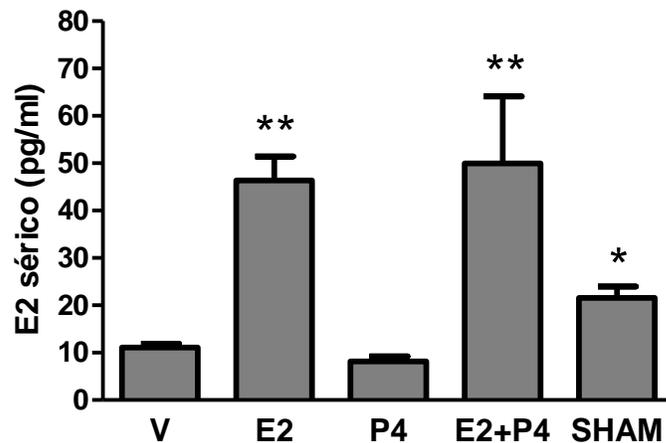
### **RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°1**

**Objetivo específico N°1:** Determinar la regulación hormonal que ejercen los esteroides ováricos sobre la proliferación y la apoptosis en un modelo experimental de cáncer de colon en ratas ovariectomizadas y tratadas con 17  $\beta$ -estradiol y progesterona.

#### **RESULTADOS**

**Las dosis administradas de 17- $\beta$ -estradiol y progesterona correspondientes a la terapia de reemplazo hormonal se encuentran dentro de los valores fisiológicos**

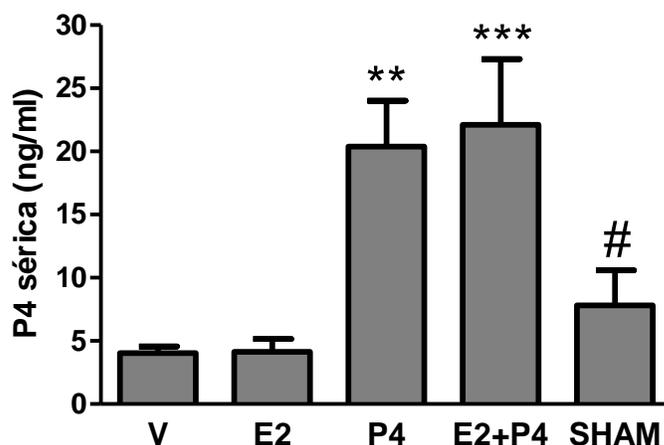
Para estudiar la regulación que ejercen los esteroides ováricos sobre la tumorigénesis de colon en un modelo de menopausia y terapia de reemplazo hormonal, se utilizaron ratas Sprague Dawley de 45 días de edad, las cuales en el día 0 de experimento fueron tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidracina (DMH (Sigma) 21 mg/kg, inyecciones s.c., 20 dosis, una por semana). En el día 30 fueron ovariectomizadas (OVX) o sometidas a operación simulada de ovariectomía (SHAM, N=10). A partir del día 37 fueron inyectadas s.c. dos veces a la semana con estradiol (E2, 60  $\mu$ g/kg, N=13), progesterona (P4, 10 mg/kg, N=14), E2 y P4 (E2+P4 60  $\mu$ g/kg y 10 mg/kg respectivamente, N=13) o vehículo (V, aceite vegetal, N=10) hasta el momento de su sacrificio. Las ratas fueron observadas diariamente y su peso corporal fue monitoreado una vez por semana para evaluar su evolución durante la inducción tumoral. Las ratas se sacrificaron por decapitación al presentar diarrea o pérdida de peso y las que no presentaron síntomas fueron sacrificadas a los 270 días de tratamiento. Finalizado el experimento se procedió a medir la concentración de dichas hormonas en suero por radioinmunoensayo. En el caso del grupo SHAM, los animales fueron sacrificados en diestro, ya que los niveles hormonales se encuentran en concentraciones basales en este día del ciclo estral. En cambio, en los diferentes tratamientos al no producirse el ciclo hormonal, los animales fueron sacrificados el día que debían recibir la dosis de la hormona correspondiente. Los resultados de estos tratamientos se muestran en las figuras VI.1 y VI.2.



**Figura VI.1. Niveles de E2 en suero de ratas ovariectomizadas y tratadas con los diferentes tratamientos hormonales.** Finalizado el experimento, las ratas se sacrificaron por decapitación y se recolectó la sangre troncal para aislar el suero. Los niveles de E2 fueron medidos por radioinmunoensayo con el kit Coat-A-Count® de Siemens. \*  $p < 0.05$  con respecto a E2 y E2+P4; \*\* $p < 0.01$  con respecto a los demás grupos. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls.

Se pudo observar que los grupos E2 y E2+P4 alcanzaron los valores más altos con respecto al resto de los grupos ( $p < 0.01$ ), con un promedio cercano a los 50 pg/ml. Este valor está dentro de los rangos fisiológicos normales encontrados en el ciclo estral de las ratas Sprague Dawley, que han sido descritos para las distintas etapas del ciclo (Williams y Lipner 1982): diestro 1: 10-13 pg/ml; diestro 2: 15-17 pg/ml, proestro: 50 pg/ml y estro 10 pg/ml. En cambio, en los grupos tratados con V y P4 se observaron los niveles más bajos de esta hormona, siendo significativamente menores que el resto de los grupos tratados ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ ). Con respecto al grupo control SHAM, los valores de E2 fueron significativamente menores que los grupos tratados con E2 y E2+P4 ( $p < 0.05$ ) y similares a los grupos V y P4.

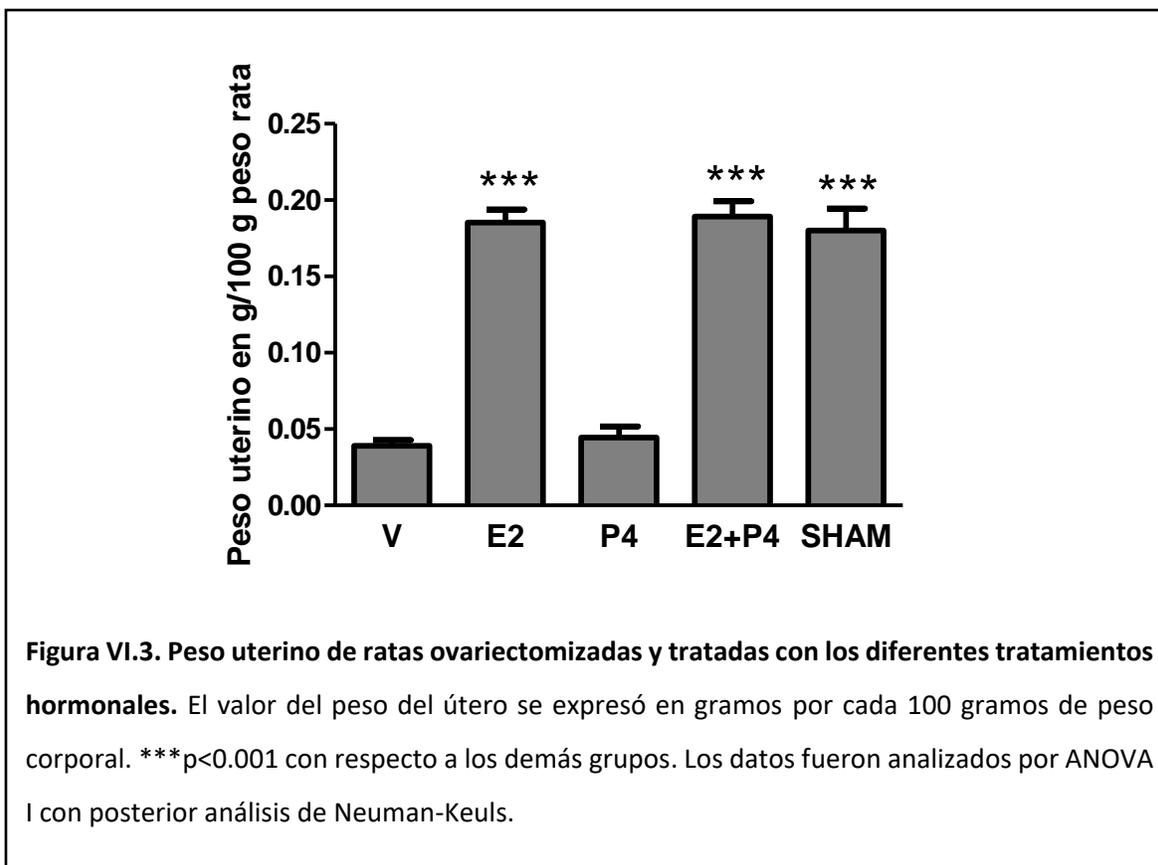
Por otro lado, con respecto a los niveles de P4 los resultados se muestran en la figura VI.2.



**Figura VI.2 Niveles de P4 en suero de ratas ovariectomizadas y tratadas con los diferentes tratamientos hormonales.** Finalizado el experimento, las ratas se sacrificaron por decapitación y se recolectó la sangre troncal para aislar el suero. Los niveles de P4 fueron medidos por radioinmunoensayo con el kit Coat-A-Count® de Siemens. \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  con respecto a los demás grupos. # $p < 0.01$  con respecto a P4 y E2+P4. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls.

Se observó que los valores de P4 en los grupos P4 y E2+P4 fueron significativamente mayores que en el resto de los grupos, con un promedio de alrededor de 20 ng/ml ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  respectivamente). Dicho valor está dentro de los rangos fisiológicos normales encontrados en el ciclo estral de las ratas Sprague Dawley, que han sido descritos para las distintas etapas del ciclo (Williams y Lipner 1982): diestro 1: 20 ng/ml; diestro 2: 10 ng/ml; proestro: 30 ng/ml y estro: 5 ng/ml. En cambio, en los grupos tratados con V y E2 se observaron los niveles más bajos de esta hormona, siendo significativamente menores que el resto de los grupos tratados ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ). Con respecto al grupo control SHAM, los valores de P4 fueron significativamente menores que los grupos tratados con P4 y E2+P4 ( $p < 0.01$ ) y similares a los grupos V y P4.

Además, también se analizó el peso de los úteros con el fin de evaluar la actividad biológica de dicho tratamiento hormonal. Los resultados se muestran en la figura VI.3.

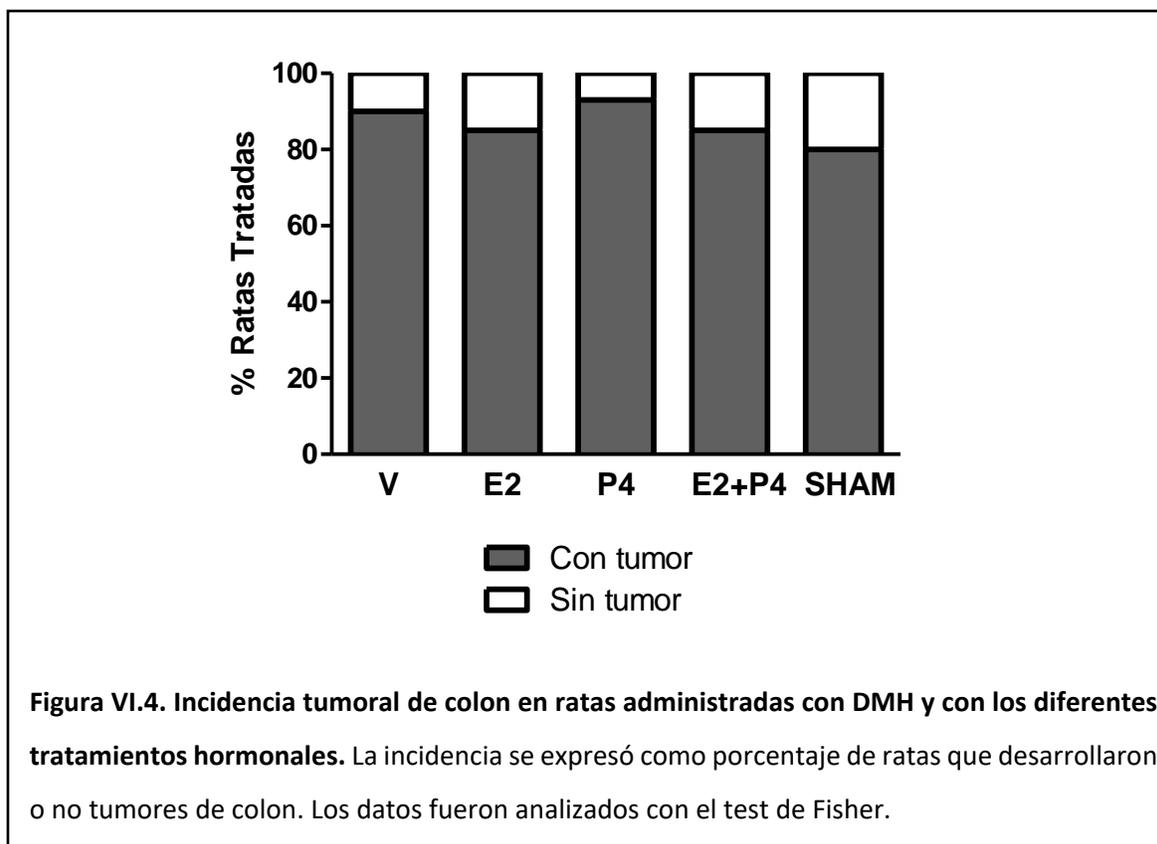


Se pudo observar que los úteros provenientes de las ratas SHAM y de las tratadas con E2 y E2+P4 fueron significativamente más pesados que el resto de los grupos ( $p < 0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos E2, E2+P4 y SHAM, y tampoco entre V y P4.

Estos resultados muestran que las dosis administradas de las hormonas esteroidales alcanzaron valores fisiológicos, y que además tuvieron efecto biológico sobre sus órganos blanco en el modelo experimental en ratas de cáncer de colon.

### **El tratamiento hormonal no influye en la incidencia tumoral de colon**

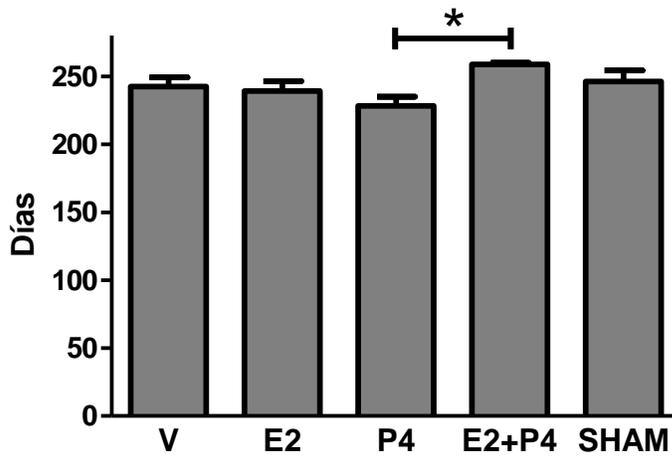
Para estudiar el efecto que producen los esteroides ováricos sobre el desarrollo de tumores de colon, se procedió a analizar varios aspectos entre ellos la incidencia tumoral. La incidencia se calculó como el porcentaje de ratas que presentaron tumores dentro del período estudiado. Los resultados se muestran en la figura VI.4.



Los grupos de ratas que presentaron incidencia más alta fueron los tratados con P4 y V, con un porcentaje de 93% y 90% respectivamente. Luego le siguieron los grupos tratados con E2 y E2+P4 con 85% cada uno y por último el grupo SHAM con presencia de tumores en el 80% de las ratas tratadas. Al realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre estos porcentajes, aunque se evidencia una tendencia a una disminución en la incidencia en los grupos donde está presente el E2.

#### **El tratamiento combinado de E2+P4 retardó el día de sacrificio**

Como los animales fueron sacrificados cuando aparecieron síntomas de la enfermedad, y a fin de contar con algún parámetro relacionado con la latencia, se compararon los días de sacrificio de los animales para analizar si había alguna diferencia entre los grupos. Los resultados se muestran en la figura VI.5.

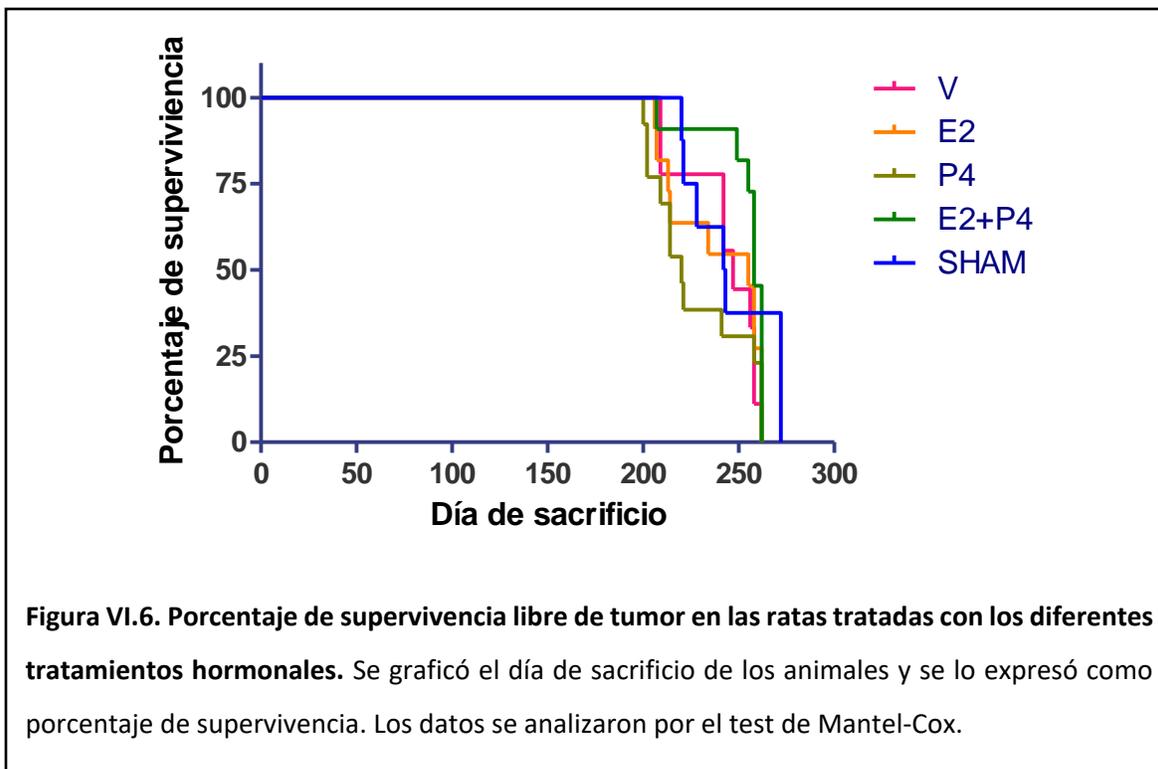


**Figura VI.5. Día de sacrificio de las ratas según los diferentes tratamientos hormonales.** Para sacrificar los animales, se tomó como parámetro la aparición de algún síntoma que diera cuenta de la presencia tumoral, como diarrea o pérdida de peso. Para aquellos que no presentaron síntomas, se tomó el día 270 desde la administración de DMH como final de experimento. \* $p < 0.05$  entre los grupos indicados con la barra. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls.

Se observó un promedio mayor del día de sacrificio para el grupo E2+P4 con respecto al grupo tratado sólo con P4 ( $p < 0.05$ ), lo que probablemente se relaciona a una mayor latencia de aparición de los tumores.

#### **El tratamiento hormonal no afecta la sobrevida libre de tumor**

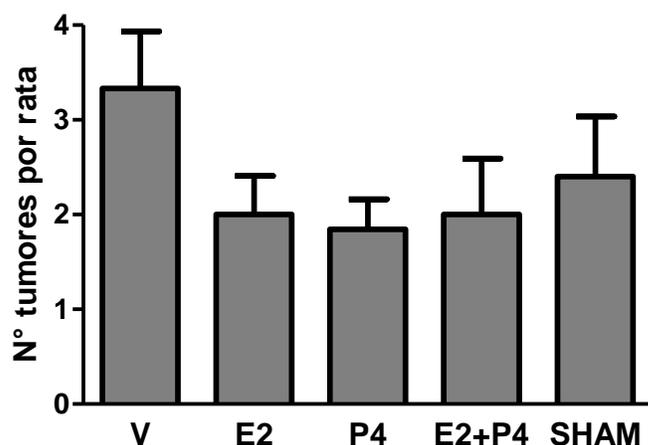
Se calculó el porcentaje de sobrevida libre de tumores en las ratas, según los diferentes tratamientos. Los resultados se muestran en la figura VI.6.



No se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos en las curvas de supervivencia.

### El tratamiento hormonal no produce cambios en el número de tumores

Para evaluar el efecto de los esteroides ováricos sobre el número de tumores de colon desarrollados en el modelo experimental, se procedió a contabilizar los tumores presentes en cada rata según los diferentes tratamientos. Los promedios del número de tumores por grupo se muestran en la figura VI.7.

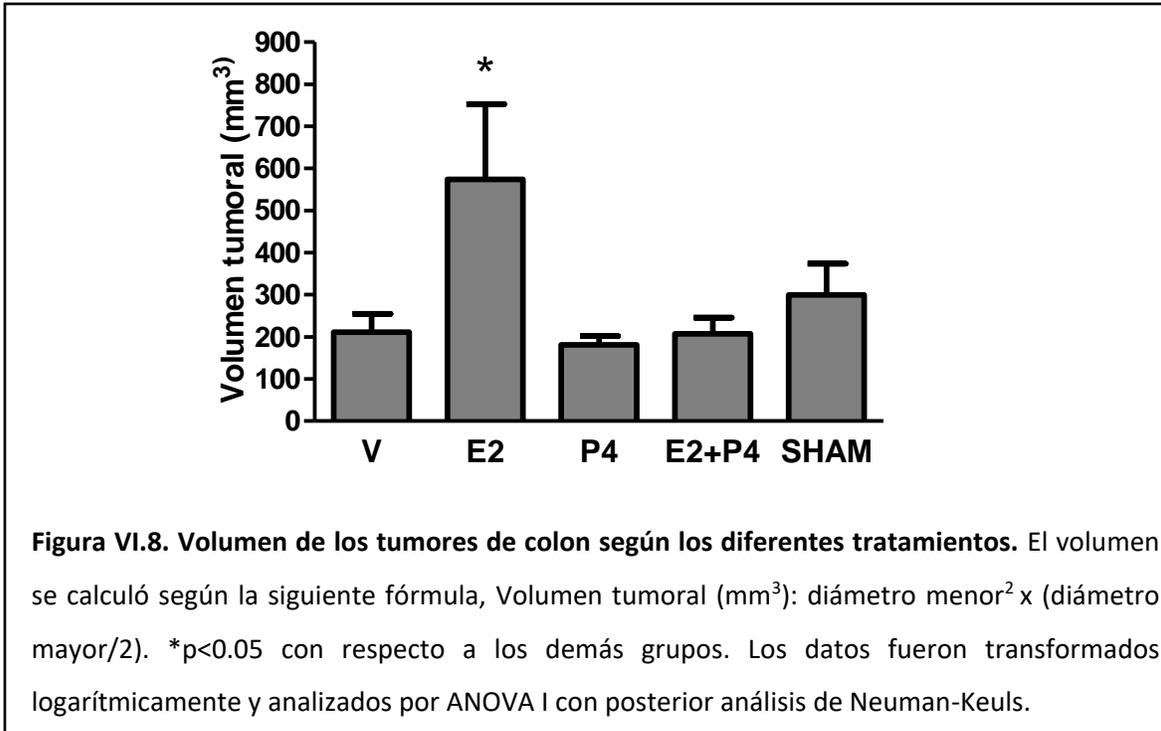


**Figura VI.7. Número de tumores de colon desarrollados por rata, según los diferentes tratamientos hormonales.** Al finalizar el experimento se contabilizaron la cantidad de tumores encontrados y se graficó el promedio obtenido para cada grupo experimental. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls.

No se observaron diferencias significativas entre la cantidad de tumores desarrollados por rata entre los diferentes tratamientos, aunque sí una tendencia de un mayor número en el grupo V. Esto podría sugerir un débil efecto protector de los esteroides ováricos sobre el desarrollo tumoral de colon.

### **El volumen de los tumores es aumentado por el tratamiento con E2**

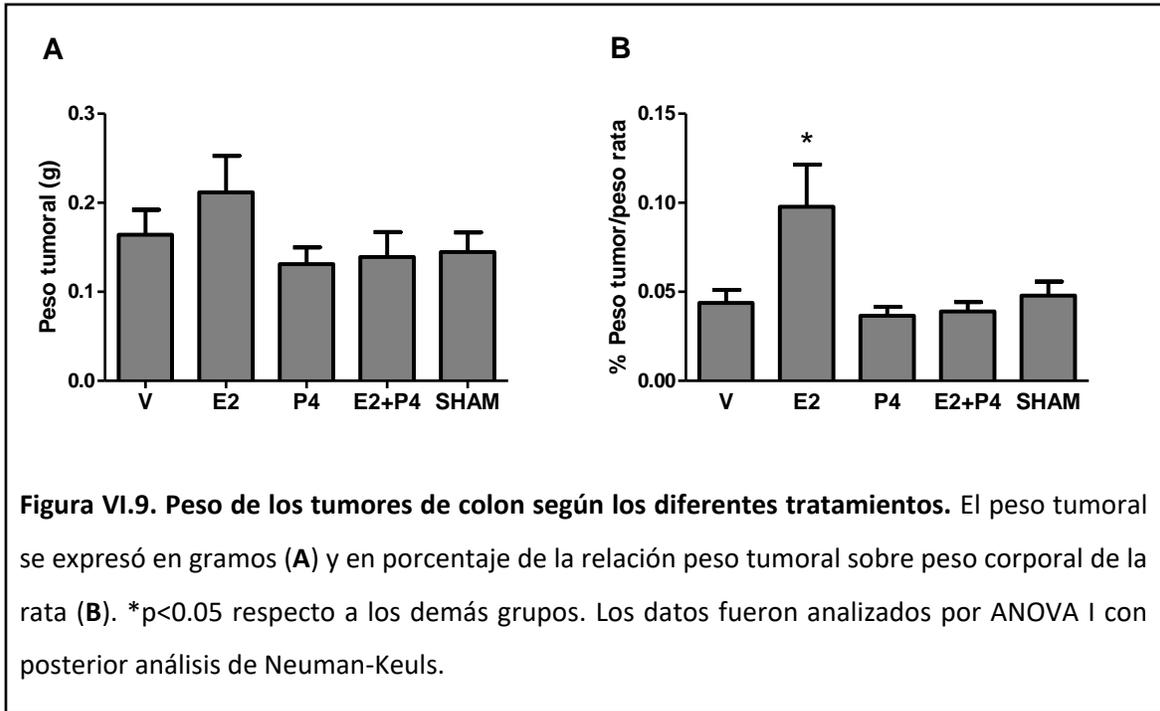
Al momento del sacrificio de los animales, los tumores fueron medidos con un calibre para obtener el diámetro mayor (DM) y menor (dm) y calcular el volumen tumoral ( $VT=dm^2 \times DM/2$ ). Los resultados se muestran en la figura VI.8.



Se observó que los tumores del grupo E2 presentaron un mayor volumen con respecto a los demás grupos (p<0.05). Esto indica que el tratamiento con E2 aumentaría la proliferación de los tumores de colon, pero dicho efecto sería revertido ante la presencia de P4.

#### **El tratamiento con E2 produce tumores más pesados**

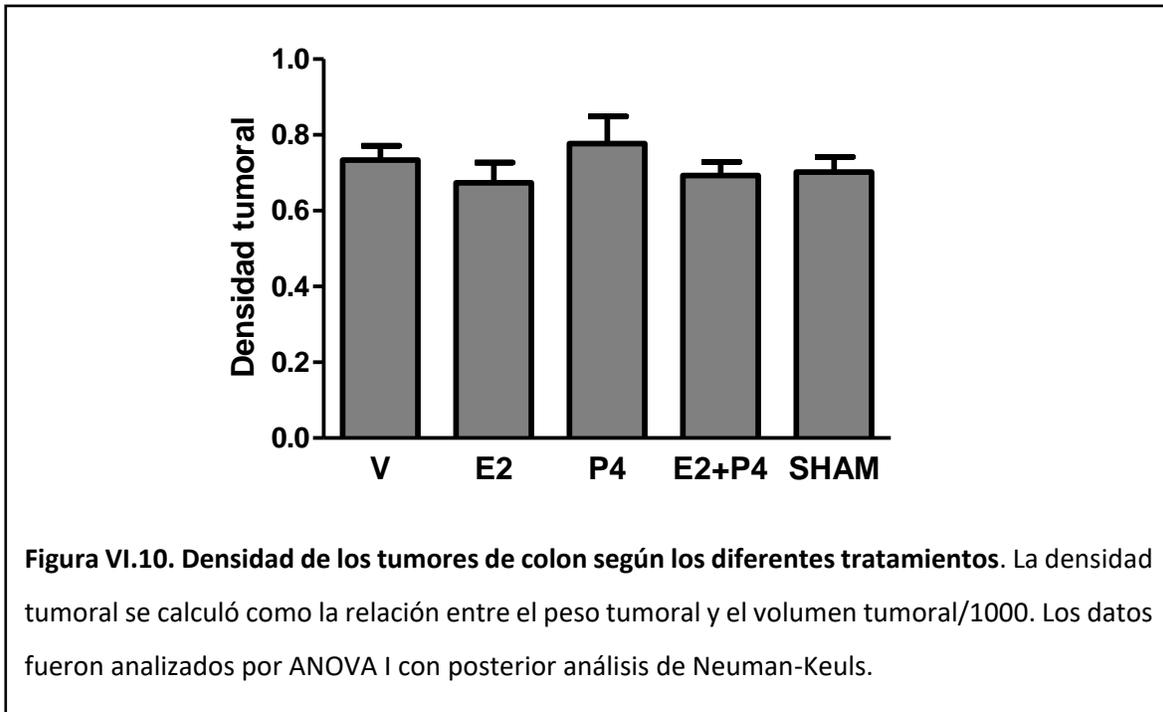
Al momento del sacrificio se pesaron todos los tumores obtenidos. Los datos se expresaron en valores absolutos y por cada 100 g de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura VI.9.



Los tumores del grupo tratado con E2 fueron más pesados que los provenientes de los demás grupos ( $p < 0.05$ ). Este resultado se correlaciona con el mayor volumen tumoral observado anteriormente.

#### La densidad tumoral es similar en todos los tratamientos

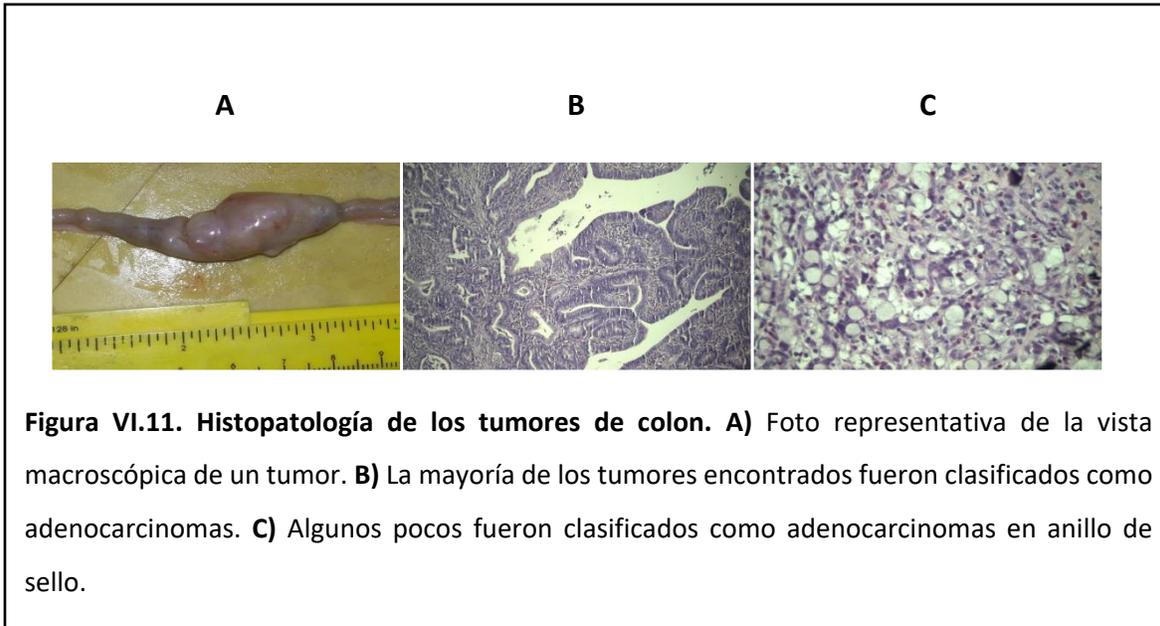
Otro de los parámetros analizados fue la densidad tumoral, la cual se calculó como la relación entre el peso tumoral y el volumen tumoral/1000. Los resultados se muestran en la figura VI.10.



No se observó diferencia significativa entre las densidades de los tumores provenientes de los grupos experimentales.

**Los tumores fueron clasificados en su mayoría como adenocarcinomas**

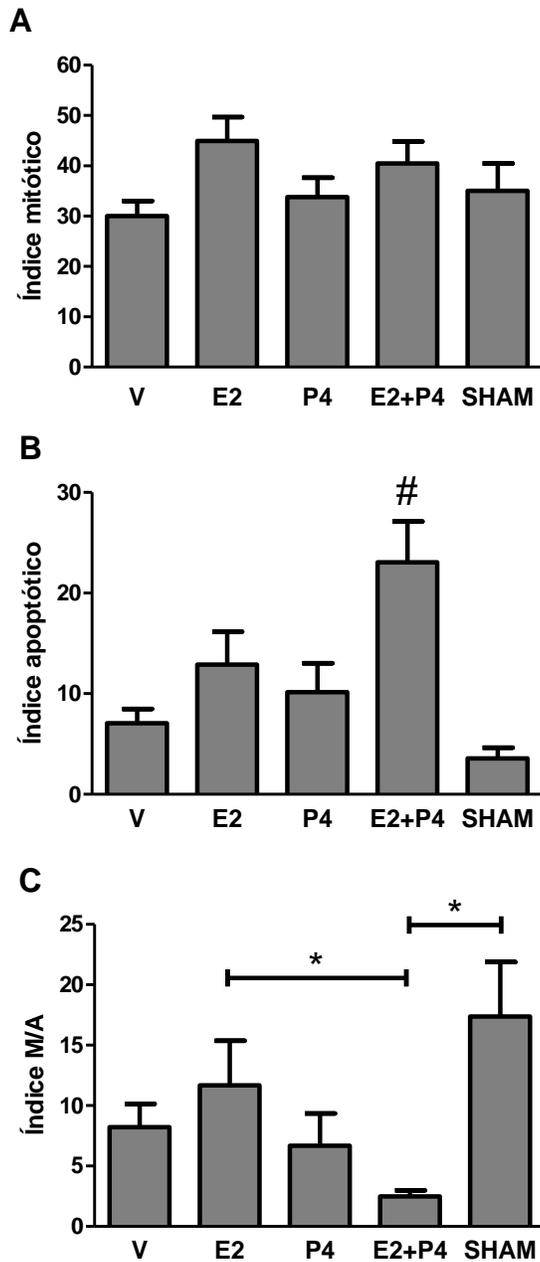
Con el fin de evaluar la clasificación de los tumores de colon, se realizó el estudio histopatológico de los mismos. Se encontró que la mayoría de los tumores fueron clasificados como adenocarcinomas, algunos diferenciados y otros totalmente indiferenciados, con diferentes componentes infiltrante e in situ, infiltrado inflamatorio y de diferente grado. Unos pocos tumores fueron clasificados como adenocarcinomas en anillo de sello. En la figura VI.11 se muestran algunos de ellos.



**Figura VI.11. Histopatología de los tumores de colon. A)** Foto representativa de la vista macroscópica de un tumor. **B)** La mayoría de los tumores encontrados fueron clasificados como adenocarcinomas. **C)** Algunos pocos fueron clasificados como adenocarcinomas en anillo de sello.

#### **Los tumores del grupo E2+P4 presentan menor índice mitosis/apoptosis**

Para continuar el análisis de la influencia de los esteroides ováricos sobre la progresión tumoral, se determinaron los índices mitótico y apoptótico en los tumores por microscopía óptica. Para ello se contaron la cantidad de figuras mitóticas y apoptóticas presentes en diez campos analizados por microscopía a 400 x. La relación entre el índice mitótico y apoptótico (M/A) se calculó dividiendo el índice mitótico sobre el apoptótico de cada tumor. Los resultados se muestran en la figura VI.12.

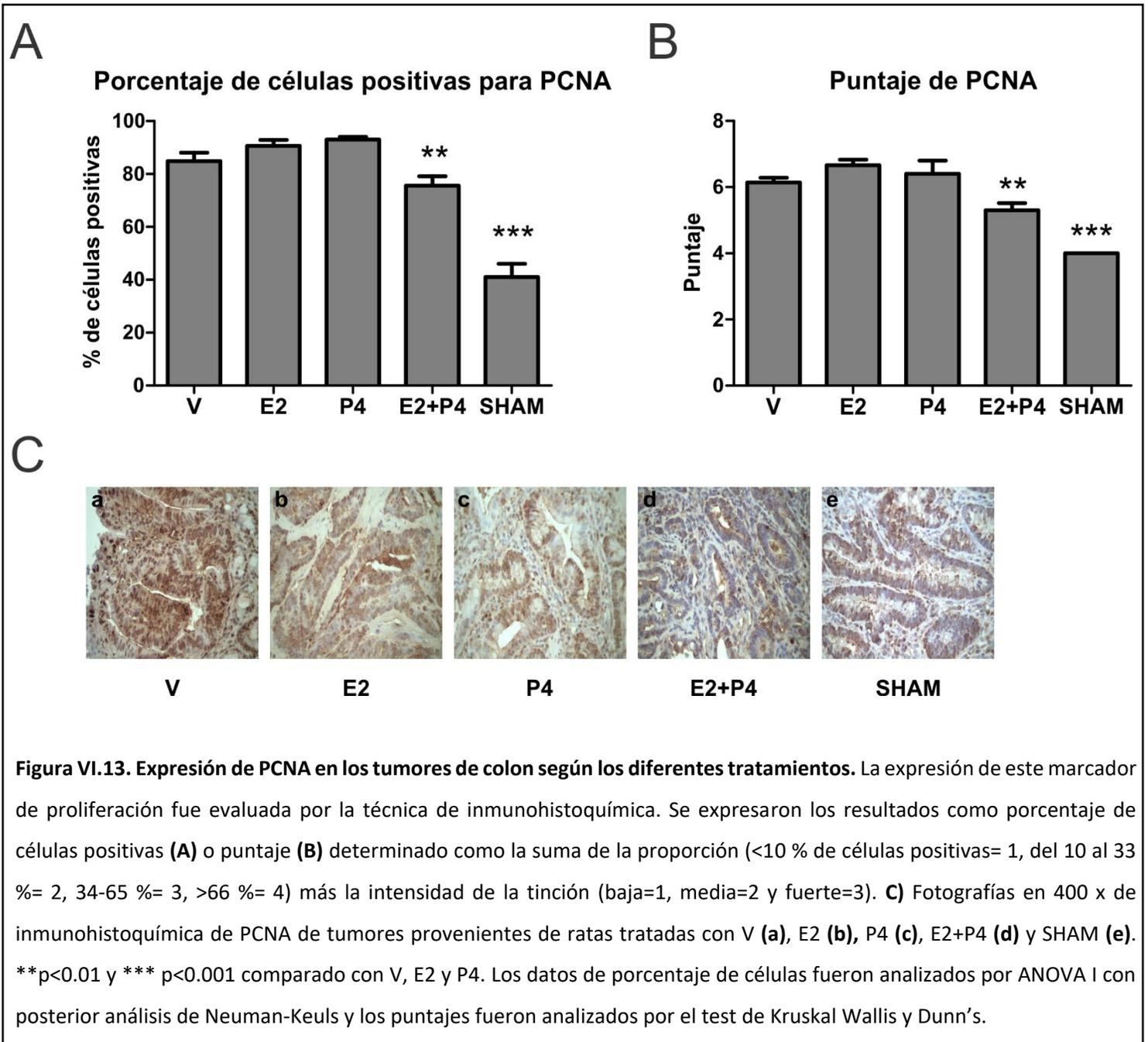


**Figura VI.12. Índices mitótico y apoptótico en los tumores de colon. A)** Índice mitótico calculado como cantidad de figuras mitóticas presentes en diez campos analizados por microscopía a 400 x. **B)** Índice apoptótico calculado como cantidad de figuras apoptóticas presentes en diez campos analizados por microscopía a 400 x. **C)** Relación entre el índice mitótico y apoptótico (M/A). # $p < 0.05$  respecto a los demás grupos; \* $p < 0.05$  entre los grupos indicados por las barras. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls.

No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos en cuanto a la mitosis. Con respecto a la apoptosis, el tratamiento combinado produjo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto a los demás grupos. Al hacer la relación entre ambos índices (M/A), se observó un aumento del mismo en los grupos E2 y SHAM con respecto al grupo E2+P4 ( $p < 0.05$ ). Por lo tanto, el tratamiento sólo con E2 promovería la proliferación mientras que E2+P4 promovería la apoptosis en los tumores de colon.

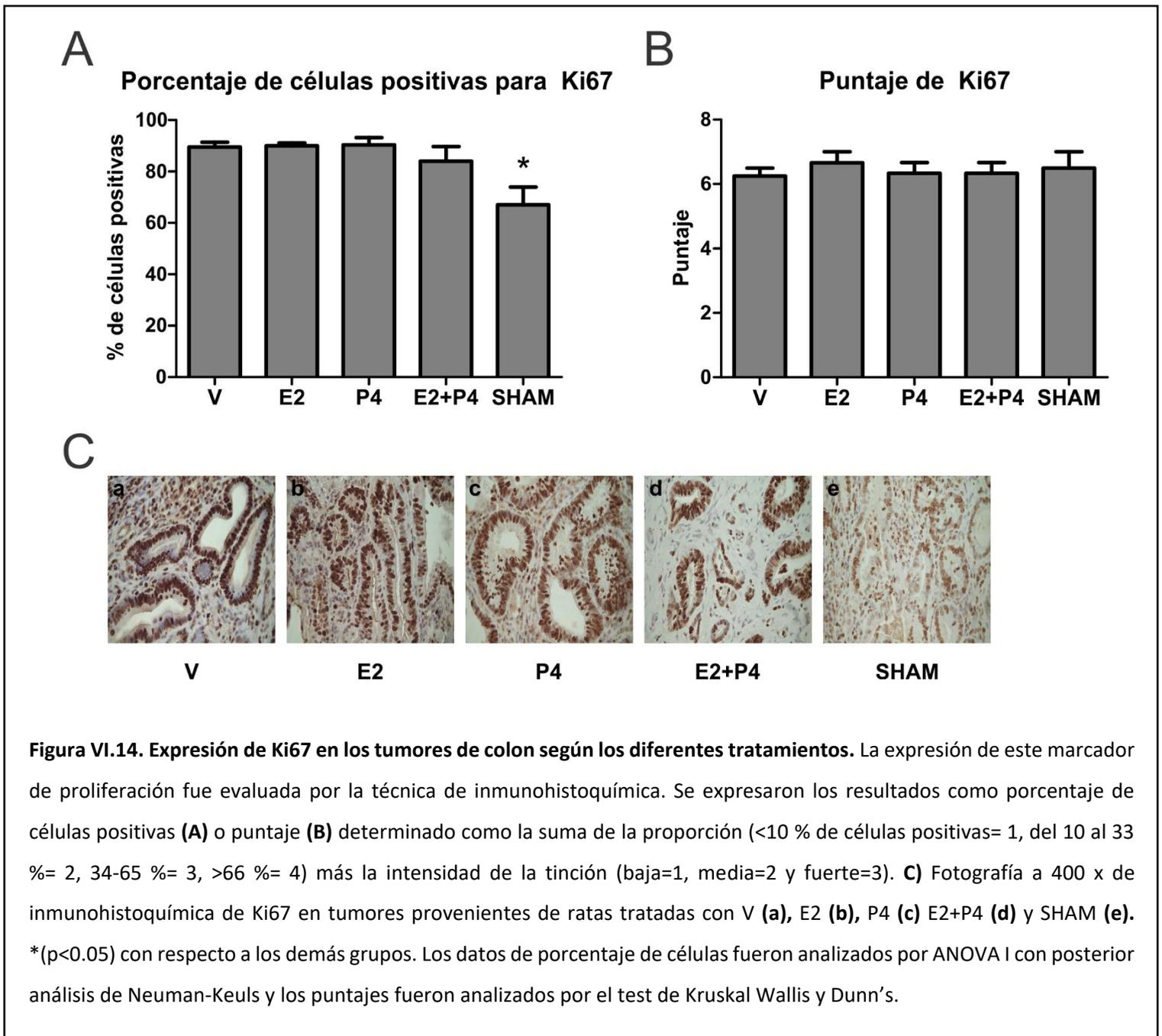
### **El tratamiento con E2+P4 disminuye la expresión de PCNA**

Para profundizar el estudio del efecto de los esteroides ováricos sobre la proliferación tumoral, se analizaron los marcadores PCNA y Ki67 por inmunohistoquímica, como se describe en el capítulo de materiales y métodos. Los resultados se presentan en las figuras VI.13 y VI.14.



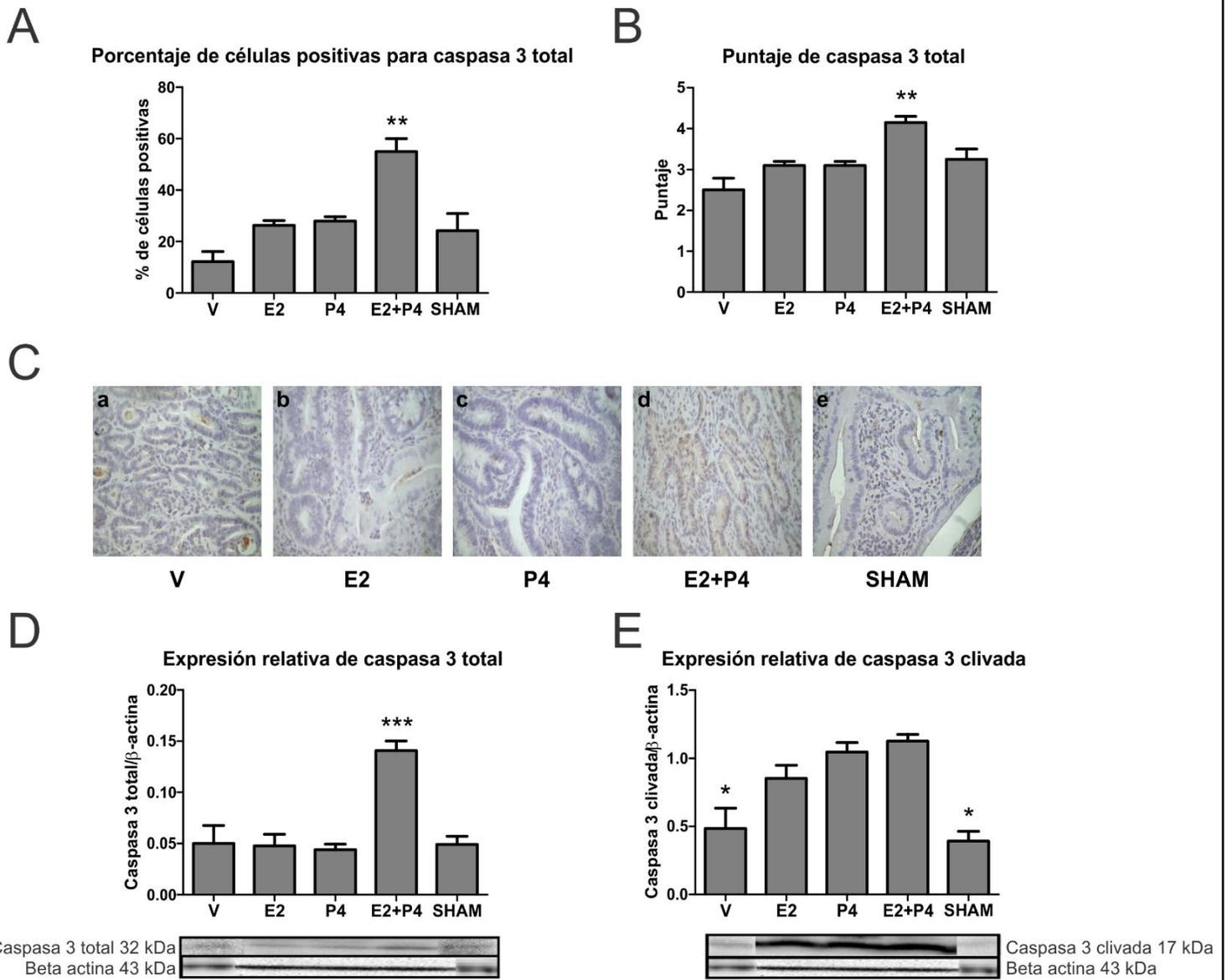
Se observó que el grupo E2+P4 presentó una menor expresión de PCNA con respecto a los demás grupos ( $p < 0.01$ ). Para el grupo SHAM se observó una expresión aún menor de PCNA con respecto a todos los grupos tratados ( $p < 0.001$ ). No se observaron diferencias entre los grupos V, E2 y P4.

Con respecto a la expresión de otro marcador de proliferación, el Ki67, se observó diferencia significativa solamente en el grupo SHAM con respecto a los otros grupos cuando se analizaron los porcentajes ( $p < 0.05$ ).



### **El tratamiento combinado aumenta la expresión de caspasa 3**

Ya que se observaron cambios en la apoptosis celular en los tumores, se analizó la expresión de diversas proteínas asociadas a dicha forma de muerte celular programada. En este caso, en la figura VI.15 se muestran los resultados para caspasa 3, tanto por inmunohistoquímica para la forma total, como por Western blot para la forma clivada (para más detalles, ver materiales y métodos).

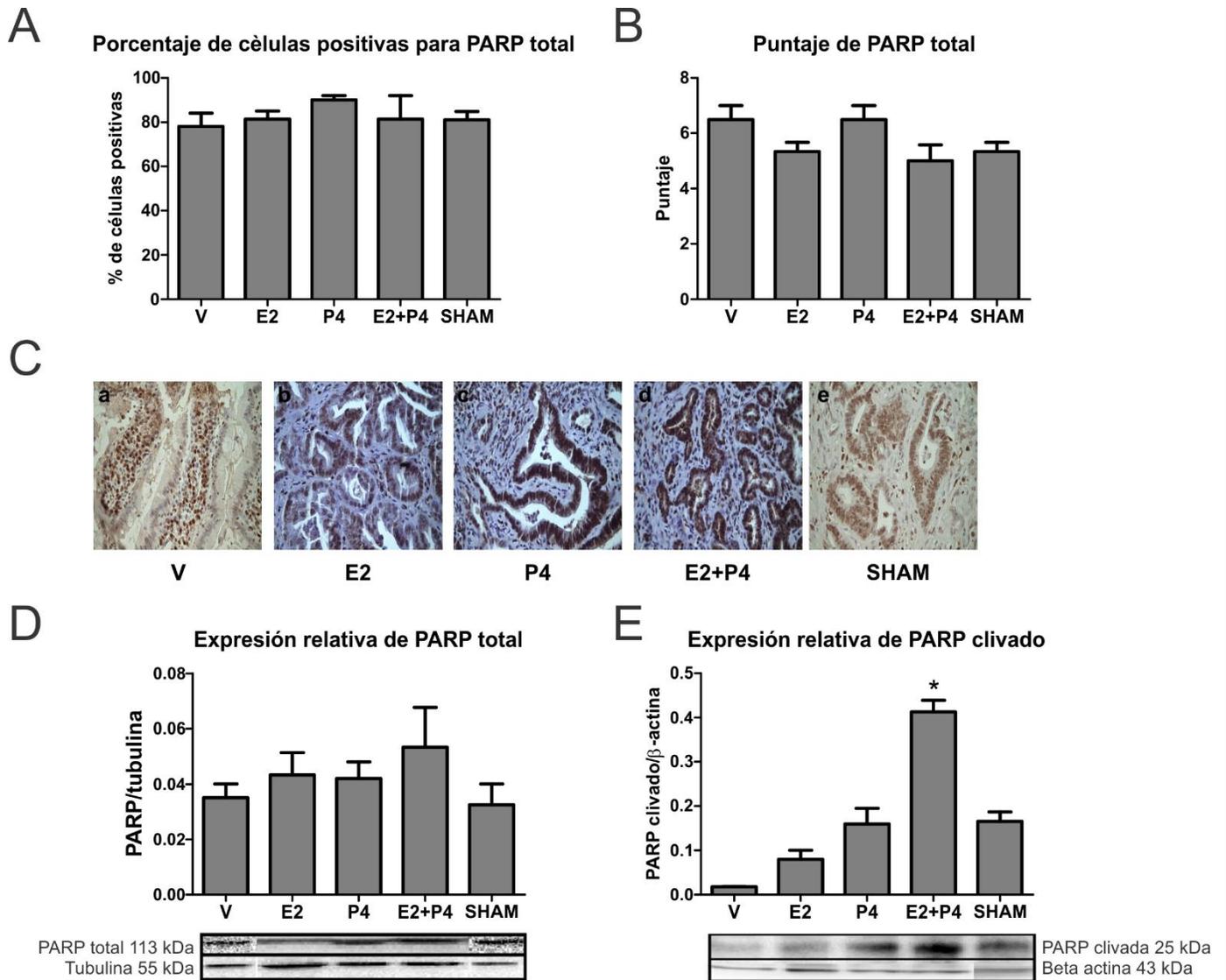


**Figura VI.15. Expresión de caspasa 3 en los tumores de colon según los diferentes tratamientos.** Se midió la expresión de caspasa 3 total por inmunohistoquímica. Se expresaron los resultados como porcentaje de células positivas (A) o puntaje (B) determinado como la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) más la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). C) Fotografía a 400 x de inmunohistoquímica de caspasa 3 total en tumores provenientes de ratas tratadas con V (a), E2 (b), P4 (c), E2+P4 (d) y SHAM (e). D) Expresión de caspasa 3 total en tumores de colon evaluada por Western blot. E) Expresión de caspasa 3 clivada en tumores de colon evaluada por Western blot. Las bandas fueron normalizadas con Beta actina. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , con respecto a los demás grupos. Los datos de porcentaje de células y Western Blot fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls y los puntajes de las inmunohistoquímicas fueron analizados por el test de Kruskal Wallis y Dunn's.

El tratamiento con E2+P4 aumentó la expresión de caspasa 3 total con respecto a los demás grupos, demostrado tanto por inmunohistoquímica como por Western blot ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  respectivamente). En cuanto a la expresión de caspasa 3 clivada, los grupos E2, P4 y E2+P4 presentaron una mayor expresión con respecto a los grupos V y SHAM ( $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias en la expresión de caspasa 3 clivada entre los tratamientos hormonales. Estos resultados sugieren la activación del proceso apoptótico por el tratamiento con E2 y P4.

### **El tratamiento con E2+P4 aumenta la expresión de PARP clivado**

Ya que una de las proteínas blanco de la activación de la caspasa 3 es PARP, se determinó su expresión por inmunohistoquímica y Western blot para la forma total, y por Western blot para la forma clivada (para más detalles, ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura VI.16.

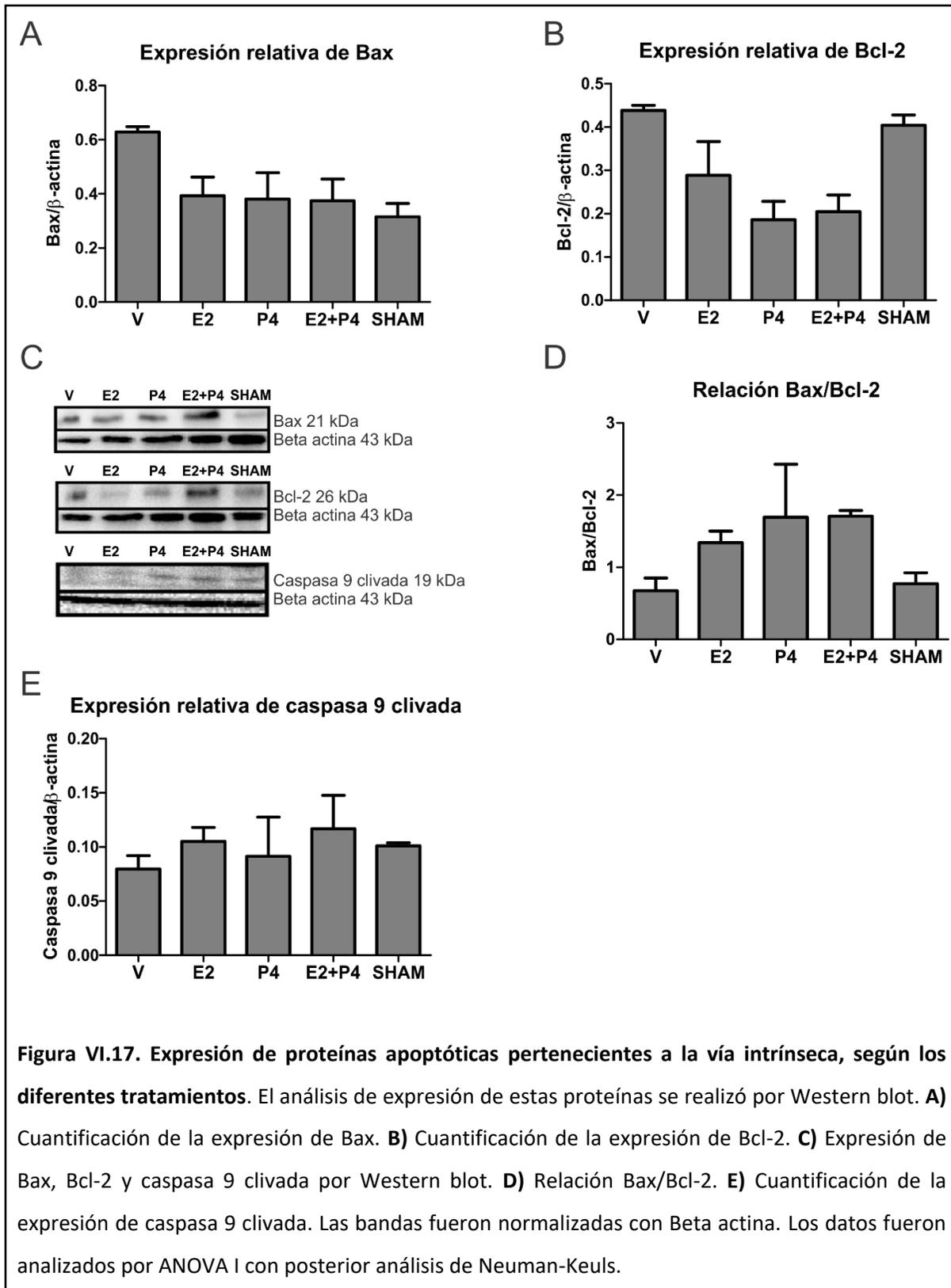


**Figura VI.16. Expresión de PARP total y clivado según los diferentes tratamientos hormonales.** Se midió la expresión de PARP total en los tumores de colon por inmunohistoquímica. Se expresaron los resultados como porcentaje de células positivas **(A)** o puntaje **(B)** determinado como la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) más la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). **(C)** Fotografía a 400 x de inmunohistoquímica de PARP total en tumores provenientes de ratas tratadas con V **(a)**, E2 **(b)**, P4 **(c)**, E2+P4 **(d)** y SHAM **(e)**. **(D)** Expresión de PARP total por Western blot. **(E)** Expresión de PARP clivado por Western blot. La intensidad de bandas fue normalizada con tubulina y Beta actina. \* $p < 0.05$  con respecto a los demás grupos. Los datos de porcentaje de células y Western Blot fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls y los puntajes de las inmunohistoquímicas fueron analizados por el test de Kruskal Wallis y Dunn's.

No se observaron cambios en la expresión de PARP total entre los diferentes tratamientos, pero sí un aumento de la expresión de PARP clivado por el tratamiento combinado ( $p < 0.05$ ) con respecto a los demás grupos. Este resultado confirma la inducción de la apoptosis por E2+P4.

**La apoptosis en el tratamiento combinado no es llevada a cabo por la vía intrínseca**

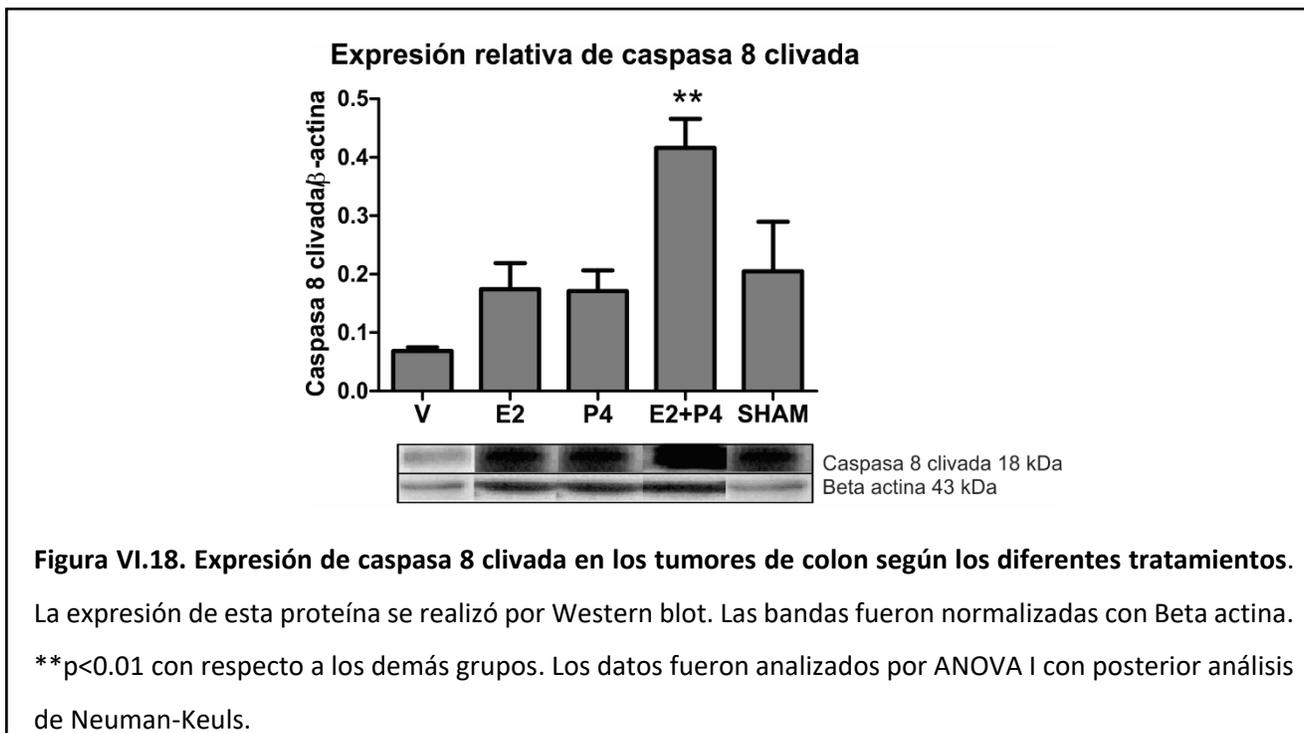
Para dilucidar por qué vía se produjo la apoptosis en los tumores del grupo E2+P4, se analizaron las proteínas de la familia Bcl-2 y la caspasa 9 por Western blot (para más detalles ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura VI.17.



No se observaron diferencias en la expresión de Bax, Bcl-2 y caspasa 9 clivada entre los tumores de los diferentes tratamientos, sugiriendo que la vía intrínseca no está involucrada en la apoptosis producida por E2+P4 en los tumores de colon.

### El tratamiento E2+P4 produce apoptosis por la vía extrínseca

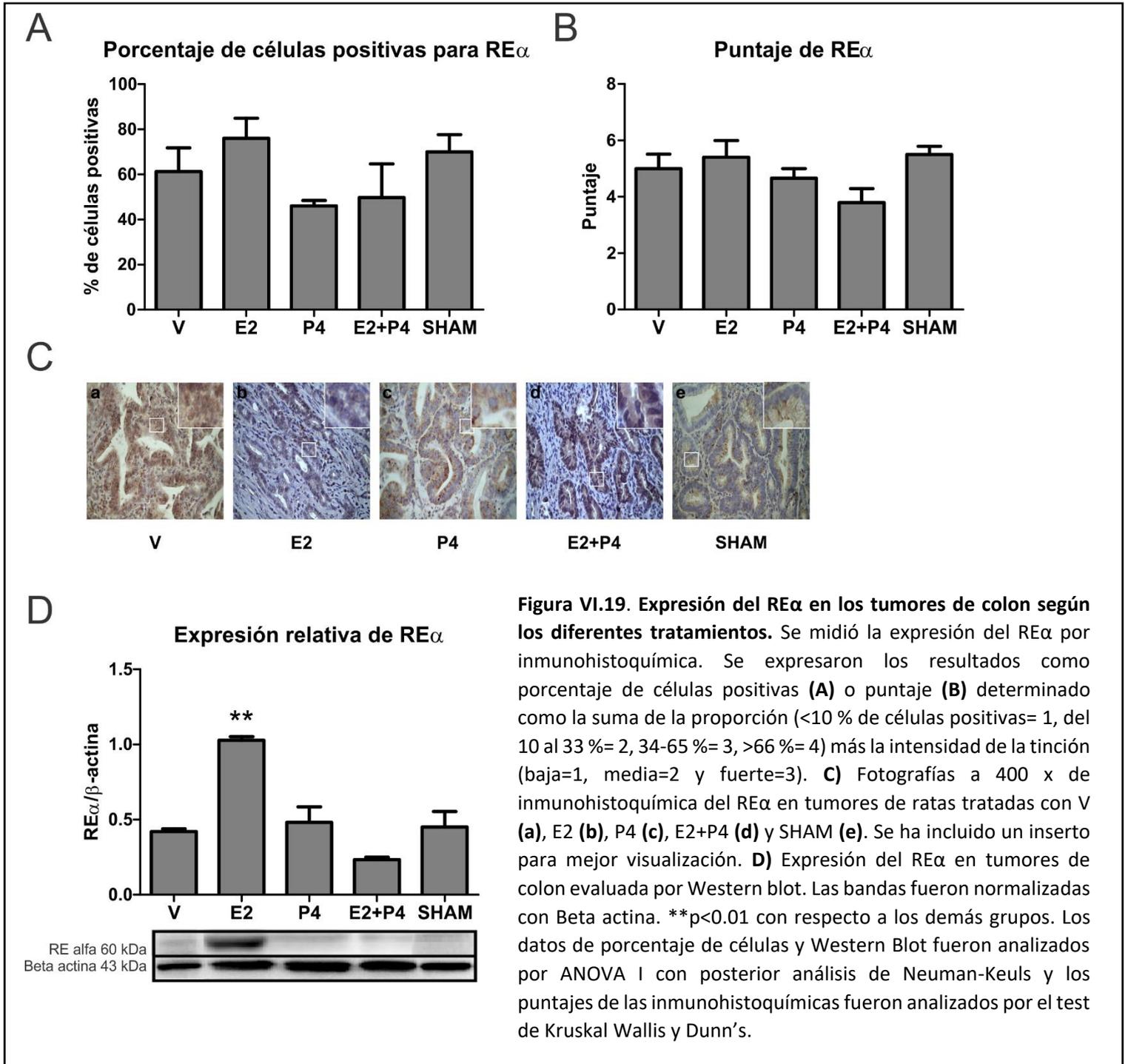
Luego se analizó la expresión de la caspasa 8 clivada por Western blot (para más detalles ver materiales y métodos), para determinar si la apoptosis observada en los tumores del tratamiento combinado era conducida por la vía extrínseca. Los resultados se muestran en la figura VI.18.



Se observó un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en la expresión de caspasa 8 clivada en los tumores del grupo E2+P4 con respecto a los demás grupos. Por lo tanto, se sugiere que la vía extrínseca está involucrada en el proceso apoptótico producido por el tratamiento con E2+P4 en los tumores de colon.

### El tratamiento con E2 aumenta la expresión del REα

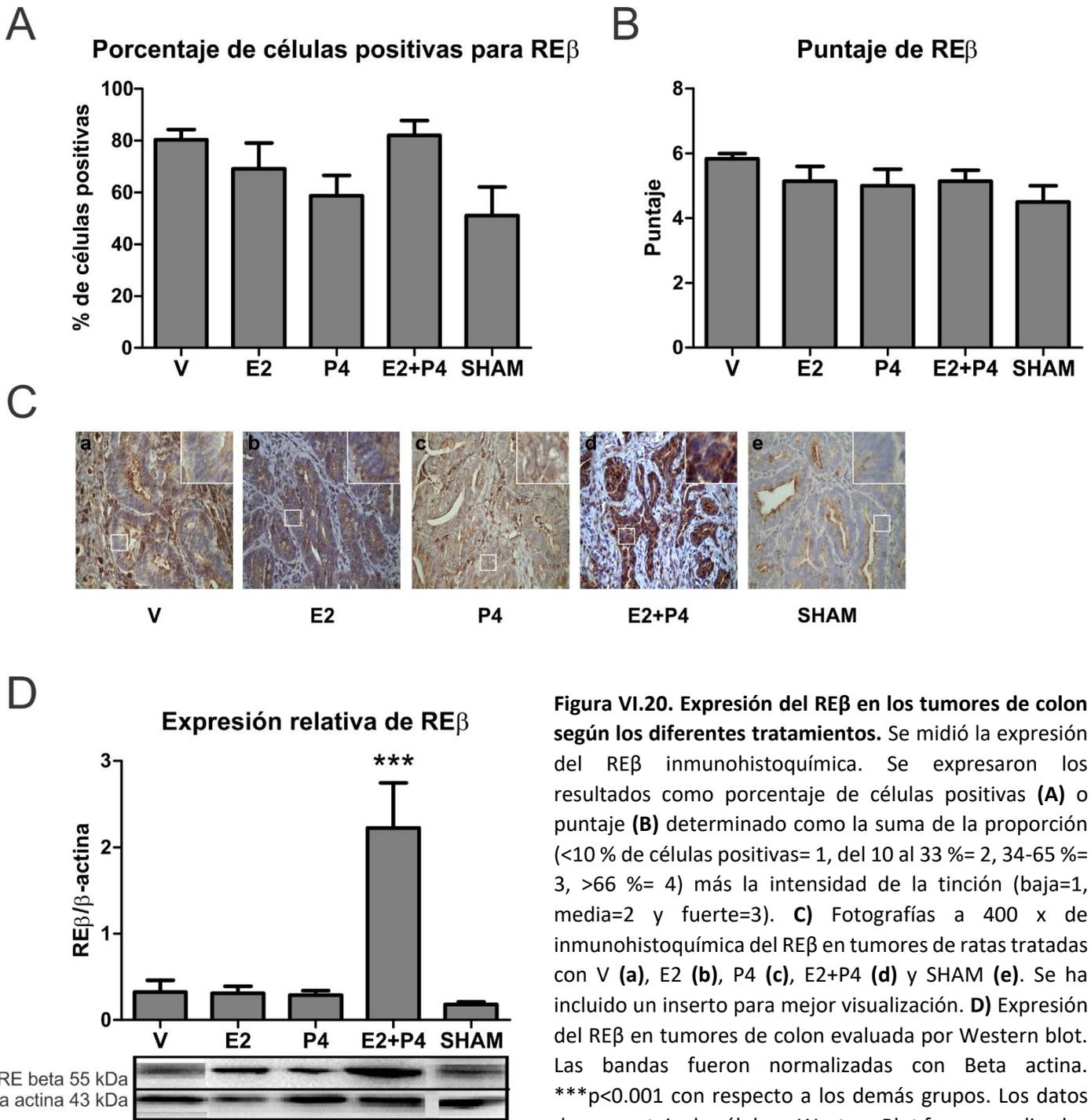
Para analizar el estado de los receptores hormonales, responsables de la acción intracelular de los esteroides ováricos, se cuantificó la expresión de los mismos por inmunohistoquímica y Western blot (para más detalles ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura VI.19.



Por inmunohistoquímica no se observaron diferencias en la expresión del RE $\alpha$  entre los diferentes tratamientos. Sí se determinó su localización en el citoplasma de las células epiteliales tumorales de colon en todos los tratamientos. Al analizar los resultados del Western blot, se observó un aumento de la expresión del RE $\alpha$  en los tumores provenientes del tratamiento con E2 con respecto a los demás grupos ( $p < 0.01$ ). No se observaron diferencias entre el resto de los tratamientos.

### **El tratamiento con E2+P4 aumenta la expresión del RE $\beta$**

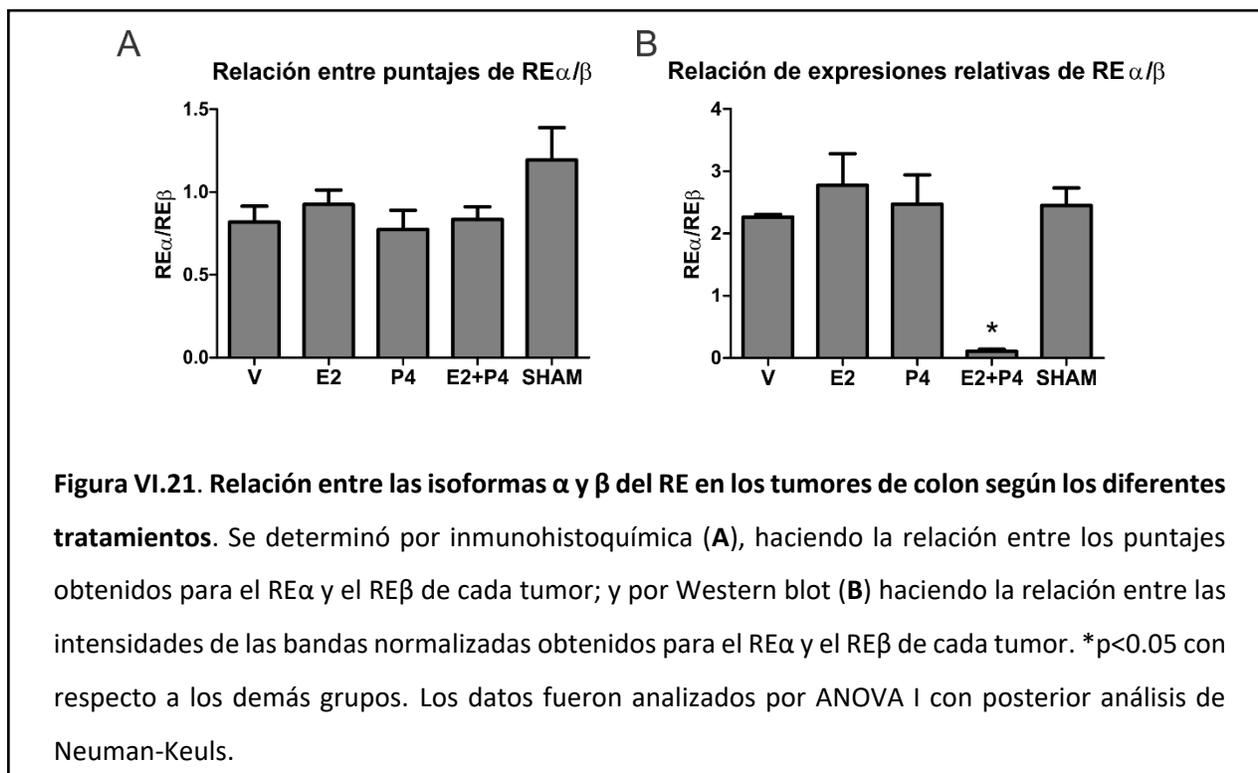
Luego se analizó la expresión de otra de las isoformas del RE, la isoforma  $\beta$  en los tumores de colon por inmunohistoquímica y Western blot (para más detalles ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura VI.20.



**Figura VI.20. Expresión del REβ en los tumores de colon según los diferentes tratamientos.** Se midió la expresión del REβ inmunohistoquímica. Se expresaron los resultados como porcentaje de células positivas (**A**) o puntaje (**B**) determinado como la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) más la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). **C**) Fotografías a 400 x de inmunohistoquímica del REβ en tumores de ratas tratadas con V (**a**), E2 (**b**), P4 (**c**), E2+P4 (**d**) y SHAM (**e**). Se ha incluido un inserto para mejor visualización. **D**) Expresión del REβ en tumores de colon evaluada por Western blot. Las bandas fueron normalizadas con Beta actina. \*\*\*p<0.001 con respecto a los demás grupos. Los datos de porcentaje de células y Western Blot fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls y los puntajes de las inmunohistoquímicas fueron analizados por el test de Kruskal Wallis y Dunn's.

Por inmunohistoquímica no se observaron diferencias en la expresión del RE $\beta$  entre los diferentes tratamientos, pero sí una localización citoplasmática del mismo en las células epiteliales tumorales de colon de todos los tratamientos. Por Western blot se observó un consistente aumento en la expresión del RE $\beta$  en los tumores de colon bajo el tratamiento combinado de E2+P4 con respecto a los demás grupos ( $p < 0.001$ ). No se observaron diferencias entre el resto de los tratamientos.

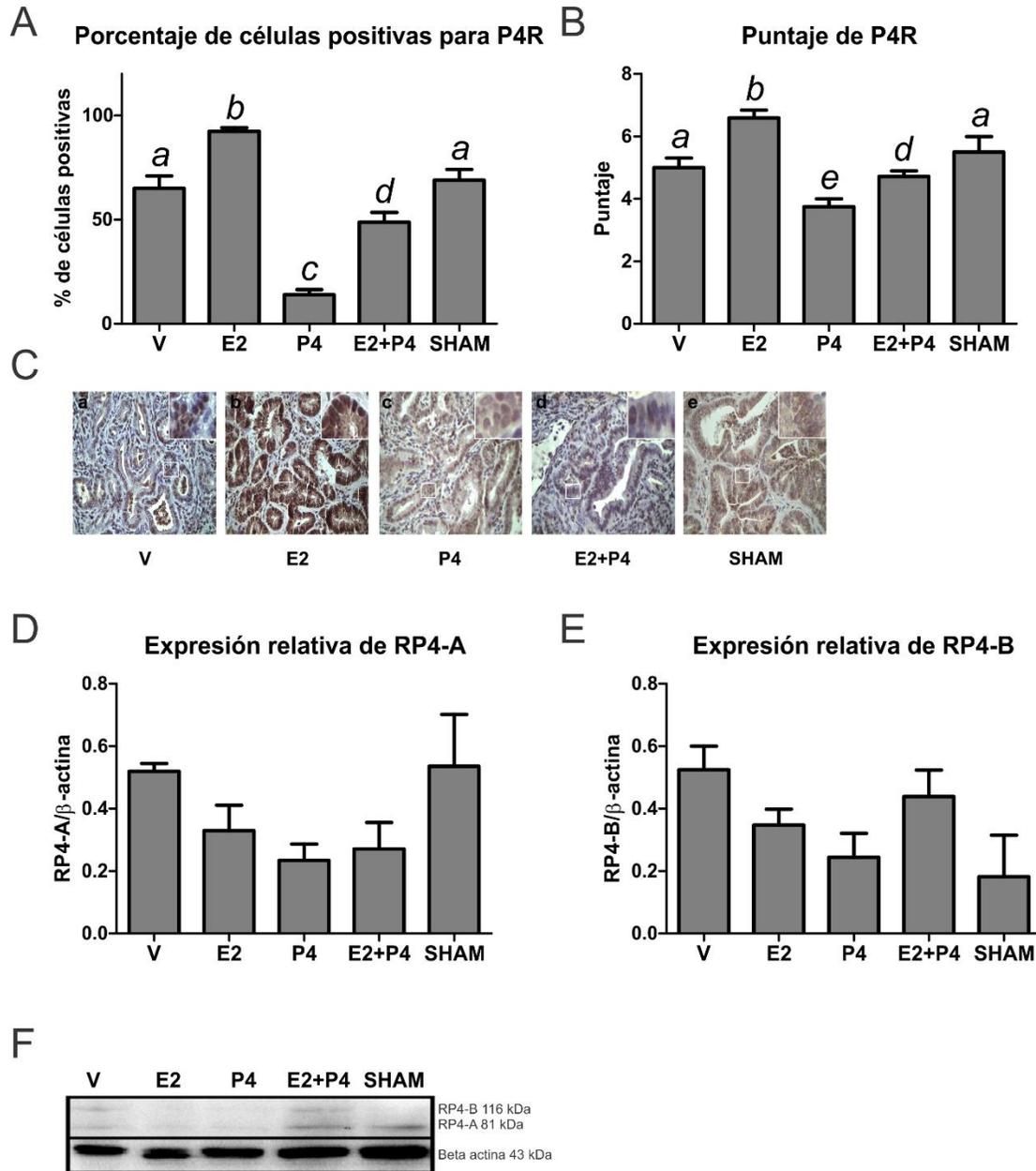
Al hacer la relación entre ambas isoformas del receptor, no se observaron diferencias por inmunohistoquímica, pero sí se pudo observar por Western blot una menor relación RE $\alpha/\beta$  ( $p < 0.05$ ) para los tumores provenientes del tratamiento combinado con respecto a los demás grupos.



### El tratamiento con E2 induce la expresión del receptor de progesterona

Como uno de los efectos de E2 es regular la expresión de los RP4, y además, como los RE están regulados por RP4, se analizó la expresión de estos por inmunohistoquímica.

Además, se determinaron las isoformas A y B del RP4 por Western blot (para más detalles ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura VI.22.



**Figura VI.22. Expresión del RP4 en los tumores de colon.** Se midió la expresión del RP4 por inmunohistoquímica. Porcentaje de células positivas (A) o puntaje (B). C) Fotografía a 400 x de inmunohistoquímica del RP4 en tumores de ratas tratadas con V (a), E2 (b), P4 (c), E2+P4 (d) y SHAM (e). Se ha incluido un inserto para mejor visualización. D) Cuantificación de la expresión del RP4-A y E) cuantificación de la expresión del RP4-B por Western blot. F) Expresión de las isoformas del RP4 por Western blot. Las bandas fueron normalizadas con Beta actina. *b*  $p < 0.05$  comparado con *a*. *c*  $p < 0.001$  comparado con todos los grupos. *d*  $p < 0.01$  comparado con *b* y *c*, y  $p < 0.05$  comparado con *a*. *e*  $p < 0.05$  comparado con todos los grupos. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls y los puntajes de las inmunohistoquímicas fueron analizados por el test de Kruskal Wallis y Dunn's.

Al analizar el porcentaje de células positivas para el RP4, se observó que el tratamiento con E2 produjo un aumento del RP4 con respecto a los grupos P4 y E2+P4 ( $p < 0.001$ ); y con respecto a los grupos V y SHAM ( $p < 0.01$ ). Por otro lado, el tratamiento con P4 disminuyó la expresión de su receptor con respecto a todos los grupos ( $p < 0.001$ ). El tratamiento con E2+P4 produjo un aumento de la expresión del RP4 con respecto al tratamiento con P4 ( $p < 0.001$ ), pero una disminución con respecto a E2 ( $p < 0.001$ ), y SHAM y V ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias entre los grupos control V y SHAM.

Al analizar el puntaje de RP4, se observó que el tratamiento con E2 produjo un aumento del RP4 con respecto a los grupos P4 y E2+P4 ( $p < 0.001$ ); y con respecto a los grupos V y SHAM ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, el tratamiento con P4 disminuyó la expresión de su receptor con respecto a todos los grupos ( $p < 0.05$ ). El tratamiento con E2+P4 produjo un aumento de la expresión del RP4 con respecto al tratamiento con P4 ( $p < 0.05$ ), pero una disminución con respecto a E2 ( $p < 0.001$ ). No se observaron diferencias entre los grupos control V y SHAM. La localización del receptor se observó tanto en citoplasma como núcleo en todos los grupos.

En cuanto a la expresión de las isoformas del receptor determinadas por Western blot, no se observaron diferencias entre los grupos.

## **CAPÍTULO VII**

### **RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°2**

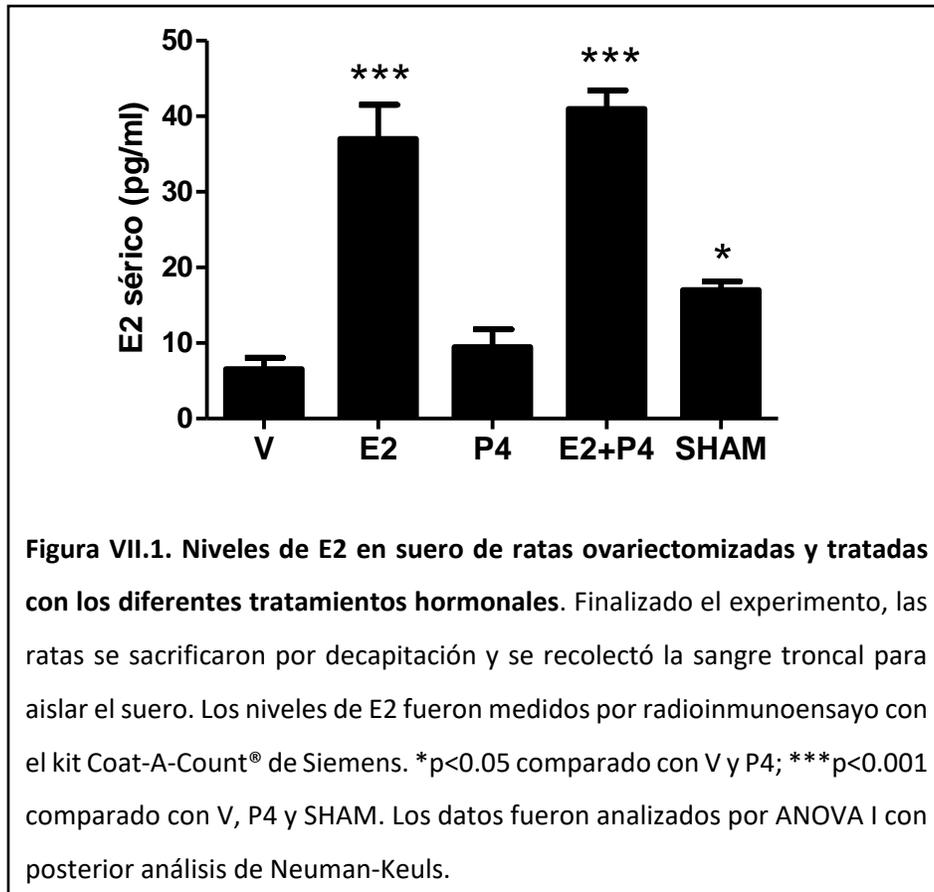
**Objetivo específico N°2:** Determinar la regulación hormonal que ejercen los esteroides ováricos sobre la proliferación y la apoptosis en un modelo experimental de cáncer de mama en ratas ovariectomizadas y tratadas con 17- $\beta$ -estradiol y progesterona.

#### **RESULTADOS**

**Las dosis administradas de 17- $\beta$ -estradiol y progesterona correspondientes a la terapia de reemplazo hormonal se encuentran dentro de los valores fisiológicos**

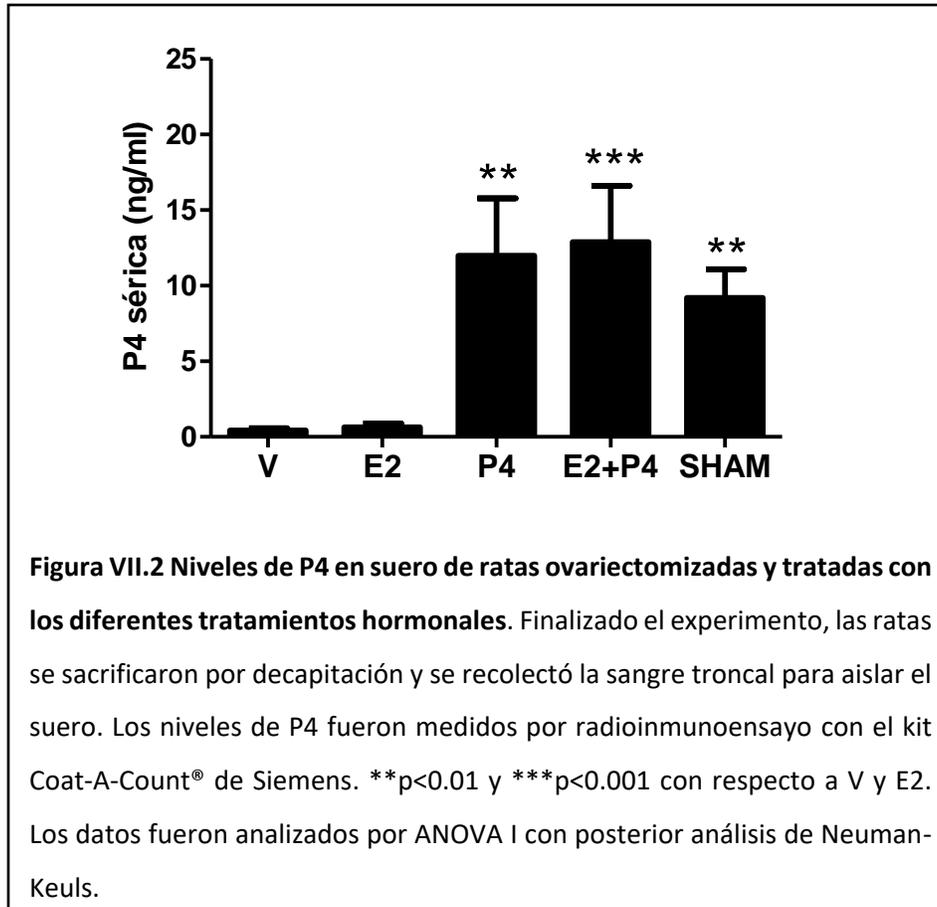
Para estudiar la regulación que ejercen los esteroides ováricos sobre la tumorigénesis mamaria en un modelo de menopausia y terapia de reemplazo hormonal, se utilizaron ratas hembras Sprague Dawley de 55 días de edad a las cuales se les administró el carcinógeno 7,12-Dimetilbenz[ $\alpha$ ]antraceno (DMBA (Sigma) 15 mg/rata) (día 0) por sonda intragástrica conectada a jeringa de 3 ml y en el día 30 fueron ovariectomizadas (OVX) o sometidas a operación simulada de ovariectomía (SHAM, N=13). A partir del día 37 las ratas OVX fueron inyectadas subcutáneamente dos veces a la semana con estradiol (E2, 60  $\mu$ g/kg, N=10), progesterona (P4, 10 mg/kg, N=9), E2 y P4 (E2+P4, a las mismas dosis, N=8) o vehículo (V, aceite vegetal, N=9) hasta el momento de su sacrificio. Los animales fueron pesados y observados semanalmente hasta la aparición de tumores palpables de mama. Las ratas que desarrollaron tumores fueron sacrificadas cuando los tumores alcanzaron un volumen superior a 1000 mm<sup>3</sup> y el resto fue sacrificado a los 240 días de experimento, por decapitación. Finalizado el experimento se procedió a medir la concentración de dichas hormonas en suero por radioinmunoensayo. En el caso del grupo SHAM, los animales fueron sacrificados en diestro, ya que los niveles hormonales se encuentran en concentraciones basales en este día del ciclo estral. En cambio, en los diferentes tratamientos al no producirse el ciclo hormonal, los animales fueron sacrificados el día que

debían recibir la dosis correspondiente de hormona. Los resultados se muestran en las figuras VII.1 y VII.2.



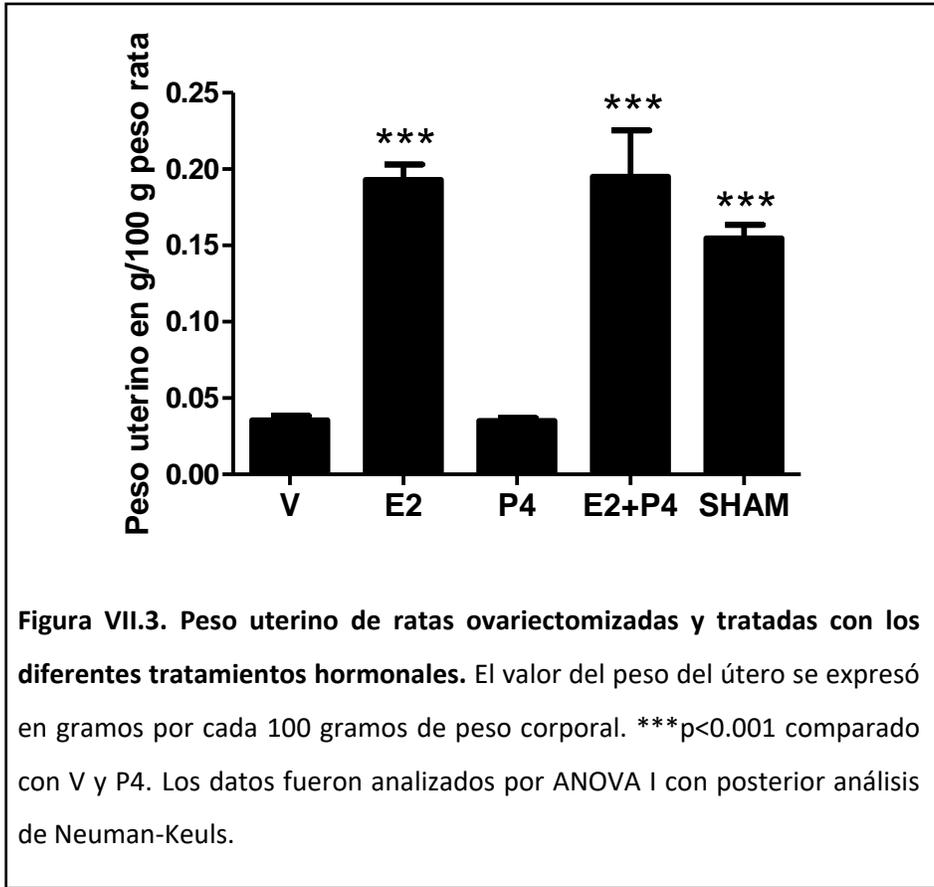
Se observó que los grupos tratados con E2 y E2+P4 alcanzaron los valores más altos con respecto al resto de los grupos ( $p < 0.001$ ), con un promedio de alrededor de 40 pg/ml. Este valor está dentro de los rangos fisiológicos normales encontrados en el ciclo natural de las ratas Sprague Dawley, que han sido descriptos para las distintas etapas del ciclo (Williams y Lipner 1982): diestro 1: 10-13 pg/ml; diestro 2: 15-17 pg/ml, proestro: 50 pg/ml y estro 10 pg/ml. En cambio, los grupos tratados con V y P4 presentaron los niveles más bajos de ésta hormona, con respecto a los grupos E2 y E2+P4 ( $p < 0.001$ ) y SHAM ( $p < 0.05$ ).

Los niveles alcanzados de P4 con el tratamiento se muestran en la figura VII.2.



Se observó que los valores de P4 en los grupos P4 y E2+P4 fueron significativamente mayores que en el resto de los grupos, con un promedio de alrededor de 13 ng/ml ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  respectivamente). Dicho valor está dentro de los rangos fisiológicos normales encontrados en el ciclo estral de las ratas Sprague Dawley, que han sido descritos para las distintas etapas del ciclo (Williams y Lipner 1982): diestro 1: 20 ng/ml; diestro 2: 10 ng/ml; proestro: 30 ng/ml y estro: 5 ng/ml. Por otro lado, los grupos V y E2 presentaron concentraciones más bajas con respecto a E2+P4 ( $p < 0.001$ ) y a P4 y SHAM ( $p < 0.01$ ).

Además, también se analizó el peso de los úteros con el fin de evaluar la actividad biológica del tratamiento hormonal. Los resultados se muestran en la figura VII.3.



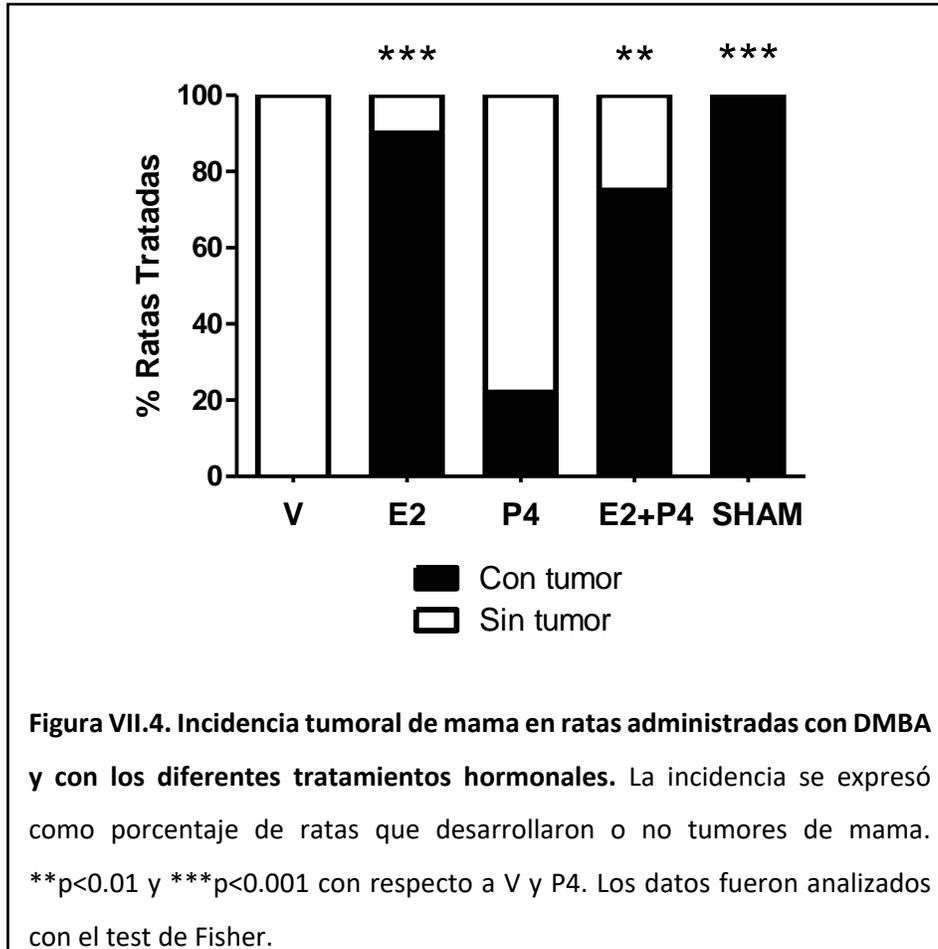
Se pudo observar que los úteros provenientes de las ratas SHAM y de las tratadas con E2 y E2+P4 fueron significativamente más pesados que el resto de los grupos ( $p < 0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos E2, E2+P4 y SHAM, y tampoco entre V y P4.

Estos resultados muestran que las dosis usadas de las hormonas esteroidales alcanzaron valores fisiológicos, y que además tuvieron efecto biológico sobre sus órganos blanco en el modelo experimental en ratas de cáncer mamario.

**El tratamiento con E2 aumenta la incidencia de tumores mamarios**

Para estudiar el efecto que producen las hormonas esteroidales sobre el desarrollo de tumores mamarios, se procedió a analizar varios aspectos, entre ellos la incidencia

tumoral. La incidencia se calculó como el porcentaje de ratas que presentaron tumores dentro del período estudiado. Los resultados se muestran en la figura VII.4.

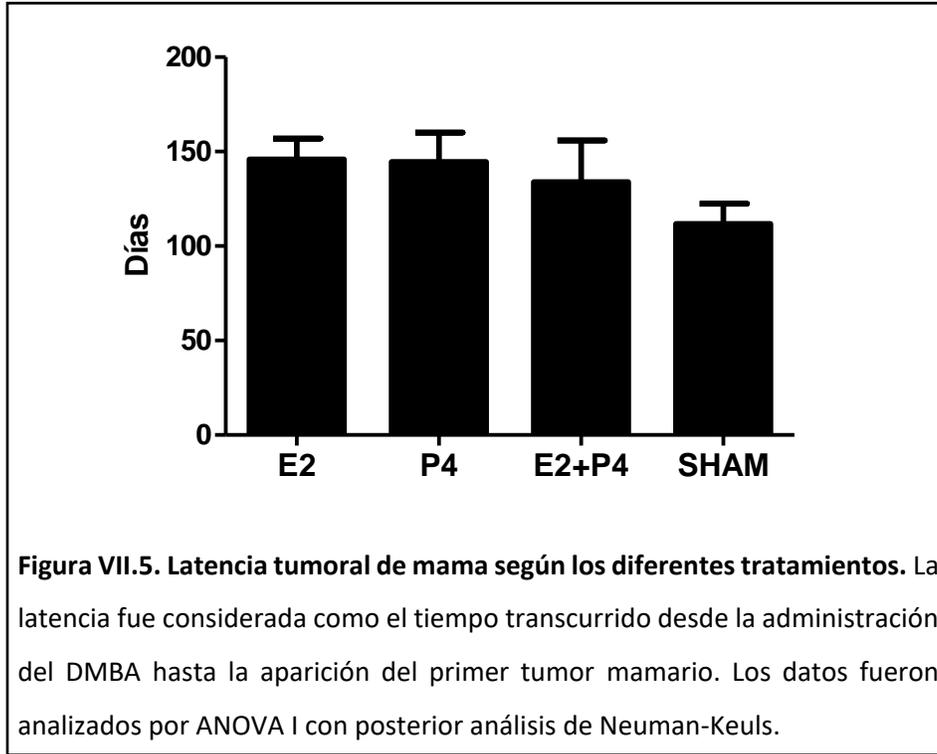


La incidencia tumoral fue nula en las ratas tratadas con V. En cambio, el 100% de las ratas SHAM y el 90% de las tratadas con E2 desarrollaron tumores (p<0.001 con respecto a V y P4), mientras que el porcentaje fue del 75% para las tratadas con E2+P4 (p<0.01 con respecto a V y P4). El tratamiento individual con P4 produjo solamente un 22% de incidencia tumoral. A partir de estos resultados se puede confirmar que la presencia de E2 es necesaria para el desarrollo tumoral en este modelo de carcinogénesis mamaria.

#### **La latencia tumoral tiende a ser menor en el grupo SHAM**

Luego de administrado el DMBA, se realizó un control semanal de los animales para evaluar la aparición de tumores palpables. La figura VII.5 muestra la latencia de aparición

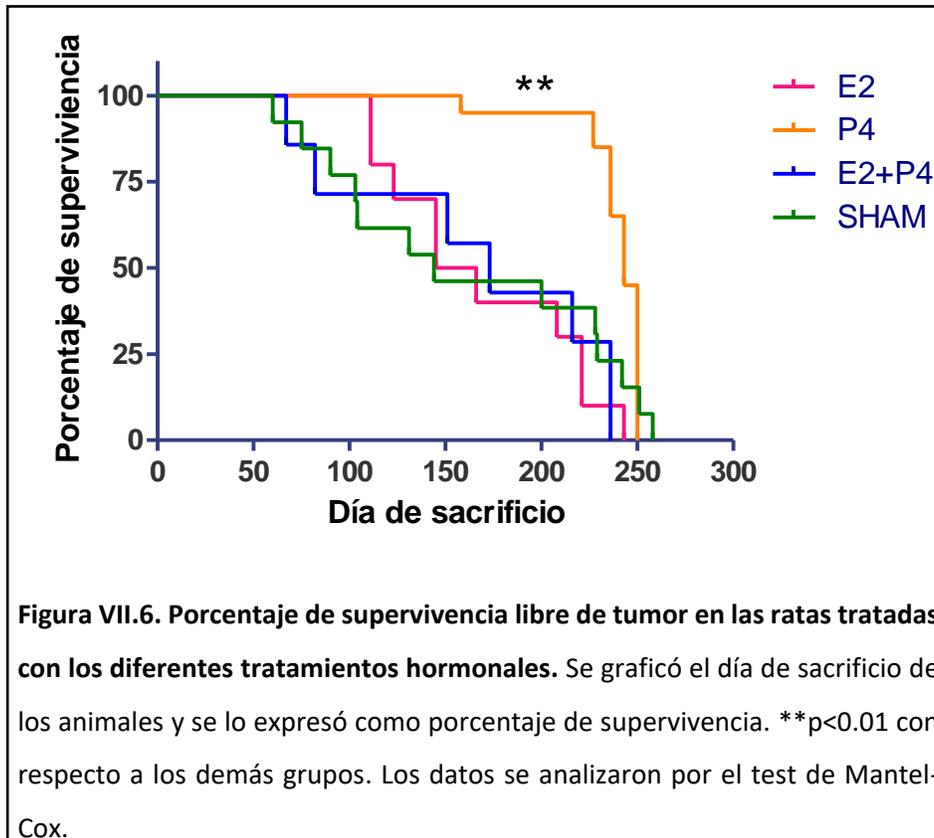
de los mismos, la cual fue calculada como el tiempo transcurrido desde la administración del DMBA hasta la aparición del primer tumor mamario.



No se evidenciaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, aunque los tumores del grupo SHAM tendieron a aparecer antes que los demás grupos.

**El tratamiento sólo con P4 aumenta la sobrevida libre de tumor**

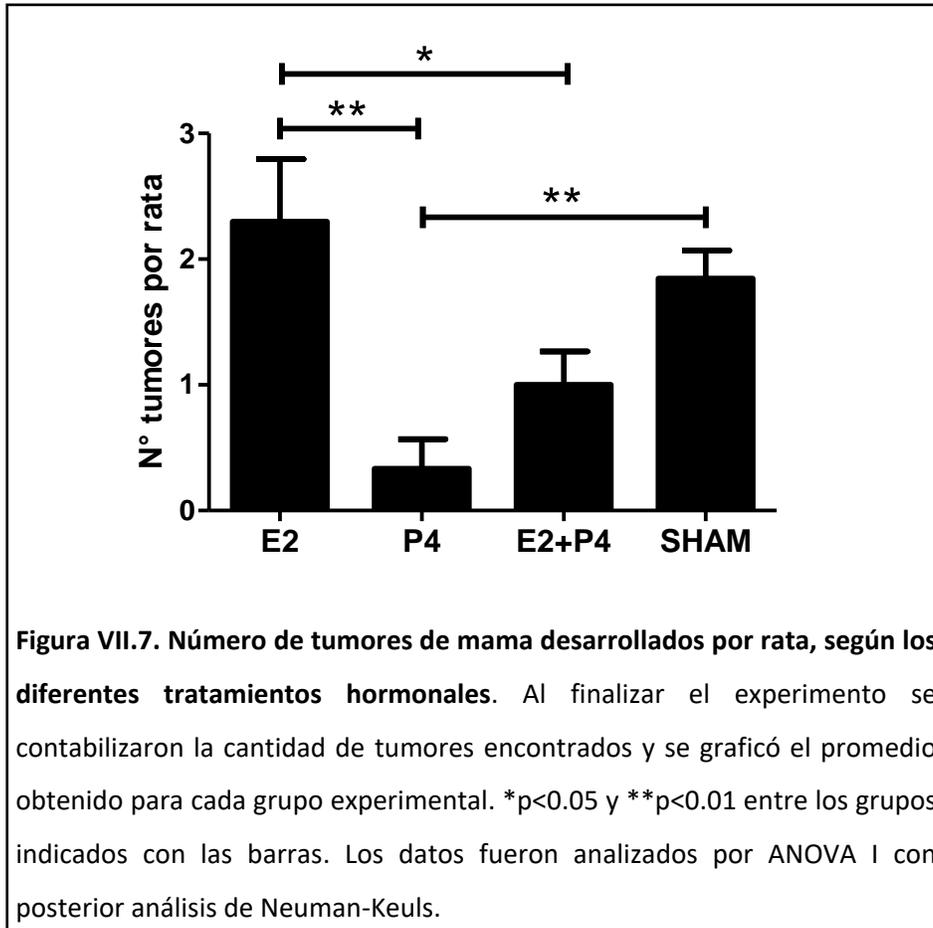
Se calculó el porcentaje de sobrevida libre de tumores en las ratas, según los diferentes tratamientos. Los resultados se muestran en la figura VII.6.



Se observó que el tratamiento con P4 incrementó la supervivencia libre de tumor de los animales analizados, con respecto a los demás grupos ( $p < 0.01$ ). Estos resultados concuerdan con la baja incidencia tumoral observada para este grupo.

### El tratamiento con E2 aumenta la multiplicidad de tumores mamarios

Para evaluar el efecto de los esteroides ováricos sobre el número de tumores de mama desarrollados en el modelo experimental, se procedió a contabilizar los tumores presentes en cada rata según los diferentes tratamientos. Los promedios del número de tumores por grupo se muestran en la figura VII.7.

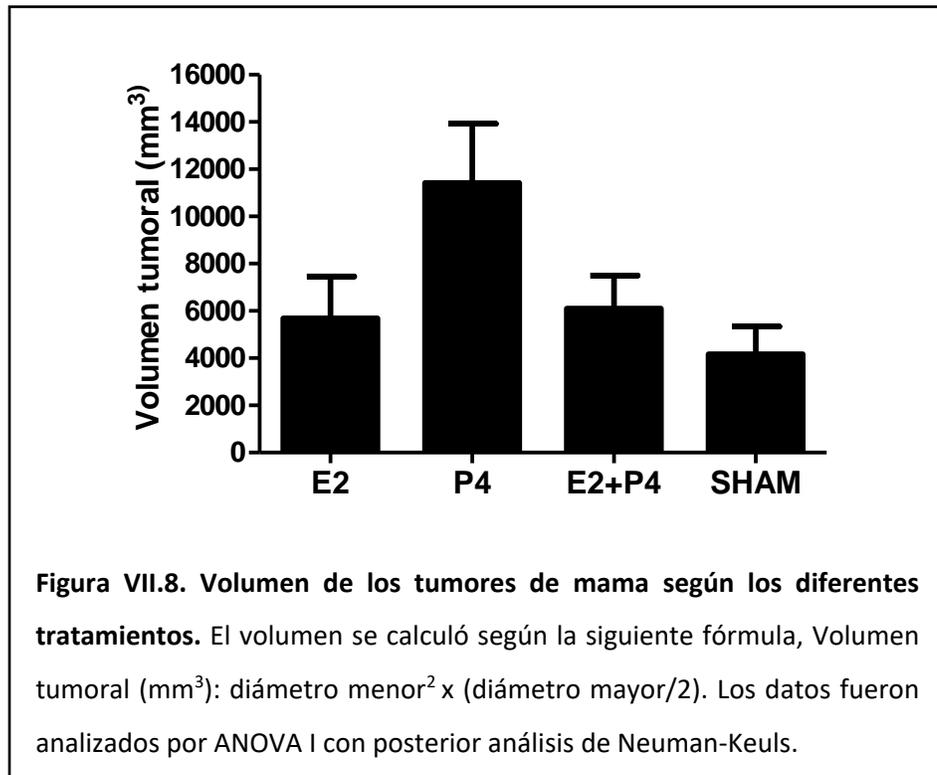


El grupo tratado sólo con E2 presentó una mayor multiplicidad tumoral con respecto a los grupos P4 ( $p < 0.01$ ) y E2+P4 ( $p < 0.05$ ), produciendo un promedio de 2,3 tumores por rata. Le siguieron los grupos SHAM y E2+P4, con un promedio de 1,84 y 1 tumor por rata, respectivamente. En cambio, el grupo tratado únicamente con P4 mostró una menor multiplicidad con respecto al grupo SHAM ( $p < 0.01$ ), con un promedio de tan sólo 0,33 tumor por rata. Estos resultados respaldan el mencionado efecto de E2 sobre la susceptibilidad de las ratas al desarrollo tumoral.

#### **El volumen de los tumores mamarios tiende a ser mayor en el tratamiento con P4**

Al momento del sacrificio de los animales, los tumores fueron medidos con un calibre para obtener el diámetro mayor (DM) y menor (dm) y calcular el volumen tumoral

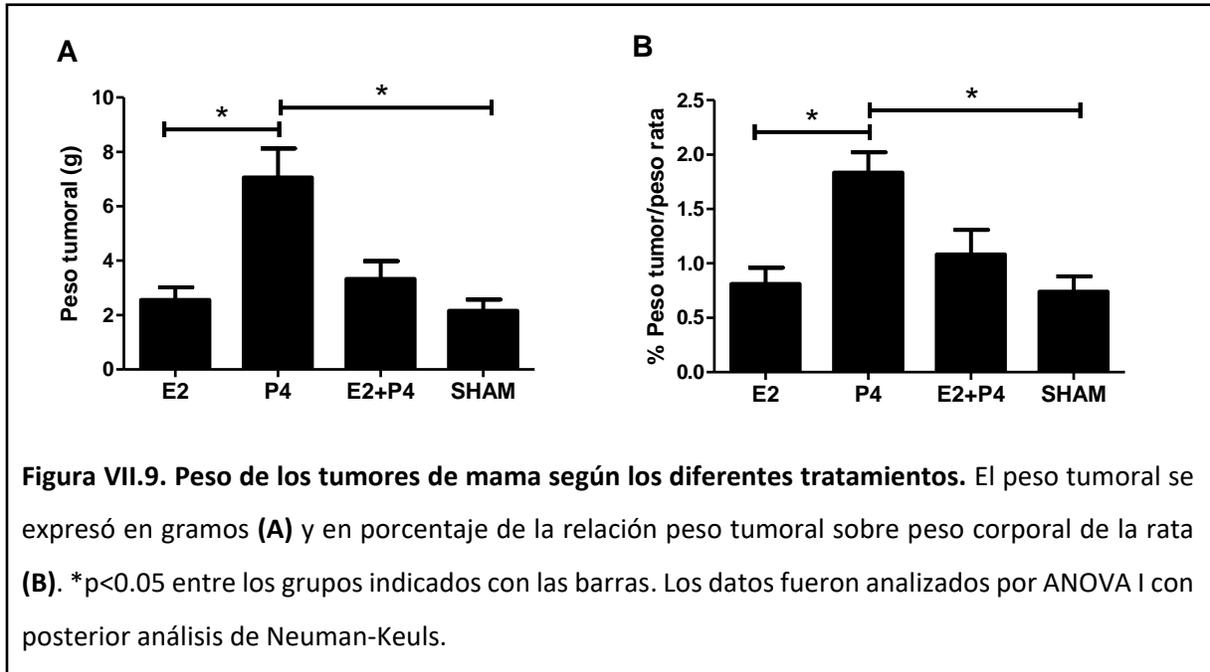
( $VT=dm^2 \times DM/2$ ). El volumen tumoral promedio para cada grupo experimental se muestra en la figura VII.8.



Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas, los tumores del grupo P4 tendieron a presentar un mayor volumen que el resto de los tratamientos.

#### **El tratamiento con P4 produce tumores más pesados**

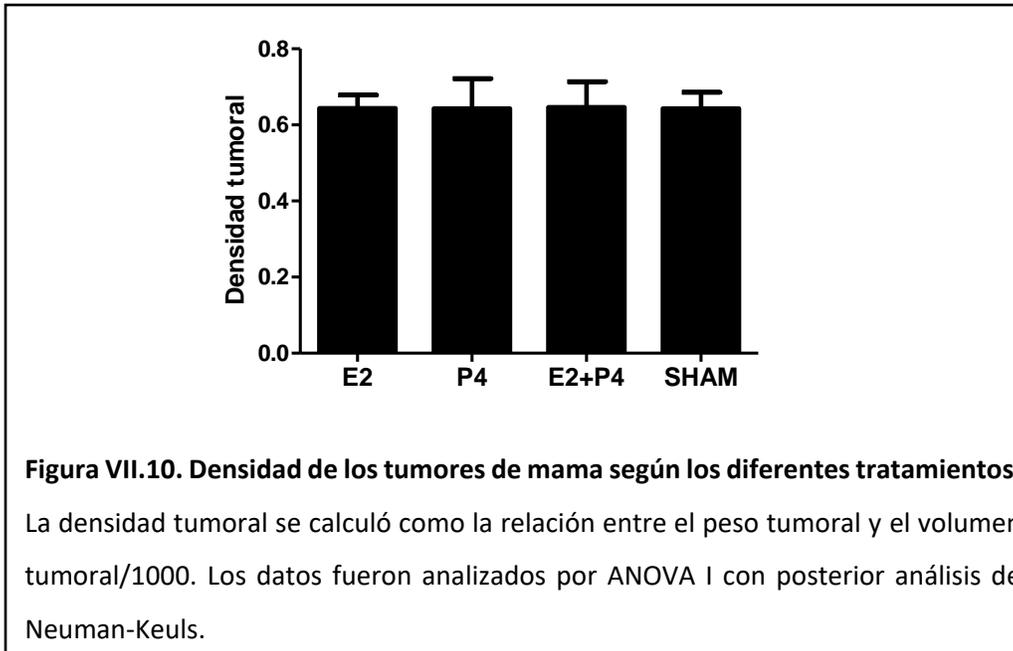
También se analizó el peso de los diferentes tumores obtenidos. Los datos se expresaron en valores absolutos y por cada 100 g de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura VI.9.



Los tumores del grupo tratado con P4 fueron más pesados que los provenientes de los grupos E2 y SHAM ( $p < 0.05$ ), y no se observó esta diferencia con respecto al tratamiento combinado. Este resultado se correlaciona con el mayor volumen tumoral observado anteriormente para este grupo.

#### La densidad tumoral es similar en todos los tratamientos

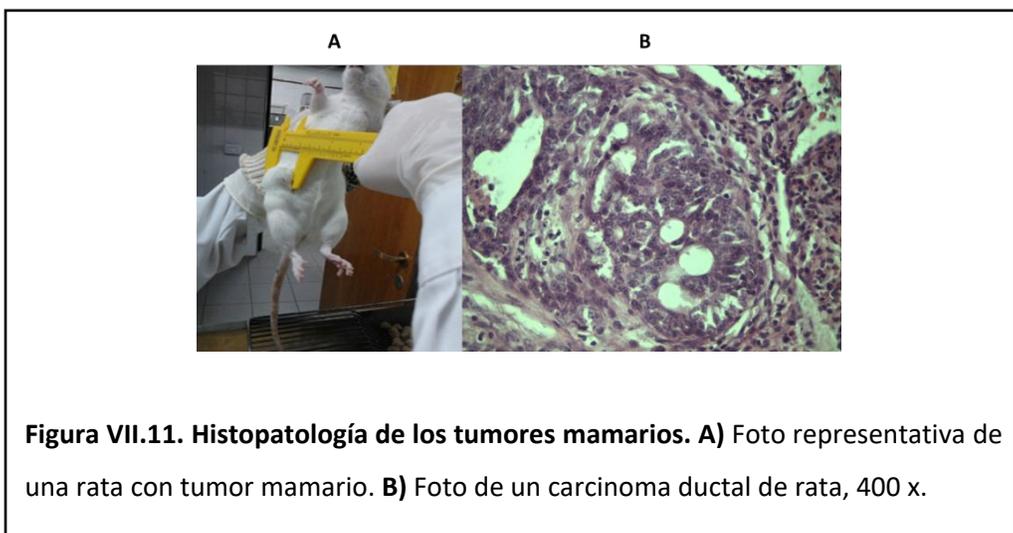
Otro de los parámetros analizados fue la densidad tumoral, la cual se calculó como la relación entre el peso tumoral y el volumen tumoral/1000. Los resultados se muestran en la figura VII.10.



No se observó diferencia significativa entre las densidades de los tumores provenientes de los grupos experimentales.

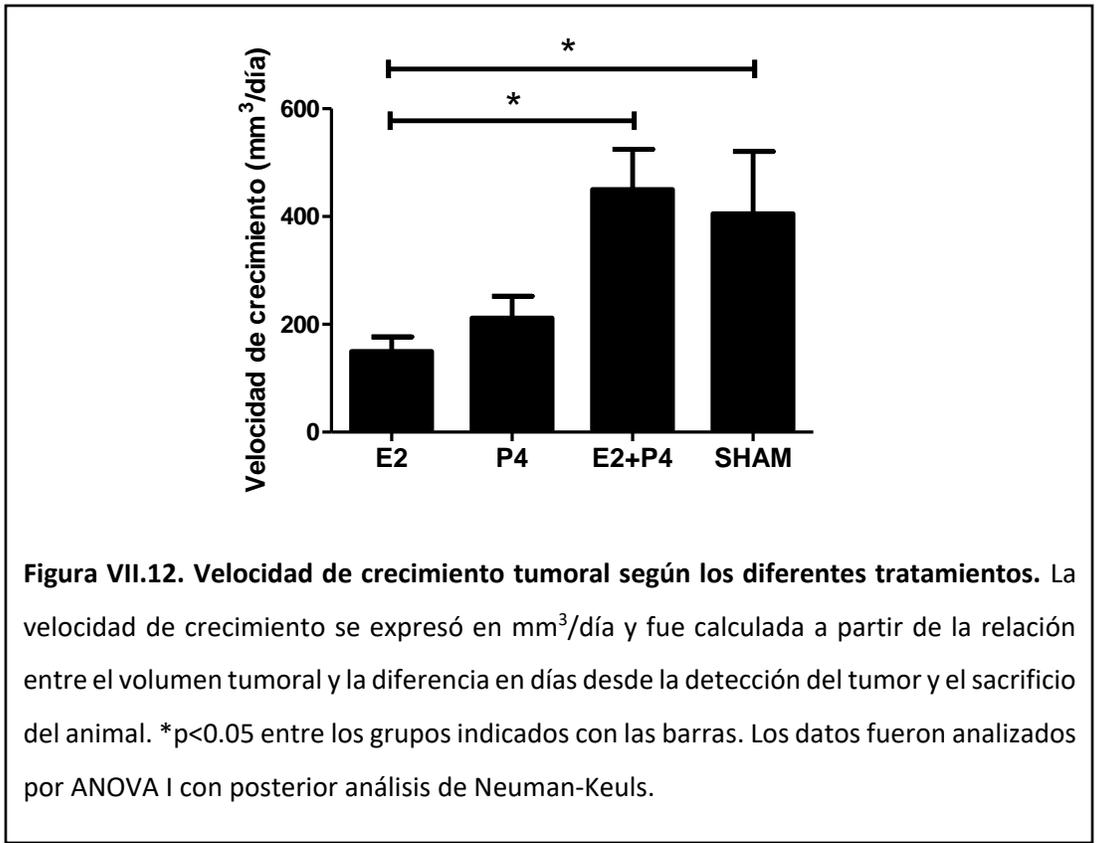
**Los tumores fueron clasificados como carcinomas de mama ductales**

Con el fin de evaluar la clasificación de los tumores, se realizó el estudio histopatológico de los mismos, los cuales fueron clasificados como carcinomas ductales, con diferentes componentes infiltrante e in situ, infiltrado inflamatorio y de diferente grado.



**Los tumores provenientes de ratas con el tratamiento combinado crecen más rápido**

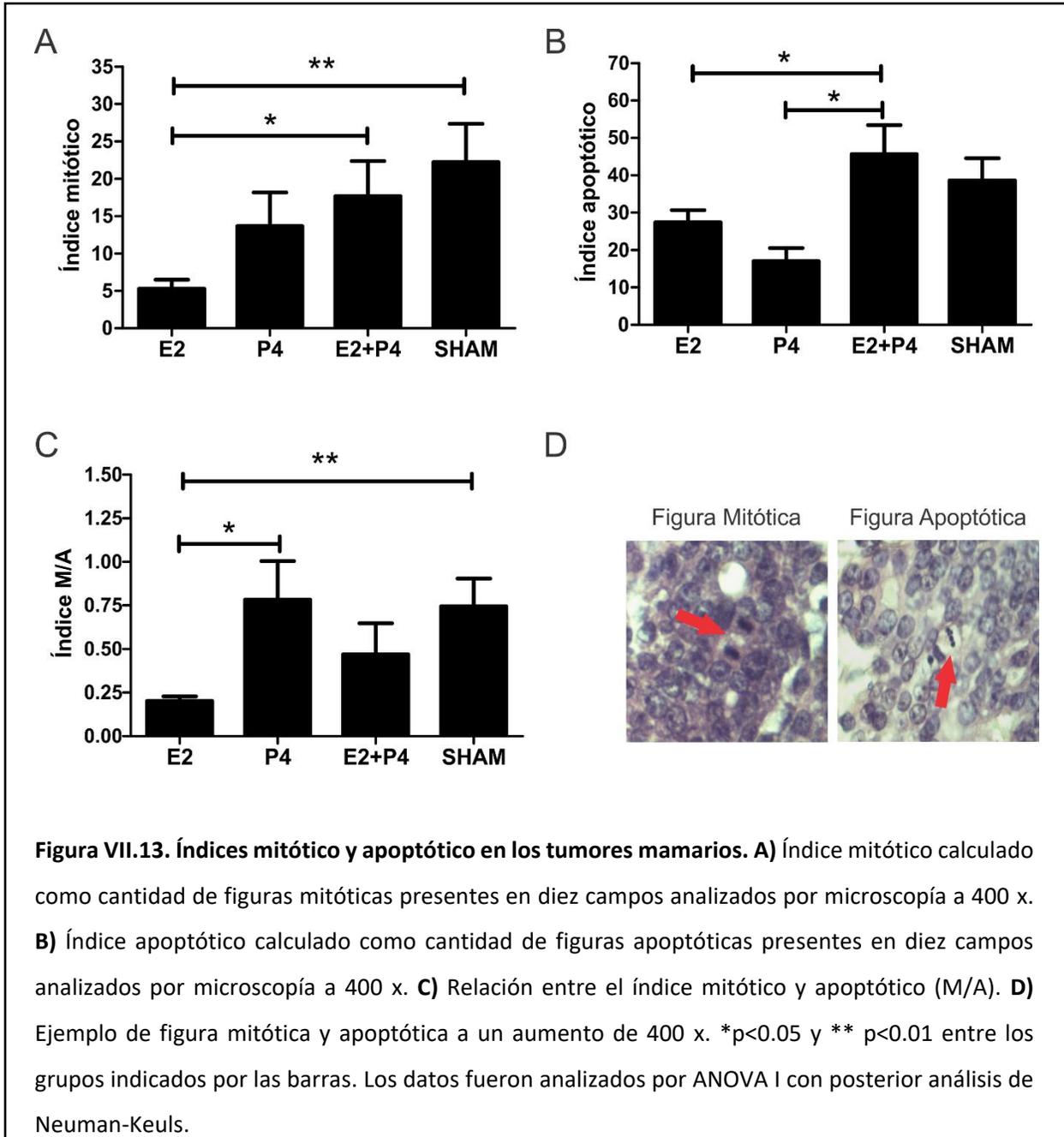
Otro de los parámetros analizados fue la velocidad de crecimiento tumoral, la cual se expresó en mm<sup>3</sup>/día y fue calculada a partir de la relación entre el volumen tumoral y la diferencia en días desde la detección del tumor y el sacrificio del animal. Los resultados se muestran en la figura VII.12.



Los tumores del grupo E2+P4 y SHAM presentaron un crecimiento más acelerado que los pertenecientes al grupo E2 (p<0.05). Por ello, se puede concluir que es necesaria la presencia tanto de E2 como de P4 para producir un crecimiento tumoral más rápido.

**Los tumores del grupo P4 presentan mayor índice mitosis/apoptosis**

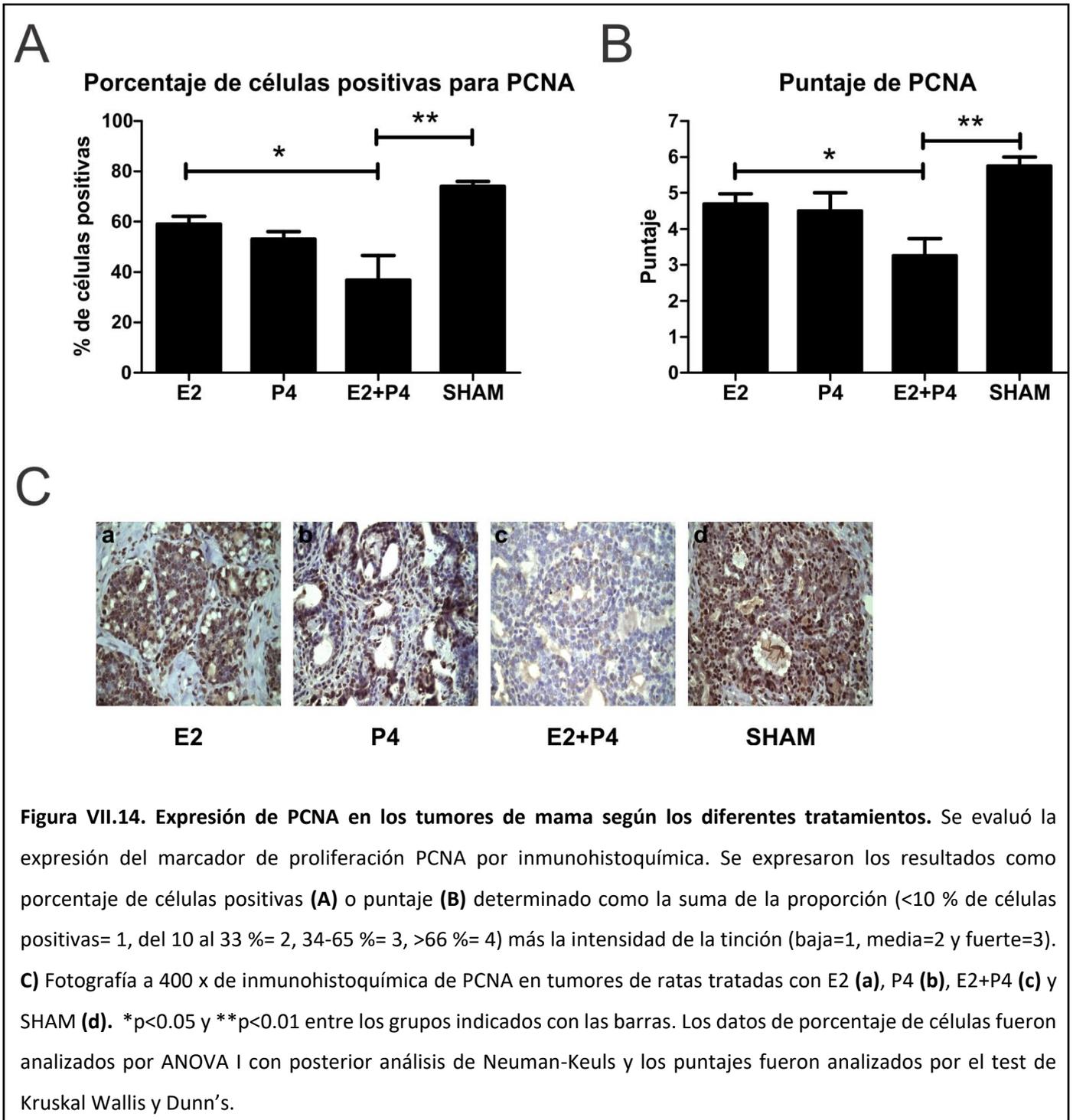
Para continuar el análisis de la influencia de los esteroides ováricos sobre la progresión tumoral, se determinaron los índices mitótico y apoptótico en los tumores por microscopía óptica. Para ello se contaron la cantidad de figuras mitóticas y apoptóticas presentes en diez campos analizados por microscopía a 400 x. La relación entre el índice mitótico y apoptótico (M/A) se calculó dividiendo el índice mitótico sobre el apoptótico de cada tumor. Los resultados se muestran en la figura VII.13.



Se observó una mayor cantidad de figuras mitóticas en los tumores del grupo E2+P4 y SHAM con respecto a los tumores del grupo E2 ( $p<0.05$  y  $p<0.01$  respectivamente). En cuanto a las figuras apoptóticas, el tratamiento combinado produjo un aumento significativo ( $p<0.05$ ) con respecto a los grupos E2 y P4. Al hacer la relación entre ambos índices (M/A), se observó un aumento del mismo en el grupo P4 y SHAM con respecto al grupo E2 ( $p<0.05$  y  $p<0.01$  respectivamente). Por lo tanto, se sugiere que el tratamiento con E2 produce una disminución en la proliferación, mientras que P4 la aumenta.

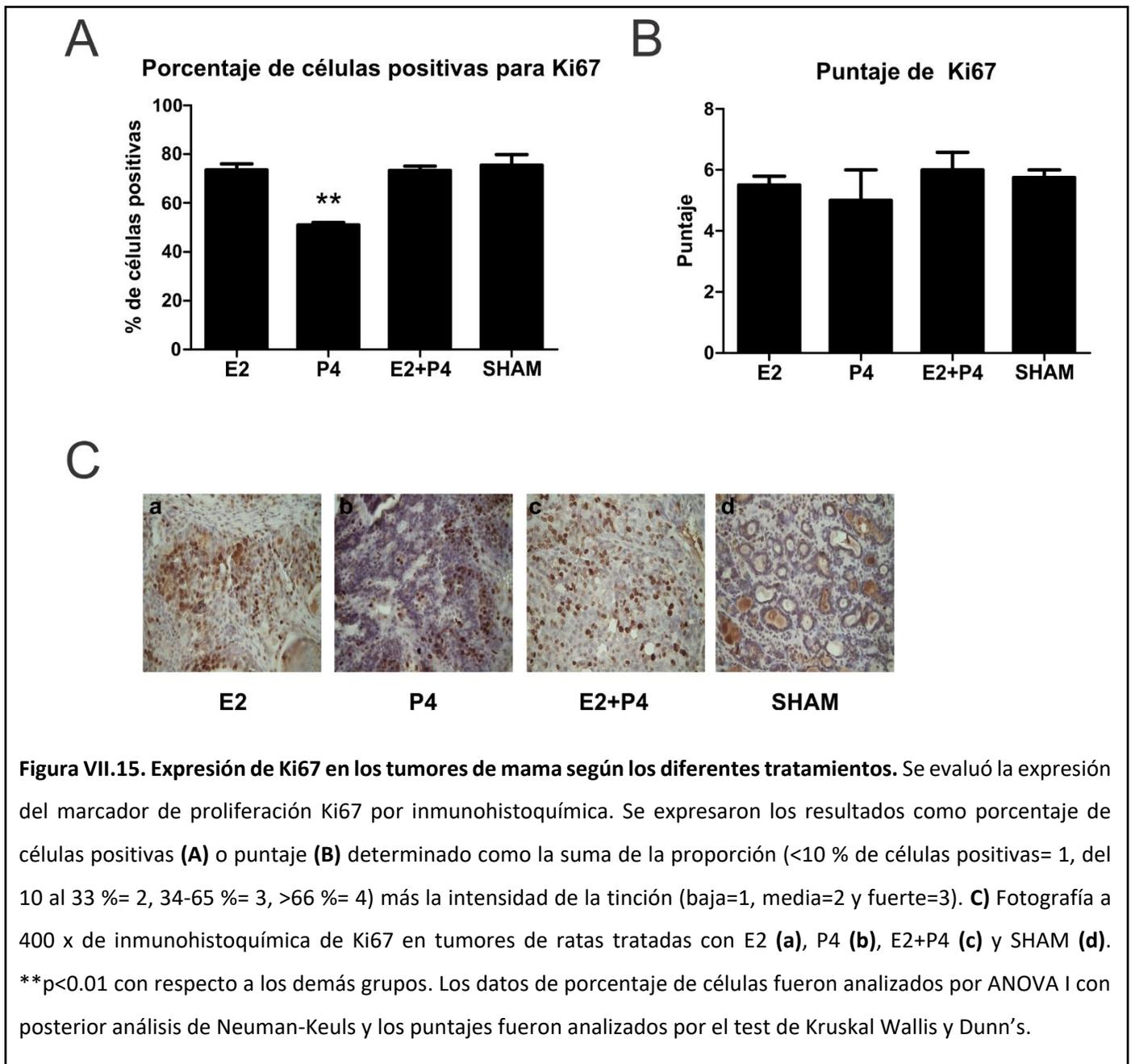
### **Los tumores provenientes del tratamiento combinado proliferan menos**

Para profundizar el efecto de los esteroides ováricos sobre la proliferación tumoral, se analizaron los marcadores PCNA y Ki67 por inmunohistoquímica (para más detalles ver materiales y métodos). Los resultados se presentan en la figura VII.14 y VII.15.



Se observó que el grupo E2+P4 presentó un menor porcentaje y puntaje de células tumorales positivas para PCNA con respecto al grupo E2 ( $p < 0.05$ ) y SHAM ( $p < 0.01$ ).

También se analizó otro marcador de proliferación celular, como es el Ki67, por inmunohistoquímica. Los resultados se presentan en la figura VII.15.

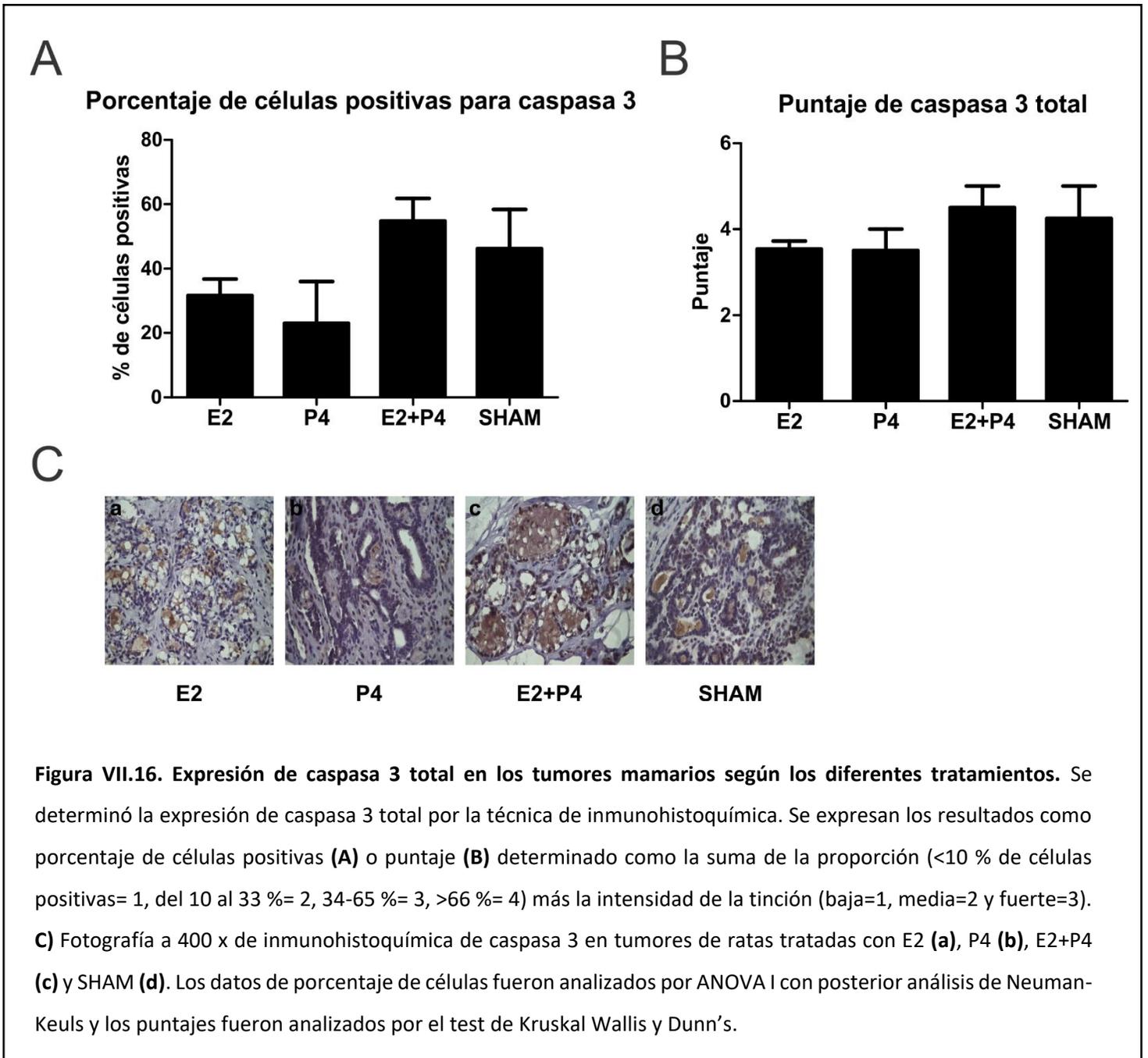


Al analizar el porcentaje de células positivas para Ki67, se observó un menor porcentaje en el grupo tratado con P4 con respecto a los demás grupos (p<0.01). No se

observaron diferencias significativas entre los tratamientos cuando se analizaron los puntajes.

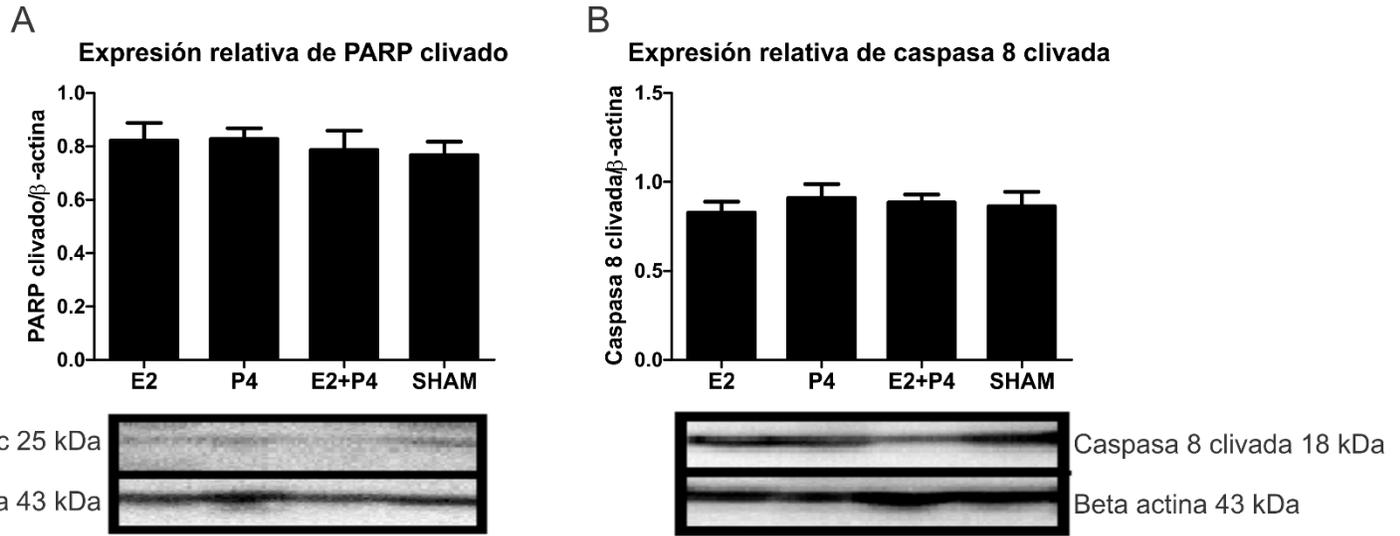
**El tratamiento combinado tiende a aumentar la expresión de caspasa 3 total**

Ya que se observaron cambios en la apoptosis celular en los tumores, se analizó la expresión de diversas proteínas asociadas a dicha forma de muerte celular programada. En este caso, en la figura VII.16 se muestran los resultados para caspasa 3 total por inmunohistoquímica (para más detalles, ver materiales y métodos).



No se observaron diferencias significativas en la expresión de caspasa 3 total entre los diferentes grupos, aunque sí una tendencia a una mayor expresión en los tumores del grupo E2+P4 y SHAM.

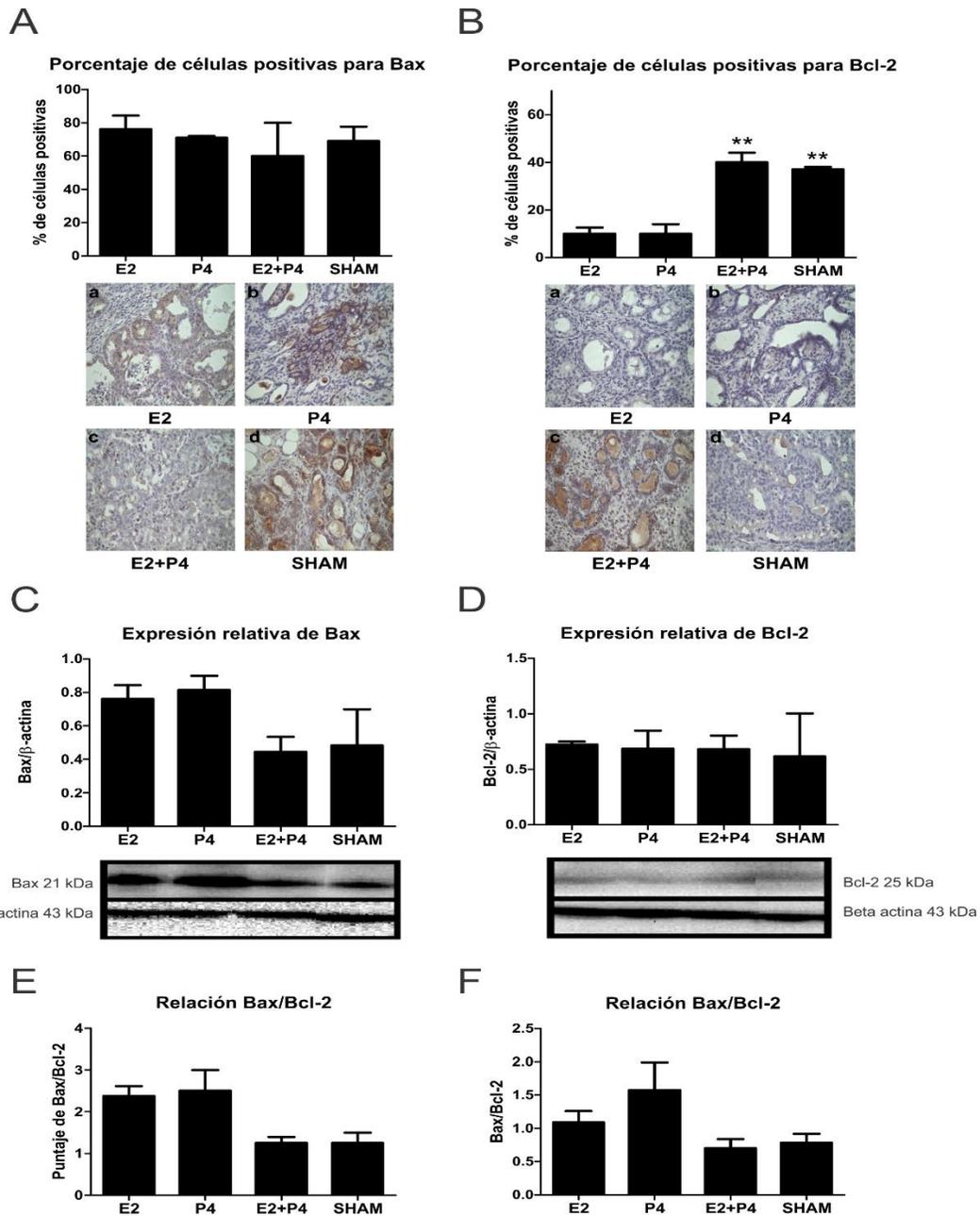
Además, se estudiaron los marcadores apoptóticos PARP clivado y caspasa 8 por Western blot (para más detalles, ver materiales y métodos), donde no se observó diferencia en su expresión entre los diferentes tratamientos.



**Figura VII.17. Expresión de PARP clivado y caspasa 8 en los tumores mamarios según los diferentes tratamientos hormonales.** Se determinó la expresión de proteínas indicadoras de apoptosis PARP clivado (**A**) y caspasa 8 (**B**) por Western blot. Las bandas fueron normalizadas con Beta actina. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls.

### Los tumores del grupo E2+P4 presentan una menor relación Bax/Bcl-2

Se analizaron proteínas asociadas a proliferación y apoptosis, tales como Bax y Bcl-2 por inmunohistoquímica y Western blot (para más detalles, ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura VII.18.

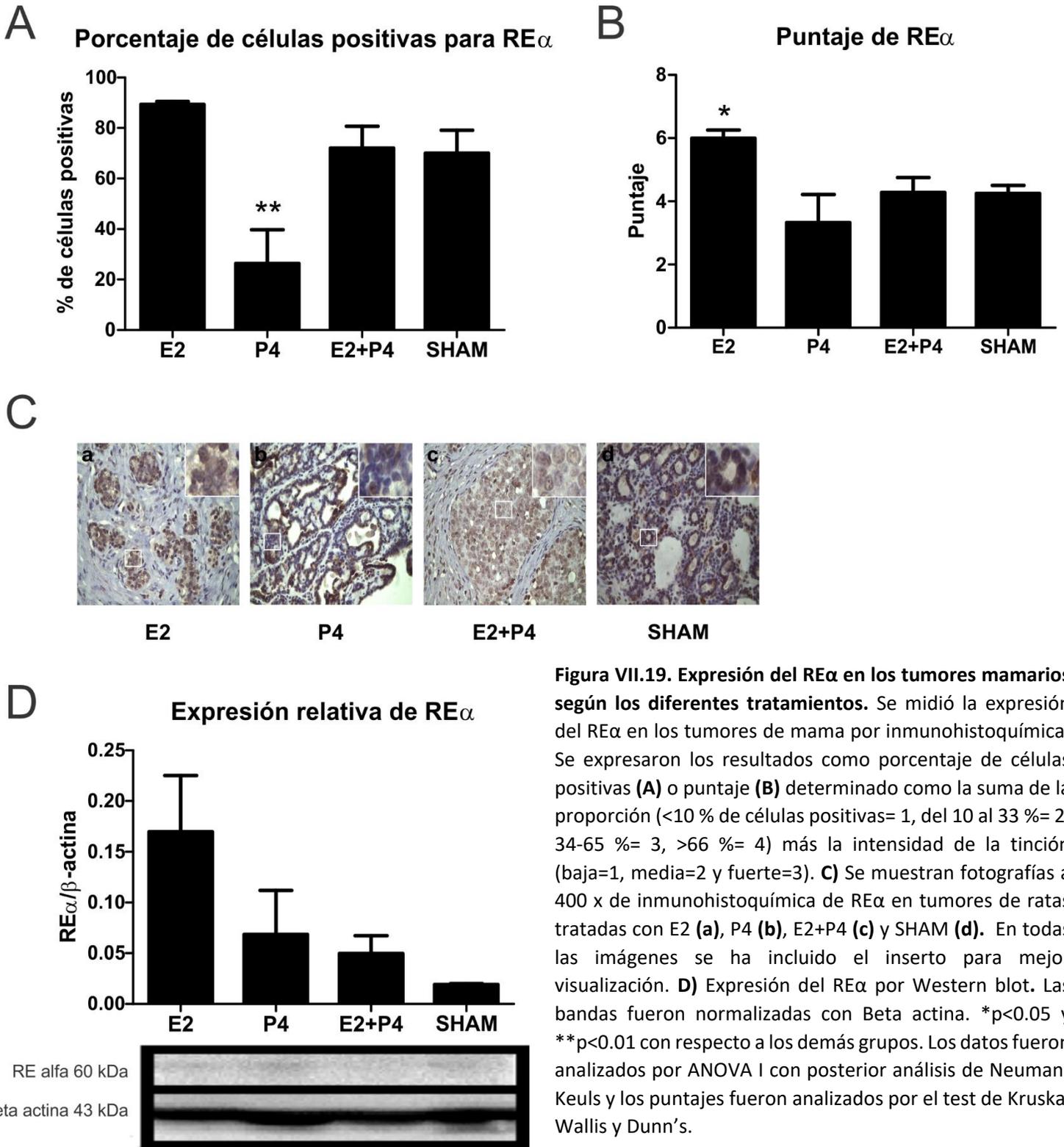


**Figura VII.18. Expresión de Bax y Bcl-2 en los tumores mamarios según los diferentes tratamientos.** Se evaluó la expresión de Bax y Bcl-2, por inmunohistoquímica y Western blot. **A)** Porcentaje de células positivas para Bax. **B)** Porcentaje de células positivas para Bcl-2. Se muestran fotografías a 400 x de inmunohistoquímica de Bax (**A**) y Bcl-2 (**B**) en tumores de ratas tratadas con E2 (**a**), P4 (**b**), E2+P4 (**c**) y SHAM (**d**). **C)** Expresión relativa de Bax cuantificada por Western blot. **D)** Expresión relativa de Bcl-2 cuantificada por Western blot. **E)** Relación entre los puntajes de Bax y Bcl-2. **F)** Relación entre Bax y Bcl-2 por Western blot. \*\* $p < 0.01$  comparado con E2 y P4. Las bandas fueron normalizadas con Beta actina. Los datos de porcentaje de células fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls y los puntajes fueron analizados por el test de Kruskal Wallis y Dunn's

El tratamiento con E2+P4 tendió a disminuir la expresión de Bax y aumentó significativamente la expresión de Bcl-2 con respecto a E2 y P4 ( $p < 0.01$ ), observándose esta diferencia sólo por la técnica de inmunohistoquímica (sólo se muestran los porcentajes, omitiéndose los puntajes por cuestiones de espacio en la figura). Al analizar estas proteínas por Western blot, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Al hacer la relación entre Bax y Bcl-2, se observó una tendencia del tratamiento combinado y de SHAM de disminuirla, tanto por inmunohistoquímica como por Western blot.

### **El tratamiento con E2 aumenta la expresión del RE $\alpha$ en los tumores mamarios**

Para analizar el estado de los receptores hormonales, responsables de la acción intracelular de los esteroides ováricos, se cuantificó la expresión de los mismos por inmunohistoquímica y Western blot (para más detalles ver materiales y métodos). En el caso del RE $\alpha$ , se cuantificó su expresión tanto por inmunohistoquímica como por Western blot (para más detalles, ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura VII.19.

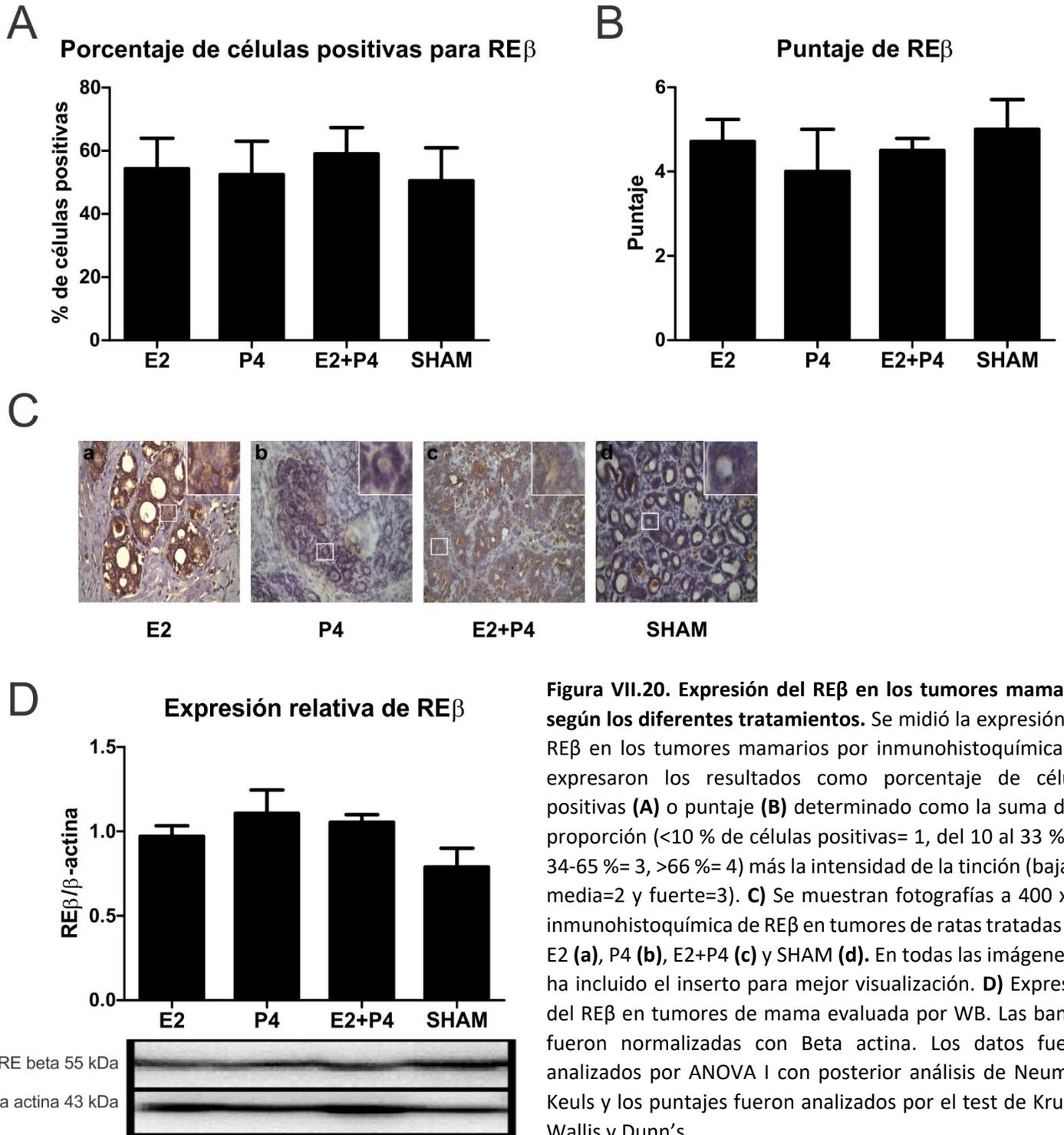


**Figura VII.19. Expresión del RE $\alpha$  en los tumores mamarios según los diferentes tratamientos.** Se midió la expresión del RE $\alpha$  en los tumores de mama por inmunohistoquímica. Se expresaron los resultados como porcentaje de células positivas (**A**) o puntaje (**B**) determinado como la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) más la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). **C** Se muestran fotografías a 400 x de inmunohistoquímica de RE $\alpha$  en tumores de ratas tratadas con E2 (**a**), P4 (**b**), E2+P4 (**c**) y SHAM (**d**). En todas las imágenes se ha incluido el inserto para mejor visualización. **D** Expresión del RE $\alpha$  por Western blot. Las bandas fueron normalizadas con Beta actina. \* $p$ <0.05 y \*\* $p$ <0.01 con respecto a los demás grupos. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls y los puntajes fueron analizados por el test de Kruskal Wallis y Dunn's.

Cuando se analizó el porcentaje de células positivas para RE $\alpha$  por inmunohistoquímica, se observó una menor expresión del mismo por el tratamiento con P4 con respecto a los demás grupos ( $p < 0.01$ ). Al analizar los resultados del puntaje se observó un aumento de la expresión del RE $\alpha$  en los tumores provenientes del tratamiento con E2 con respecto a los demás grupos ( $p < 0.05$ ). Con respecto a la localización del RE $\alpha$ , se observó predominante en núcleo y citoplasma para el grupo E2, mientras que para los grupos P4 y E2+P4 se observó una localización sólo citoplasmática, al igual que en los tumores del tratamiento combinado. No se observaron diferencias significativas por Western blot, pero sí una tendencia a una mayor expresión de este receptor en el grupo E2 y a una menor en el grupo del tratamiento combinado.

**No hay diferencias en la expresión del RE $\beta$  en los tumores mamarios según los diferentes tratamientos hormonales**

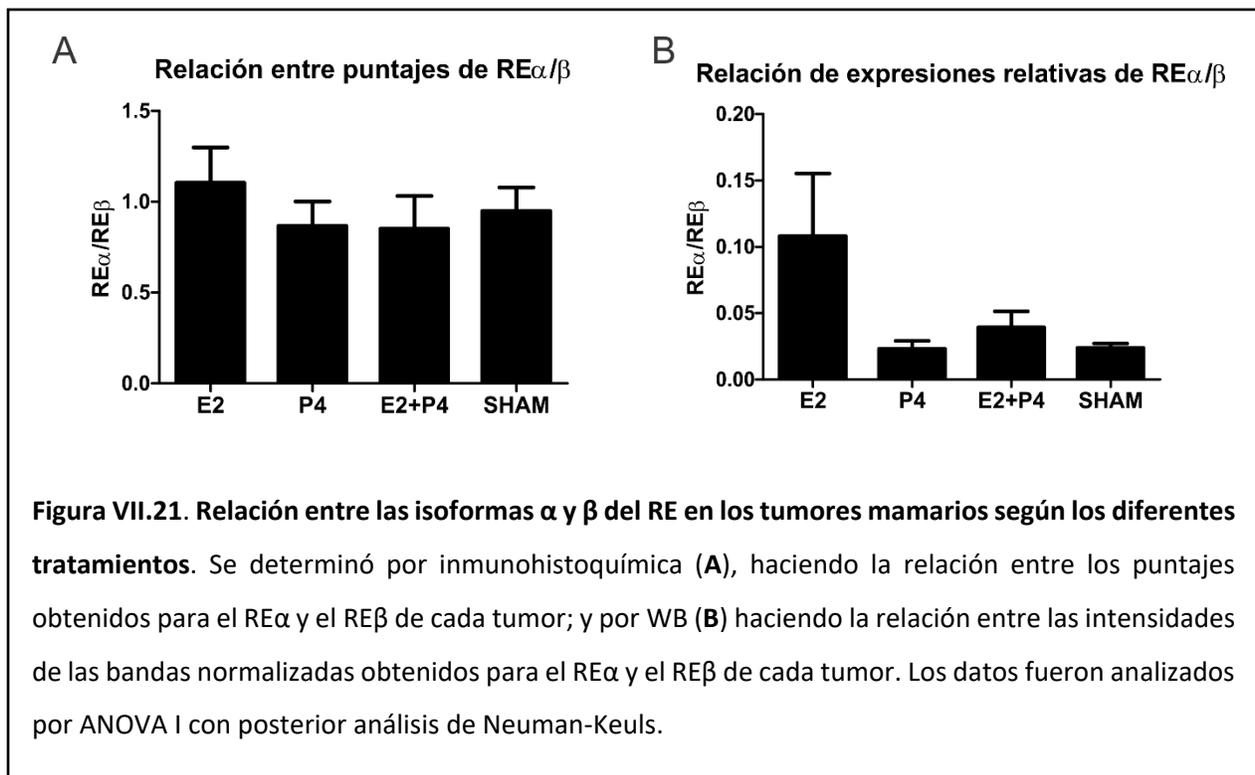
Luego se analizó la expresión de otra de las isoformas del RE, la isoforma  $\beta$  en los tumores por inmunohistoquímica y Western blot (para más detalles ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura VII.20.



**Figura VII.20. Expresión del RE $\beta$  en los tumores mamarios según los diferentes tratamientos.** Se midió la expresión del RE $\beta$  en los tumores mamarios por inmunohistoquímica. Se expresaron los resultados como porcentaje de células positivas (**A**) o puntaje (**B**) determinado como la suma de la proporción (<10 % de células positivas= 1, del 10 al 33 %= 2, 34-65 %= 3, >66 %= 4) más la intensidad de la tinción (baja=1, media=2 y fuerte=3). **C**) Se muestran fotografías a 400 x de inmunohistoquímica de RE $\beta$  en tumores de ratas tratadas con E2 (**a**), P4 (**b**), E2+P4 (**c**) y SHAM (**d**). En todas las imágenes se ha incluido el inserto para mejor visualización. **D**) Expresión del RE $\beta$  en tumores de mama evaluada por WB. Las bandas fueron normalizadas con Beta actina. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls y los puntajes fueron analizados por el test de Kruskal Wallis y Dunn's.

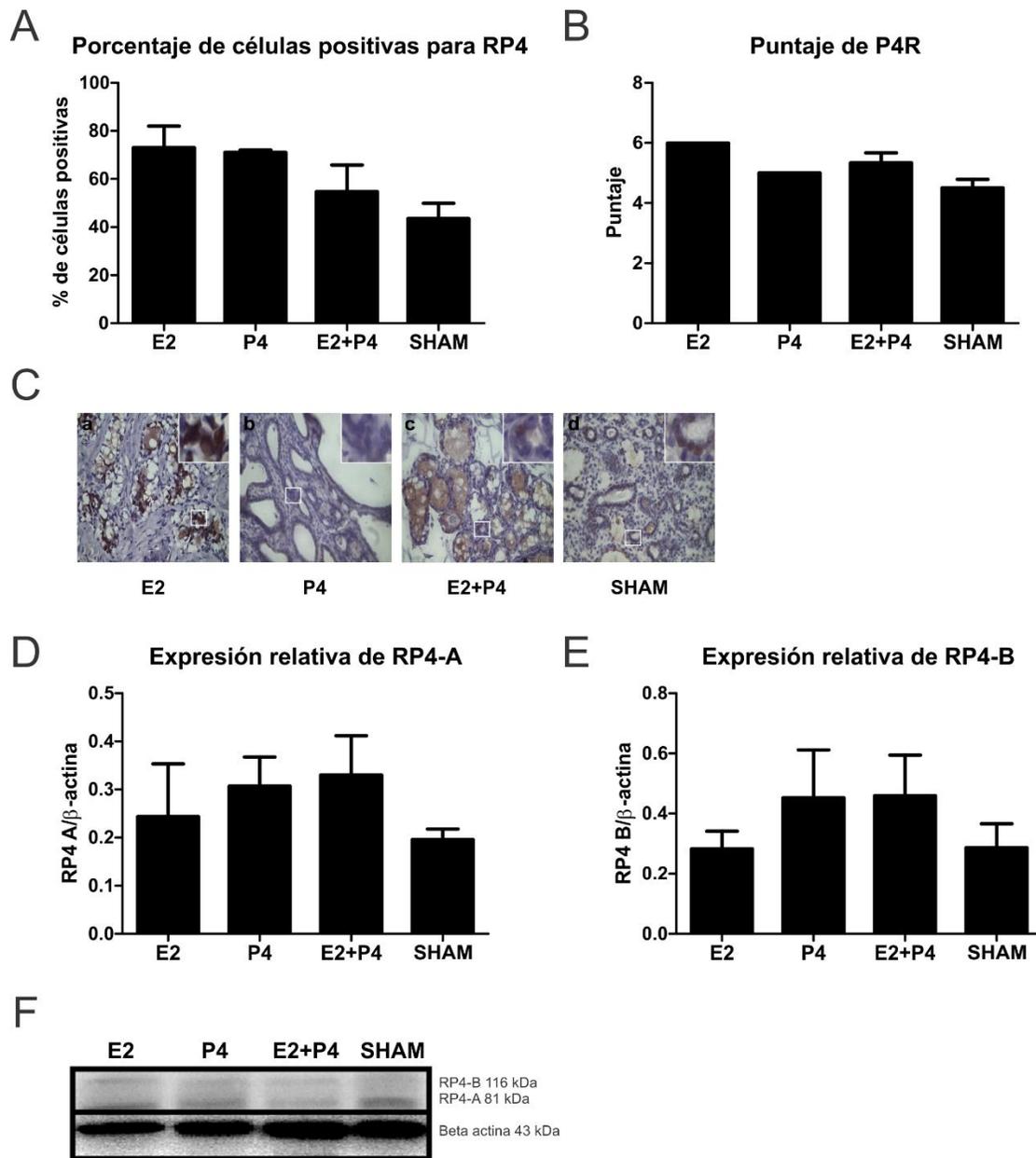
No se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos hormonales, tanto por inmunohistoquímica como por Western blot. La localización del receptor fue citoplasmática en todos los grupos.

Al hacer la relación entre ambos tipos de receptores, no se observaron diferencias entre los grupos, aunque sí una tendencia a estar aumentada por el tratamiento con E2, tal como se muestra en la figura VII.21.



### El tratamiento con P4 no modifica la expresión de sus receptores en los tumores mamarios

Como uno de los efectos de E2 es regular la expresión de los RP4, y además los RE están regulados por RP4, se analizó la expresión de estos por inmunohistoquímica. Además, se determinaron las sus isoformas A y B del RP4 por Western blot (para más detalles ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la figura VII.22.



**Figura VII.22. Expresión del RP4 en los tumores mamarios según los diferentes tratamientos.** Se midió la expresión del RP4 en los tumores mamarios por inmunohistoquímica. Se expresaron los resultados como porcentaje de células positivas (**A**) o puntaje (**B**). **C**) Fotografías a 400 x de inmunohistoquímica de RP4 en tumores de ratas tratadas con E2 (**a**), P4 (**b**), E2+P4 (**c**) y SHAM (**d**). En todas las imágenes se ha incluido el inserto para mejor visualización. **D**) Cuantificación de la expresión del RP4-A evaluada por Western blot. **E**) Cuantificación de la expresión del RP4-B evaluada por Western blot. **F**) Expresión de ambas isoformas del RP4 por Western blot. Las bandas fueron normalizadas con Beta actina. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls y los puntajes fueron analizados por el test de Kruskal Wallis y Dunn's.

La localización del RP4 fue nuclear en todos los grupos, pero no se observaron diferencias en su expresión entre los diferentes grupos por inmunohistoquímica. Al hacer el análisis entre las isoformas A y B por western blot, se observó una tendencia al aumento de las mismas por el tratamiento con P4.

## **CAPÍTULO VIII**

### **RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°3**

**Objetivo específico N°3:** Comparar la regulación ejercida por los esteroides ováricos sobre la carcinogénesis mamaria y de colon.

#### **RESULTADOS**

##### **Los efectos de los esteroides ováricos sobre la carcinogénesis son diferentes entre el modelo experimental de cáncer de colon y el de cáncer de mama**

Luego de haber presentado los resultados obtenidos de cada modelo experimental en los objetivos 1 y 2, se procedió a comparar los mismos. En los grupos de animales tratados con V la incidencia tumoral en mama fue del 0% mientras que en colon fue del 90%. Para los grupos tratados con E2, las incidencias fueron similares con 90% en mama y 85% en colon. Para los grupos de P4 las incidencias observadas fueron muy dispares: un 22% en mama y 93% en colon. Por último, con respecto al grupo E2+P4 las incidencias fueron similares con un 75% y 85% respectivamente. Con respecto a la sobrevivencia libre de tumor, la única diferencia se vio en el modelo de cáncer de mama con un aumento por el tratamiento con P4. Cuando se analizó la multiplicidad tumoral, sólo se observaron diferencias en mama con un aumento por la presencia de E2, mientras que para colon no se vieron diferencias entre los diferentes tratamientos. El volumen y el peso de los tumores mamarios fueron mayores por el tratamiento con P4, mientras que los de colon fueron mayores en el grupo con E2. Al analizar las densidades tumorales, no se encontraron diferencias en ninguno de los dos modelos. En cuanto a la velocidad de crecimiento de los tumores mamarios, se vio que fue menor en el grupo tratado con E2 mientras que para colon este dato no pudo obtenerse ya que no se pudo evidenciar la aparición de los tumores, y su seguimiento durante el experimento.

### **Los esteroides ováricos producen diferentes comportamientos tumorales entre ambos modelos experimentales**

El índice mitótico en las células epiteliales de los tumores mamarios, disminuyó por el tratamiento con E2 y aumentó por E2+P4, mientras que en los tumores de colon no se observaron diferencias. Con respecto al índice apoptótico, se encontró un aumento en ambos modelos por el tratamiento con E2+P4. La relación entre los dos índices disminuyó por el tratamiento con E2 en los tumores mamarios, mientras que se vio el efecto contrario en colon. El tratamiento de E2+P4 disminuyó la expresión de PCNA y aumentó la expresión de caspasa 3 en ambos modelos. También se observó que aumentó PARP clivado en colon, pero no produjo cambios en mama. En cuanto a la relación Bax/Bcl-2, tendió disminuir por el tratamiento con E2+P4 en mama, pero no produjo cambios en colon. Por último, el tratamiento combinado aumentó la expresión de caspasa 8 clivada en colon, pero no produjo este efecto en mama.

### **Los esteroides ováricos regulan la expresión de sus receptores de manera diferente en ambos modelos experimentales**

La expresión del RE $\alpha$  en los tumores se vio aumentada por el tratamiento con E2 en ambos modelos. Con la expresión del RE $\beta$  no se observó el mismo efecto, ya que no hubo cambios entre los diferentes tratamientos en mama, pero sí se vio aumentada por el tratamiento con E2+P4 en colon. Estos cambios dieron como resultado una alta relación RE $\alpha$ /RE $\beta$  por el tratamiento con E2 en los tumores mamarios, mientras que una baja por el tratamiento combinado en los de colon. La regulación de la expresión de los RP4 es diferente en ambos modelos: en cáncer de mama los tratamientos no producen diferencias, mientras que en colon el tratamiento con E2 produce un aumento y la presencia de P4, una disminución de la expresión.

## **CAPÍTULO IX**

### **RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°4**

**Objetivo específico N°4:** Estudiar los efectos que ejercen los esteroides ováricos sobre la proliferación y la apoptosis en líneas celulares tumorales de colon tratadas con 17- $\beta$ -estradiol y progesterona.

Debido a que encontramos diferencias entre los tratamientos sobre la progresión tumoral en el modelo *in vivo* de cáncer de colon, nos pareció interesante poder llevar a cabo estudios en un modelo *in vitro*, con el fin de poder dilucidar algunos de los mecanismos que son regulados los esteroides ováricos. El modelo de líneas celulares tumorales establecidas permite hacer tratamientos con diferentes dosis y tiempos de exposición, y poder estudiar vías de activación rápidas que pueden estar involucradas en los mecanismos de proliferación y apoptosis, las cuales no pueden ser estudiadas en un modelo *in vivo*.

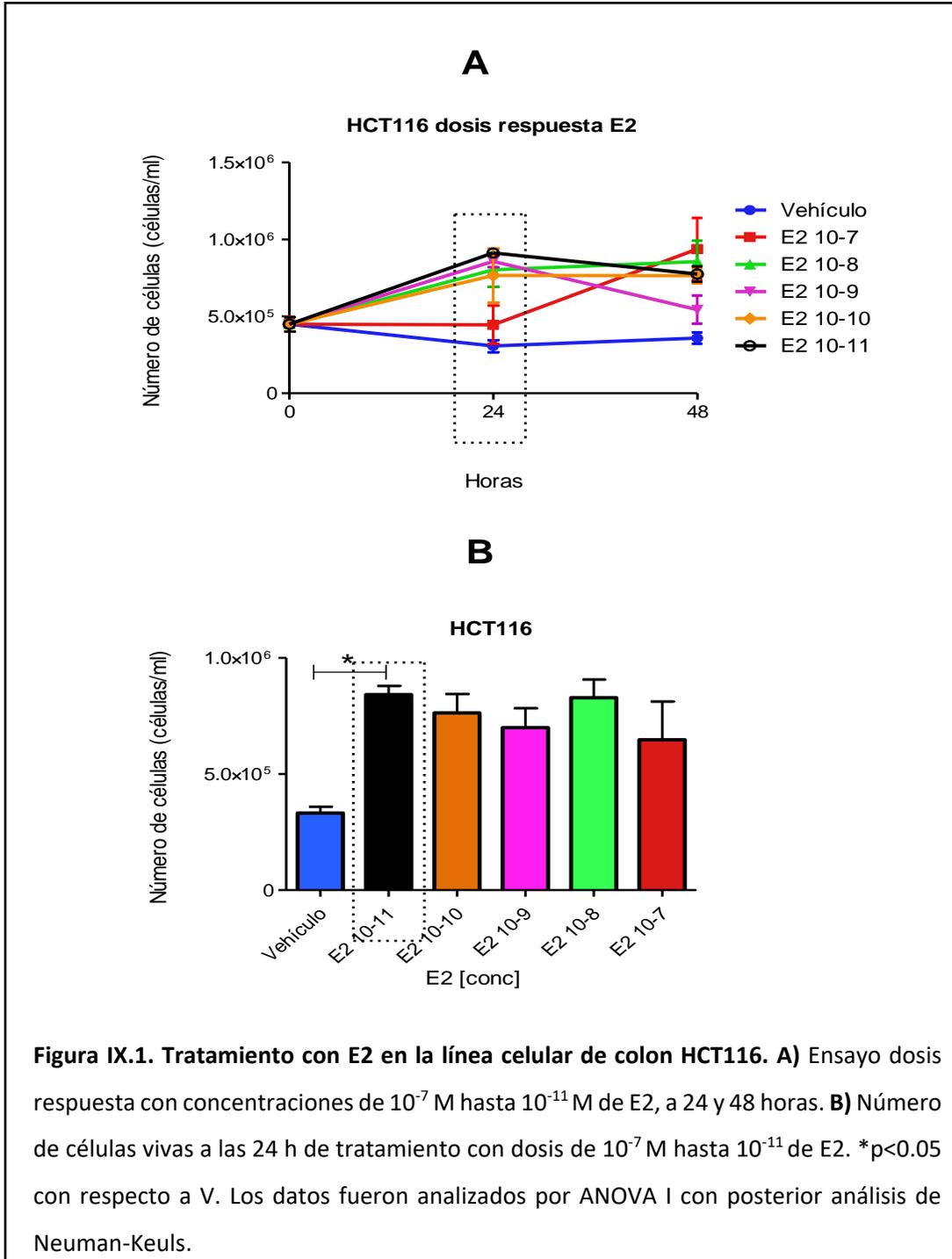
Además, dicho objetivo que involucra el uso de líneas celulares tumorales, sólo se enfocará en el cáncer de colon, donde la bibliografía presenta resultados controversiales. No se abordará desde el punto de vista de cáncer de mama ya que, como se aclaró en la introducción, los efectos de E2 y P4 en líneas celulares tumorales mamarias ya han sido ampliamente estudiados.

#### **RESULTADOS**

El primer experimento para cumplir este objetivo, apuntó a determinar la dosis a utilizar de E2 y P4. Para ello se realizaron curvas dosis-respuesta desde  $10^{-7}$  M hasta  $10^{-11}$  M de cada uno de los esteroides ováricos y se evaluó el efecto sobre la viabilidad en las dos líneas celulares de interés HCT116 y SW480.

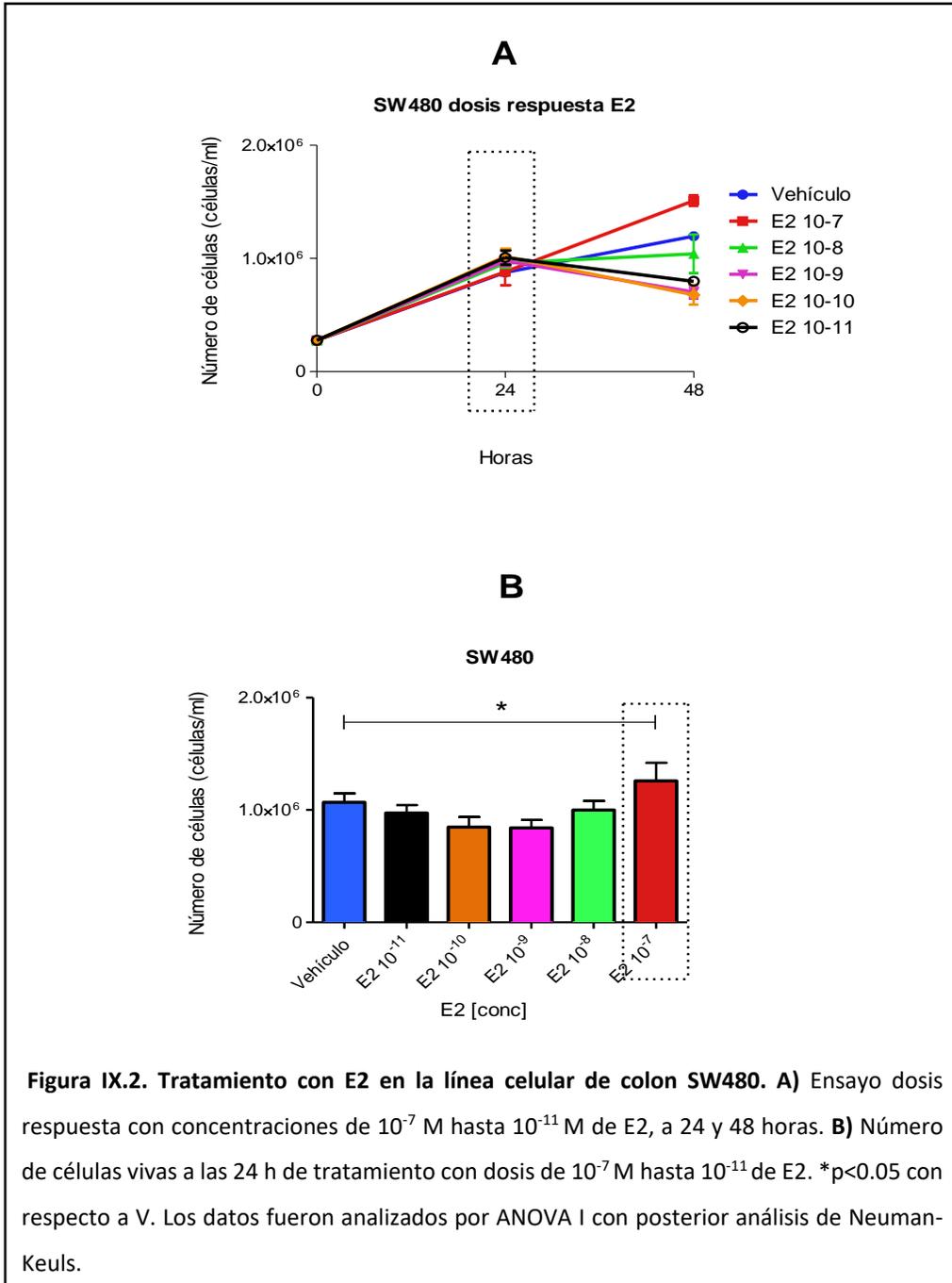
**El tratamiento con  $10^{-11}$  M de E2 aumenta la proliferación de las células HCT116**

La menor dosis de E2 que produjo un aumento en la proliferación a las 24 horas de la línea celular HCT116 comparado con el vehículo fue  $10^{-11}$  M ( $p < 0.05$ ), por lo que se eligió esta dosis para los demás estudios.



**El tratamiento con  $10^{-7}$  M de E2 aumenta la proliferación de las células SW480**

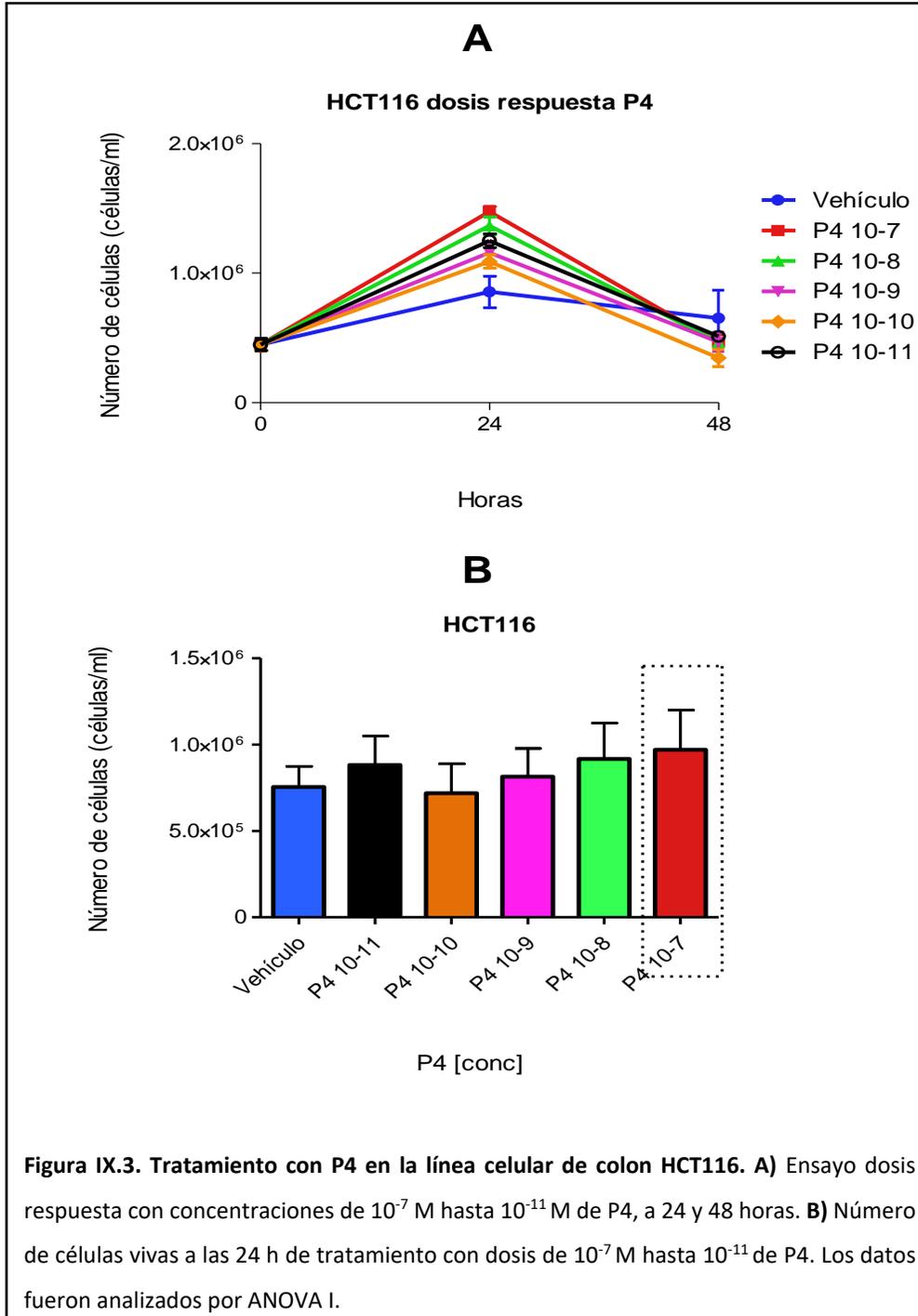
Se observó que la menor dosis de E2 que produce un aumento en la proliferación a las 24 horas de la línea celular SW480 comparado con el vehículo fue  $10^{-7}$  M ( $p < 0.05$ ), por lo que se considera la dosis de trabajo para futuros estudios.



**Figura IX.2. Tratamiento con E2 en la línea celular de colon SW480. A)** Ensayo dosis respuesta con concentraciones de  $10^{-7}$  M hasta  $10^{-11}$  M de E2, a 24 y 48 horas. **B)** Número de células vivas a las 24 h de tratamiento con dosis de  $10^{-7}$  M hasta  $10^{-11}$  de E2. \* $p < 0.05$  con respecto a V. Los datos fueron analizados por ANOVA I con posterior análisis de Neuman-Keuls.

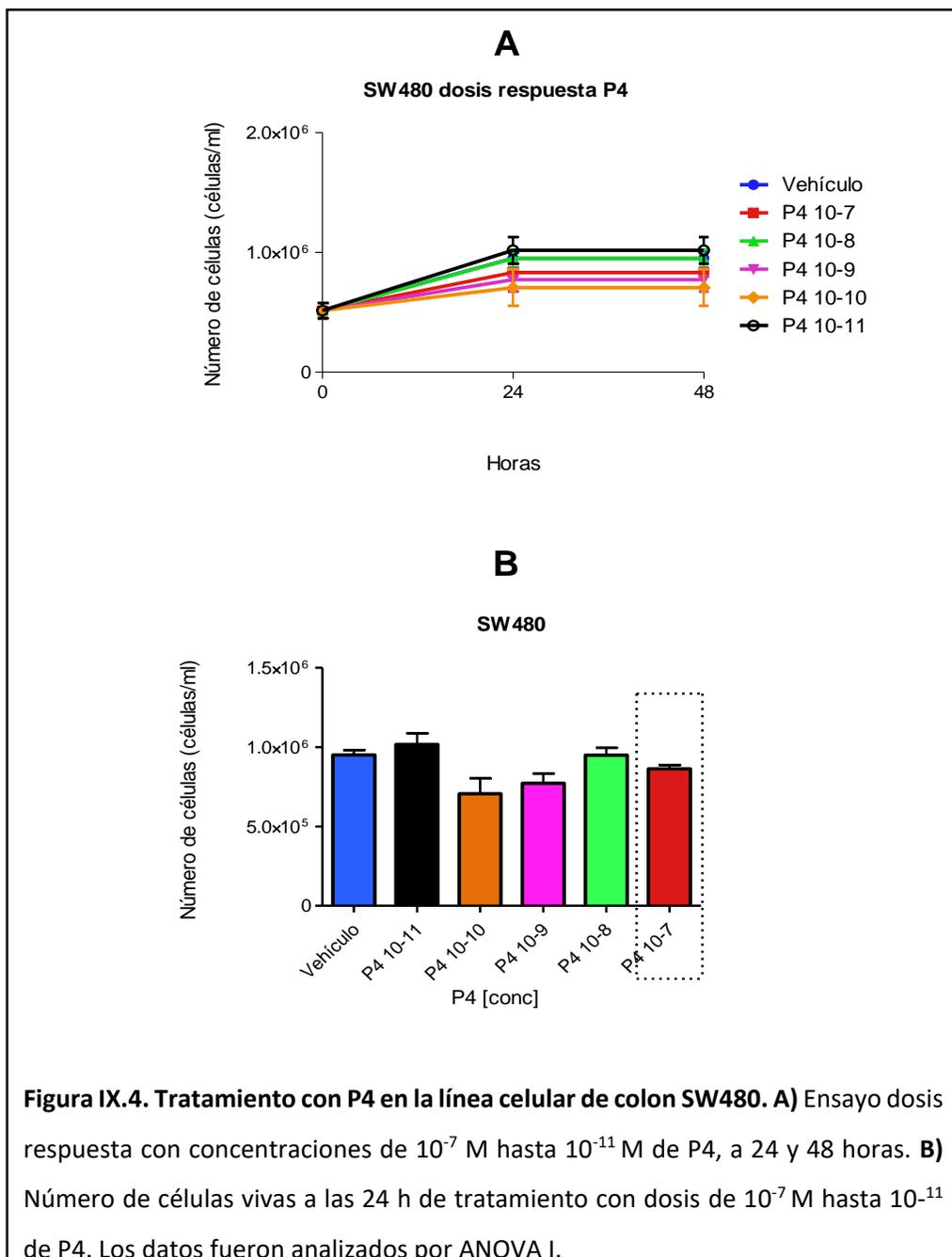
**El tratamiento con P4 no aumenta la proliferación de las células HCT116**

Se observó que P4 no tuvo un efecto significativo sobre la proliferación a las 24 horas en la línea celular HCT116 comparado con el vehículo. Por lo tanto, se tomó la dosis más alta  $10^{-7}$  M de P4 para futuros estudios.



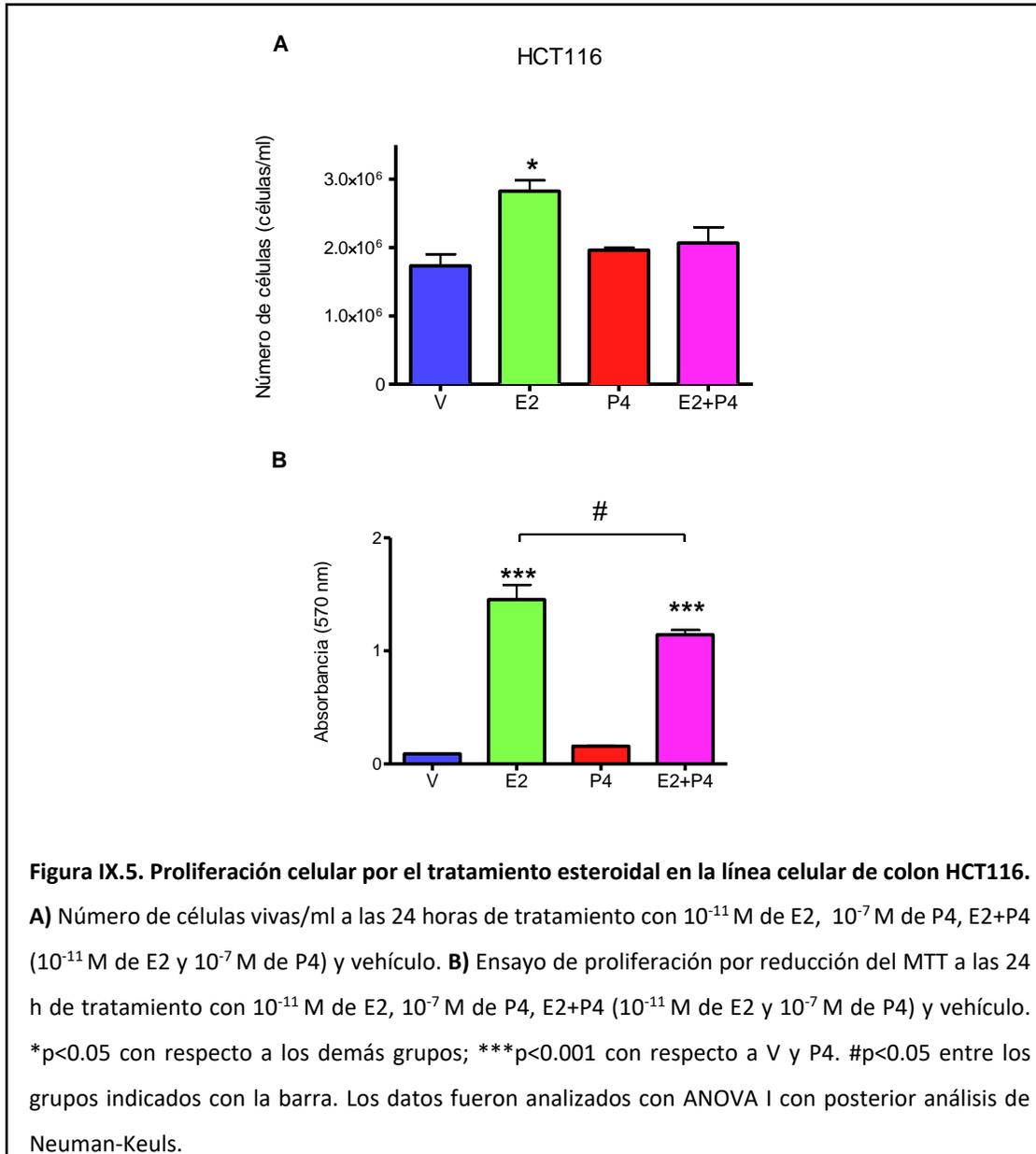
### El tratamiento con P4 no aumenta la proliferación de las células SW480

Se observó que P4 no tuvo un efecto significativo sobre la proliferación a las 24 horas en la línea celular SW480 comparado con el vehículo. Por lo tanto, se tomó la dosis más alta  $10^{-7}$  M de P4 para futuros estudios.



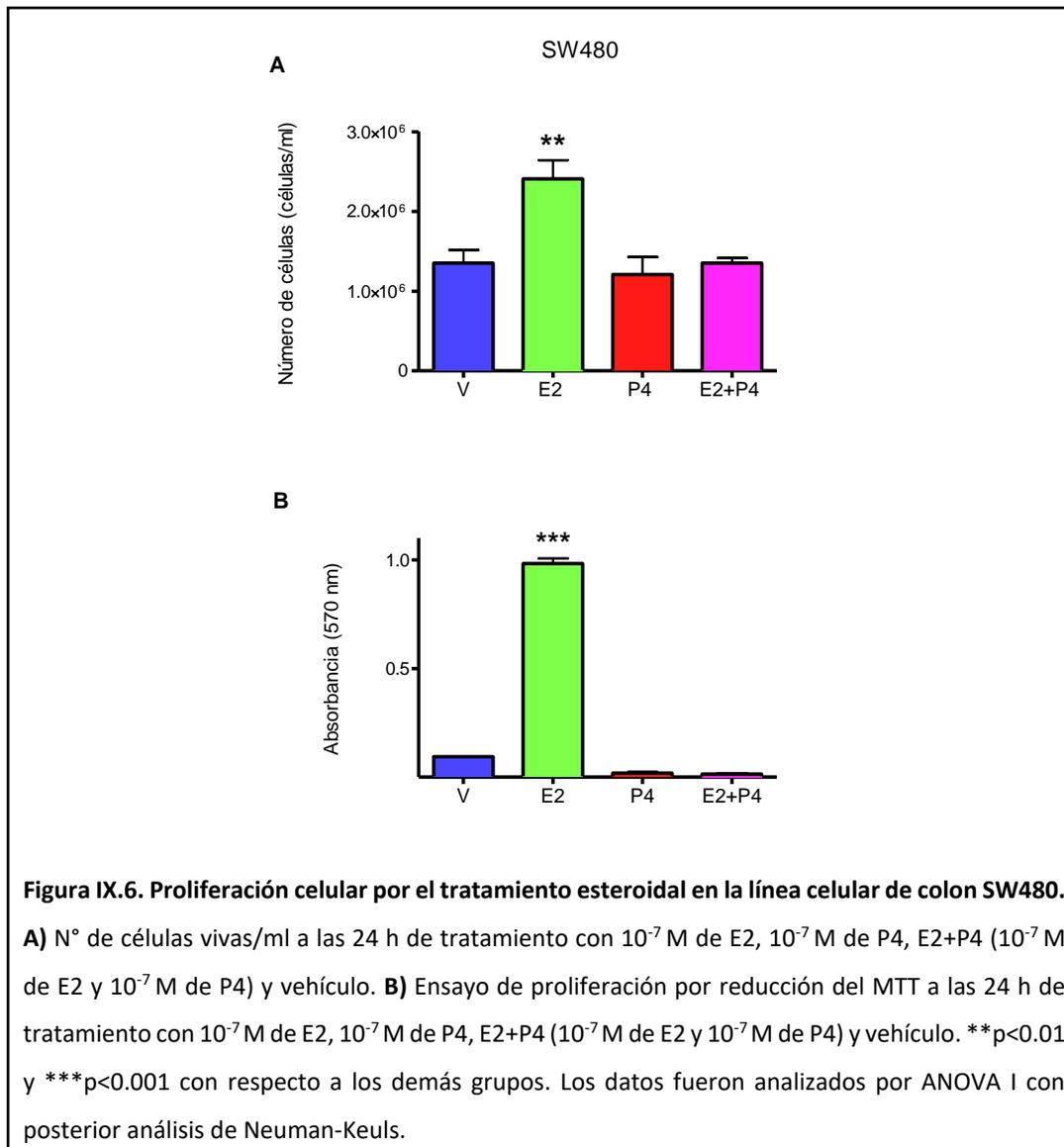
### El tratamiento con E2 aumenta la proliferación en las células HCT116

Cuando se compararon los diferentes tratamientos en las dosis determinadas y a las 24 horas de la exposición, se observó que E2 produjo la mayor proliferación en las células de cáncer de colon HCT116 con respecto a los demás grupos ( $p < 0.05$ ) en el caso de la determinación por azul de tripán. La adición de P4 revirtió totalmente el efecto del E2. Coincidentemente, con el ensayo de MTT, E2 también produjo una mayor proliferación ( $p < 0.001$ ), y en este caso la adición de P4 revirtió parcialmente el efecto de E2.



### El tratamiento con E2 aumenta proliferación en las células SW480

Cuando se compararon los diferentes tratamientos en las dosis determinadas y a las 24 horas de la exposición, se observó que E2 produjo la mayor proliferación de las células de cáncer de colon SW480, con respecto a los demás grupos ( $p < 0.01$  para el ensayo de azul tripán y  $p < 0.001$  para el ensayo de MTT). En ambos casos el efecto fue revertido por la administración conjunta de P4.



## **CAPÍTULO X**

### **DISCUSIÓN**

#### **Establecimiento de un modelo animal de menopausia humana**

Hace varios años que se postula a la terapia de reemplazo hormonal en mujeres menopáusicas como protectora ante el desarrollo tumoral de colon, pero con capacidad de aumentar el riesgo de cáncer de mama. En este trabajo de tesis se propuso evaluar los posibles mecanismos de dicha protección y su regulación diferencial en cáncer de mama utilizando un modelo en ratas de menopausia y terapia de reemplazo hormonal. Los modelos en roedores son herramientas invaluableles que sirven para estudiar el impacto de las fluctuaciones hormonales y su eventual disminución en una variedad de sistemas corporales. Si bien algunos de los mecanismos asociados al envejecimiento y a la transición a un estado de senescencia reproductivo pueden diferir cuando se trasladan de una especie a otra, los modelos animales proveen a los investigadores la oportunidad de entender conceptos claves relacionados a la menopausia. Algunas cepas de roedores son considerados mejores que otras para llevar a cabo este modelo, entre ellas las ratas Sprague Dawley (Foley et al. 2000). Hay varias metodologías que incluyen los modelos del ovario intacto (considerando el envejecimiento natural del animal), la ovariectomía (que es el modelo quirúrgico más preciso, ya que de esta manera se elimina la producción de esteroides ováricos endógenos) y los tratamientos químicos (que es el mejor modelo que simula la menopausia humana, por ejemplo el uso de 4-diepóxido de vinilciclohexano ó VCD). Este último modelo tiene el inconveniente de no poder dissociar los efectos del tratamiento con el carcinógeno químico del que pudieran producir *per se* las drogas usadas en el tratamiento antihormonal. Algo similar sucede con los fármacos aplicados para la terapia de reemplazo hormonal, generalmente esteroides sintéticos, algunos con comprobada acción carcinógena mamaria *per se* (Lanari & Molinolo 2002; Lee et al. 2016). En este trabajo se utilizó la ovariectomía ya que, si bien no se asemeja a la transición natural de la menopausia en la mujer porque en ésta se produce en una edad avanzada y en forma

progresiva, permitió controlar los niveles circulantes hormonales y realizar el tratamiento con carcinógenos químicos que, para que sean efectivos, deben administrarse a edades tempranas. En nuestro modelo se demostró que el tratamiento con esteroides de origen natural fue efectivo, tanto por los niveles hormonales que alcanzaron rangos fisiológicos como por el efecto que éstos ejercieron en el útero, y que fueron similares al grupo control SHAM. Se ha demostrado que el uso de la ovariectomía y el comienzo de las intervenciones una vez que los niveles de E2 han llegado a niveles indetectables en el plasma luego de 1 a 2 semanas, es un modelo de menopausia humana que ha sido y es ampliamente utilizado (Diaz Brinton 2012). Por todo lo expuesto, este modelo es válido para realizar estudios concernientes a menopausia y terapia de reemplazo hormonal.

### **Esteroides ováricos y epidemiología de cáncer de colon**

Para llevar a cabo el modelo experimental de cáncer de colon, se utilizó el carcinógeno 1,2-dimetilhidracina (DMH) que ha sido ampliamente usado para inducir adenocarcinoma de colon y recto en roedores con alta incidencia y especificidad (Druckrey et al. 1967; Nalini et al. 1997; Venkatachalam et al. 2016). La DMH es un inductor indirecto, ya que es metabolizado a azoximetano que es el agente directo que produce la alquilación del ADN en las células epiteliales del colon (Jucá et al. 2014). La histopatología de los tumores desarrollados con este carcinógeno es similar a la observada para los tumores de colon esporádicos humanos (LaMont y O’Gorman 1978; Pozhariski et al. 1979; Ahnen 1985; Rogers y Naus 1985; Jackson et al. 1999) y es un modelo altamente versátil para estudios de quimioprevención, genética y biología del cáncer de colon (Bissahoyo et al. 2005). Coincidentemente en el modelo llevado a cabo en esta tesis, los tumores producidos fueron similares a los tipos observados en la carcinogénesis humana. Al mismo tiempo, el tratamiento con DMH produjo una alta incidencia tumoral en todos los grupos experimentales. Si bien no se observaron diferencias significativas entre los grupos, sí se evidenció una tendencia de que el tratamiento con E2 disminuye la tumorigénesis, ya sea sólo o administrado con P4. Con respecto a estudios epidemiológicos en humanos, se ha

descrito que los esteroides ováricos tienen un efecto protector sobre el cáncer colorrectal, que varía entre un 20 % a un 40 % (Grodstein et al. 1999; Nanda et al. 1999; Lin et al. 2012). Sin embargo en mujeres que recibieron la terapia mientras fueron diagnosticadas con esta patología, presentaron un estadio más avanzado en la enfermedad. Por ello, aunque los estrógenos son inicialmente protectores, una vez que el cáncer colorrectal ha sido desarrollado, los estrógenos exógenos aumentan su crecimiento (Foster, 2013). En un metaanálisis llevado a cabo con datos publicados hasta el 2010, se concluyó que unos pocos estudios examinaron las asociaciones entre la terapia con estrógenos versus terapia combinada (estrógenos más progestinas) y cáncer colorrectal (Lin et al. 2012). El uso de la terapia combinada redujo significativamente el riesgo de cáncer colorrectal, mientras que el uso de la terapia con estrógenos sólo se asoció a un menor riesgo. La evidencia es escasa sobre un posible riesgo diferencial asociado con terapia combinada cíclica versus continua o rutas de administración (Mørch 2016). Por otro lado, estudios *in vivo* han indicado que los estrógenos inhiben la proliferación del cáncer colorrectal, mientras que otros sugieren que provocan efectos mitogénicos en esta patología (Foster 2013; Weige et al. 2009). Dichas controversias pueden deberse a las diferencias en los modelos experimentales en cuanto a la iniciación de la terapia (si es antes o posterior a la inducción carcinogénica), tipos y dosis de esteroides utilizados, duración del experimento, entre otros. Por ejemplo, en modelos de ratones con silenciamiento del gen APC (cuya pérdida produce tumores espontáneos en colon), el tratamiento con E2 produjo un incremento en la expresión del RE $\beta$  y una disminución del RE $\alpha$ , con una consecuente protección ante del desarrollo de la enfermedad (Weyant et al. 2001). Por lo tanto, es probable que la terapia de reemplazo hormonal en mujeres protege ante el cáncer de colon a través de un aumento del RE $\beta$  (Barzi 2013). Por ello, la menor tendencia en la incidencia observada en los grupos donde estaba presente E2 puede deberse a la expresión aumentada de este receptor, lo cual se discutirá más adelante.

### **Esteroides ováricos naturales y su efecto en la biología del cáncer de colon**

Por otro lado, el criterio que se tomó al momento de sacrificar los animales fue la evidencia de algún síntoma del desarrollo tumoral, como por ejemplo la presencia de diarrea, o pérdida de peso. Al graficar el día de sacrificio, se encontró que el tratamiento con P4 adelantó el mismo con respecto al tratamiento con E2+P4. Esto llevó a pensar que iba a encontrarse alguna diferencia en la incidencia, pero no fue así, sino que los tumores del grupo tratado con P4 se hicieron más evidentes en la sintomatología de los animales y esto llevó a adelantar su sacrificio. Dicho efecto puede haberse debido a la localización de los tumores, que fue principalmente en el colon distal de las ratas. Por otro lado, tanto en las curvas de supervivencia libre de tumor como en el número de tumores por rata, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. En este último punto, sí se observó una tendencia en los animales tratados con V a tener un número mayor de tumores. Esto estaría de acuerdo con el efecto protector de los esteroides ováricos, tal como ha sido reportado por Foster (2013) y Weige (2009), en este caso previniendo la aparición de nuevos tumores. Tanto el volumen como el peso de los tumores fueron mayores en el caso de las ratas tratadas con E2, pero no se encontraron diferencias en la densidad tumoral. Este resultado concuerda con Foster (2013) quien, como ya se mencionó, confirma que los estrógenos son protectores en el desarrollo del cáncer de colon, pero en estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, una vez desarrollada, cumplen una función proliferativa probablemente a través del  $RE\alpha$ , lo cual será discutido más adelante. Con respecto al índice mitótico/apoptótico de los tumores, se encontró aumentado en los grupos SHAM y E2 y disminuido por el tratamiento E2+P4. Esta observación fue confirmada por una disminución en la expresión de PCNA y un aumento en la expresión de caspasa 3 total y una tendencia al aumento de la forma clivada. Además, el tratamiento E2+P4 aumentó la expresión de PARP clivado y caspasa 8 clivada, pero no produjo cambios en caspasa 9 clivada ni en la relación Bax/Bcl-2. Todos estos resultados confirman los efectos apoptóticos del tratamiento combinado, principalmente a través de la vía extrínseca. Si bien el tratamiento individual con E2 aumenta el índice M/A en los tumores, este efecto se ve revertido por el tratamiento combinado con P4. Esto sugiere que el efecto anti-apoptótico de E2 es reprimido por P4. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Barzi

(2013) que propone que los efectos producidos por P4 son opuestos a los de E2, a través de la modulación de los genes relacionados a E2. Además, también hay estudios que afirman que la terapia de reemplazo hormonal sólo con estrógenos no produce cambios en la prevalencia o supervivencia después de desarrollar cáncer de colon en mujeres. Los autores postulan que es necesaria la P4 para la protección ante este tipo de cáncer por la modulación que ejerce sobre los efectos de los estrógenos en la carcinogénesis (Qasim et al. 2011).

### **Receptores de los esteroides ováricos y cáncer de colon**

Con respecto a la expresión de los receptores hormonales, estudios previos han presentado resultados controversiales en la expresión del RE $\alpha$  en el colon (Singh et al. 1993; Oshima et al 1998), principalmente en ensayos de inmunohistoquímica llevados a cabo en muestras de pacientes con cáncer colorrectal, donde se los ha considerado negativos para la expresión de este receptor (Slattery et al. 2000; Taggarshe et al. 2012). Dicha controversia puede deberse a los diferentes tratamientos durante el procesamiento de los tejidos, el método o los anticuerpos utilizados, o el nivel de tinción para considerar una muestra positiva (Jiang et al. 2008). Otros autores confirman la expresión del RE $\alpha$  en el colon, pero en muy bajos niveles comparado con la isoforma  $\beta$  (Weyant et al. 2001; Qasim et al. 2011). En este trabajo de tesis, se observó un incremento en la expresión del RE $\alpha$  por el tratamiento con E2 y una disminución del mismo en los tumores del grupo E2+P4. La mayor expresión de esta isoforma del receptor por el tratamiento con E2 puede explicar los efectos proliferativos observados en el índice M/A, ya que su activación supone un aumento en la proliferación en células epiteliales, promoviendo así la carcinogénesis (Chen & Iverson, 2012). El tratamiento con P4 disminuye la expresión del RE $\alpha$  y este efecto se ve potenciado cuando ambas hormonas están presentes. Recientemente se ha reportado en cáncer de mama que P4 promueve la interacción directa entre su receptor y el RE $\alpha$ , lo cual redirecciona la actividad transcripcional del RE $\alpha$ , bloqueando las acciones proliferativas provocadas por E2 sólo (Mohammed et al. 2015). Éste puede ser uno de los mecanismos implicados en las observaciones obtenidas con respecto a P4 y el RE $\alpha$  en el modelo de

cáncer de colon presentado en esta tesis. Por otro lado, con respecto a los receptores de estrógenos, se postula que en la progresión del cáncer de colon se va perdiendo la expresión del RE $\beta$  con un aumento en la expresión del RE $\alpha$ , lo que relacionaría este receptor con un perfil más invasivo de esta patología (Armstrong et al. 2013). Otro estudio ha reportado que la deficiencia del RE $\alpha$  se asocia con una mayor expresión de los genes blanco de la vía Wnt- $\beta$ -catenina, los cuales son claves para la carcinogénesis intestinal (Cleveland et al. 2009). Mientras que otro estudio ha reportado que la soja y la estrona protegen a ratones que no expresan el RE $\alpha$  ante el desarrollo de cáncer de colon, sugiriendo que esta isoforma del receptor de estrógenos no es necesaria para mediar los efectos protectores de los estrógenos en el cáncer de colon (Guo et al. 2004). Por lo tanto, aunque hay varios reportes sobre la presencia del RE $\alpha$  en el colon, la señalización de los estrógenos es mediada predominantemente a través del RE $\beta$  (Choiyookhuu et al. 2016). Con respecto a la expresión del RE $\beta$  en los tumores de este modelo, se vio disminuida en los grupos E2 y P4, mientras que aumentó significativamente por el tratamiento combinado. De esta manera la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$  se vio disminuida significativamente por el tratamiento combinado. Los efectos pro-apoptóticos observados por el tratamiento combinado de E2+P4 pueden deberse al aumento en la expresión del RE $\beta$ . Diversos estudios han descrito el rol antiproliferativo y pro-apoptótico del RE $\beta$  en los tumores de colon y se cree que dicho efecto puede deberse a la combinación de varios eventos tales como regulación del ciclo celular, disminución en la expresión de oncogenes como MYC y MYB, regulación de la respuesta antiinflamatoria y un incremento en la capacidad de reparación del ADN (Edvardsson et al. 2011). Justamente la pérdida de la expresión del RE $\beta$  en el colon normal produce un mayor riesgo de padecer cáncer y ya, una vez que se ha desarrollado la enfermedad, una menor expresión se asocia con menor porcentaje de supervivencia en los pacientes (Williams et al. 2016). Otra evidencia del RE $\beta$  y sus efectos antiproliferativos ha sido presentada con respecto a los compuestos naturales, incluyendo a los fitoestrógenos o agonistas selectivos del RE $\beta$ , que pueden activar o aumentar la expresión de este receptor en el colon y promover la apoptosis en modelos pre-clínicos y en la clínica (Barone et al. 2008; Williams et al. 2016). Por último, con respecto a los receptores de progesterona, hay algunos trabajos que

reportan la ausencia de la expresión de los RP4 en tumores de colon y ningún efecto de las progestinas sobre la carcinogénesis en modelos animales (Heijmans et al. 2011). Sin embargo, otros trabajos detectan la implicancia de P4, donde la expresión de los RP4 aumenta en orden de colon normal-adenoma-adenocarcinoma, demostrando un rol de los receptores en esta enfermedad (Qasim, 2011). En los resultados obtenidos en esta tesis, se observó una alta expresión por el tratamiento con E2 y una baja en el grupo tratado con P4. No se observaron cambios cuando se cuantificaron por separado las isoformas A y B del RP4. Por estos resultados se concluye que el RP4 parece estar exclusivamente regulado negativamente por su ligando, a diferencia de los RE que muestran tanto autoinducción como autorepresión. En células uterinas se ha demostrado que los RE unidos a E2 aumentan la expresión del RP4. Parece ser que en los tumores de colon este mecanismo de regulación permanece inalterado. Los efectos celulares de la P4 en colon han sido mínimamente estudiados, y la relación entre P4 y los RE aún no está dilucidada (Barzi et al. 2013). Hay algunos trabajos que proponen a los progestágenos sintéticos como agentes quimiopreventores sobre el cáncer de colon, pero poco se sabe sobre el rol de la P4 natural (Heijmans et al. 2011), ya que dichos trabajos han utilizado derivados sintéticos de esta hormona porque son los más comunes en las terapias de reemplazo hormonal. Pero éstos pueden provocar efectos diferentes a los causados por la P4 natural. Es por ello que hay tanta controversia en la bibliografía, lo que dificulta la comparación de resultados debido a que diferentes progestinas pueden asociarse a distintos tipos de estrógenos y a diferentes regímenes de administración (Campagnoli et al. 2005). Consecuentemente es necesario estudiar el efecto que produce la P4 sobre el desarrollo del cáncer de colon ya que es una hormona que está presente en los estadios tempranos de esta enfermedad en el caso de mujeres en edad fértil. En el caso de mujeres postmenopáusicas, son cada vez más quienes eligen usar P4 natural como terapia de reemplazo hormonal en vez de las progestinas sintéticas. Por ello resta dilucidar qué efectos tiene sobre la progresión tumoral, ya sea en su acción individual como en conjunto con E2.

#### **Acción de los esteroides ováricos naturales en modelos de cáncer de colon *in vitro***

Con respecto a la participación de los estrógenos en experimentos llevados a cabo in vitro, se han reportado resultados opuestos, ya que se ha visto que inhibe así como también estimula el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer de colon (Fiorelli et al. 1999). Algunos autores aseguran que el tratamiento con estrógenos produce efectos antiproliferativos, y que éstos son llevados a cabo por el RE $\beta$ , ya que se ha descrito que su expresión aumentada produce apoptosis, diferenciación celular y regulación del ciclo celular (Hartman et al. 2009; Edvardsson et al. 2011; He et al. 2012). Con respecto a P4 también hay controversia en los resultados obtenidos. Ciertos autores han descrito que P4 no induce la inhibición en el crecimiento de las líneas celulares DLD-1 (Nakayama et al. 2000), SW620 (English et al. 1999) y LoVo (Lointier et al. 1992). Mientras que otros sugieren un rol antiproliferativo de esta hormona, pero sólo a altas concentraciones ( $8 \times 10^{-5}$  M y  $10^{-4}$  M), ya que a dosis menores este efecto se pierde ( $10^{-5}$  M y  $10^{-10}$  M) (Motylewska y Melen-Mucha, 2009); y en el caso de las progestinas sintéticas, se ha demostrado que también tienen un efecto antiproliferativo confirmando los efectos protectores de esta hormona en cáncer de colon (Tanaka et al. 2008). Los resultados obtenidos hasta el momento en cuanto a los esteroides ováricos y su acción en líneas celulares de cáncer de colon, son conflictivos. Esto puede ser debido a los diferentes tipos de células utilizados, con su consecuente patrón diferencial en la expresión de los receptores hormonales, y a las diferentes concentraciones y tipos de hormonas utilizadas. En este trabajo de tesis se observó un efecto proliferativo de E2 a las 24 horas de tratamiento en las líneas HCT116 y SW480. Cuando se compararon los tratamientos individuales y combinados, se observó que P4 en una dosis de  $10^{-7}$  M revierte parcialmente los efectos estimulatorios de E2. Estos resultados apoyan los estudios ya mencionados que proponen a P4 con efectos opuestos al de E2 sobre el crecimiento tumoral en cáncer de colon. Resultaría interesante dilucidar cuál de las isoformas de su receptor está involucrada en dicho efecto y a través de qué vías se lleva a cabo.

#### **Acción de los esteroides ováricos naturales en cáncer de mama**

Por otro lado, el rol de los esteroides ováricos en el cáncer de mama ha sido mucho más estudiado que en el cáncer de colon. Estudios epidemiológicos recientes han revelado un incremento en la incidencia del cáncer de mama en mujeres que reciben terapia de reemplazo hormonal con estrógenos más progestinas, mientras que la terapia sólo con estrógenos no. Por ello, se propone a uno de los progestágenos sintéticos utilizados, el acetato de medroxiprogesterona, como facilitador del desarrollo de cáncer mamario, al actuar reduciendo la activación de genes apoptóticos inducidos por estrógenos (Jordan 2015; Sweeney et al. 2014).

### **Esteroides ováricos naturales y epidemiología de cáncer de mama**

Diversos modelos animales han sido desarrollados para el estudio de esta patología, entre ellos el uso del carcinógeno DMBA en roedores (Barros et al. 2004). La mayoría de las lesiones producidas en ratas tratadas con DMBA tienen su correspondencia en humanos, lo que permite la proyección desde la investigación básica a la clínica (Clarke 1997). En el modelo utilizado en esta tesis, el DMBA no produjo tumores mamarios en ausencia de los esteroides ováricos. Se ha reportado que P4 natural no aumenta el riesgo de cáncer mamario cuando es utilizada en terapia de reemplazo hormonal en mujeres (Fournier et al. 2005), mientras que en modelos animales el uso de progestinas sintéticas administradas de forma individual induce cáncer mamario (Lanari & Molinolo 2002; Lee et al. 2016). En nuestro modelo, el tratamiento con P4 produjo una baja incidencia tumoral del 22 %, mientras que la adición de E2 la aumentó hasta un 75 %. Esto se relaciona con un efecto protector de P4 natural ante el desarrollo tumoral, el cual es revertido por la presencia de E2. Por otro lado, el tratamiento sólo con E2 produjo una incidencia tumoral del 90 %. Diversos estudios en modelos animales han demostrado tanto efectos promotores como inhibidores de los esteroides ováricos sobre la carcinogénesis mamaria (Rajkumar et al. 2003; Tsukamoto et al 2007; Stires et al. 2016), dependiendo del origen y dosis de los mismos, tiempo y ruta de administración y si el tratamiento comienza antes o después de la exposición al carcinógeno. La incidencia en el grupo control SHAM fue del 100 %, algo mayor que el tratamiento combinado de E2 y P4. Esto puede deberse a que dichos animales,

al tener los ovarios intactos, poseen el ciclo estral y las oscilaciones en los niveles hormonales contribuyen al crecimiento tumoral. Este efecto también se hizo evidente al analizar la latencia de aparición de tumores del grupo SHAM, donde tendieron a aparecer antes que los demás grupos sometidos a la terapia de reemplazo hormonal. A su vez, el tratamiento sólo con P4 aumentó la sobrevida libre de tumor, confirmando el efecto protector de esta hormona, tal como se ha descrito para mujeres que han usado P4 natural como terapia de reemplazo hormonal (Fournier et al. 2005). Estudios emergentes sugieren que la acción de P4 es dependiente del entorno, como por ejemplo la exposición hormonal (presencia versus ausencia de estrógenos), tipo de órgano blanco (ya que posee acciones proliferativas en la mama pero antiproliferativas en el útero), dependencia de ligando (factores de crecimiento o quinasas) y reacción cruzada con otros receptores nucleares (Nair et al. 2016). Por otro lado, con respecto a la multiplicidad tumoral, se observó que el tratamiento sólo con E2 produjo la mayor cantidad de tumores por rata, seguido por los grupos SHAM y E2+P4. Mientras que P4 produjo la menor multiplicidad, confirmando una vez más el efecto protector ante el desarrollo tumoral. Aún así, en presencia de E2 este efecto se ve atenuado por la acción protumoral de esta hormona, el cual puede deberse al estado de los receptores discutido más adelante.

### **Esteroides ováricos naturales y su efecto en la progresión del cáncer de mama**

Los tumores provenientes del tratamiento combinado y SHAM crecieron más rápido. Sin embargo, el tratamiento sólo con E2 produjo un crecimiento más lento. En este aspecto, la combinación de ambas hormonas parece acelerar el crecimiento tumoral. Estas observaciones se correlacionan con el índice mitótico, ya que se observó un aumento por el tratamiento combinado y una disminución por E2. En cuanto al índice apoptótico, el mayor valor también lo produjo el tratamiento con E2+P4. Al hacer la relación entre los índices M/A, se observó una disminución por el tratamiento con E2 y un aumento por P4. En este aspecto, el lento crecimiento en los tumores de E2 se ve reflejado en el menor índice M/A observado, lo que implicaría un efecto más bien pro-apoptótico de E2 en los tumores mamarios. Si bien está documentado que los estrógenos están involucrados en el desarrollo

y la proliferación del cáncer de mama (Clemons & Goss 2001), también han surgido indicios de que el E2 es capaz de inducir apoptosis en modelos animales (Osipo et al. 2003; Zhang et al. 2009) y en células de cáncer de mama que han sido deprivadas de estrógenos por largo tiempo o han sido tratadas exhaustivamente con anti-estrógenos (Lewis-Wambi & Jordan 2009). Al sumarse la acción de P4 a E2, este efecto pro-apoptótico se mantiene, aunque también hay mayor presencia de células en mitosis. Esto puede explicar el crecimiento acelerado de los tumores del grupo E2+P4, lo que supone un mayor recambio de células en mitosis/apoptosis. Para confirmar estas observaciones, se analizaron proteínas marcadoras de proliferación y apoptosis. Con respecto a la expresión de PCNA se observó un aumento por el tratamiento con E2 en comparación a E2+P4, mientras que P4 presentó la menor expresión de Ki67. La expresión disminuida de PCNA por el tratamiento combinado se condice con una menor relación Bax/Bcl-2 y una tendencia a una mayor expresión de caspasa 3 total, lo que explica el mayor índice apoptótico observado en los tumores de este grupo. Aparentemente los mecanismos apoptóticos serían llevados a cabo por la vía intrínseca, pero esto debería ser confirmado con otros marcadores, como por ejemplo la caspasa 9 clivada y estudios sobre proteínas del ciclo celular.

### **Receptores de los esteroides ováricos y cáncer de mama**

Con respecto a la expresión de los receptores hormonales se observó que, si bien el tratamiento con E2 aumenta la expresión del RE $\alpha$  en los tumores mamarios y aumenta la expresión de PCNA, no se observa un efecto proliferativo por el índice mitótico en los tumores en el momento que fueron extirpados. Con respecto a la expresión del RE $\beta$ , se observó su presencia en todos los tumores sin diferencias entre los tratamientos hormonales. Al hacer la relación entre ambos tipos de receptores, no se observaron diferencias entre los grupos, aunque sí una tendencia a estar aumentada por el tratamiento con E2, mientras que muy disminuida en los grupos P4 y E2+P4. Considerando los efectos antiproliferativos que produce la activación del RE $\beta$ , el efecto pro-apoptótico observado por el tratamiento combinado se condice con la baja relación de las isoformas de los RE. Esto podría indicar que los efectos apoptóticos ejercidos por E2+P4 son conducidos por el

RE $\beta$  en los tumores mamarios. Hay estudios recientes que confirman la presencia de este receptor como un marcador pronóstico favorable en los tumores mamarios humanos (Elebro et al. 2016) y por otro lado la sobreexpresión del RE $\beta$  previene la formación tumoral en modelos animales (Paruthiyil et al. 2004). Con respecto a la expresión de los RP4 se encontró por inmunohistoquímica que su localización fue nuclear en todos los grupos, pero no se observaron diferencias cuantitativas en su expresión. Al hacer el análisis entre las isoformas A y B por Western blot, se observó una tendencia al aumento de las mismas por el tratamiento con P4, ya sea sólo o combinado con E2. Estos resultados concuerdan con estudios llevados a cabo en ratas (Stires et al. 2016), donde confirman que en los tumores se pierde la regulación normal de P4 en la glándula mamaria, ya que en el tejido normal el tratamiento con P4 produce una disminución de su receptor. Estos resultados arrojan un poco de claridad sobre el rol de P4 sobre la carcinogénesis de mama, que aún hoy en día es considerado controversial (Diep et al. 2015; Mohammed et al. 2015).

## **CONCLUSIONES GENERALES**

- El 17- $\beta$  estradiol y la progesterona natural tienen una participación activa y moduladora sobre la carcinogénesis de colon y de mama.
- Cuando son administrados de manera individual, sus efectos sobre la carcinogénesis son diferentes entre el modelo experimental de cáncer de colon y el de cáncer de mama. Si bien el 17- $\beta$  estradiol es imprescindible para la carcinogénesis mamaria, no lo es para el cáncer de colon.
- En cambio, su acción conjunta produce efectos antiproliferativos en los tumores de colon y mama, demostrando un efecto protector luego de iniciada la patología. Dichos efectos son modulados por una expresión aumentada de la isoforma beta del receptor de estrógenos y una expresión diferencial de los receptores de progesterona.

## **PERSPECTIVAS**

La base fundamental del desarrollo de esta tesis ha sido poder dilucidar la acción de los esteroides ováricos naturales sobre la progresión de dos patologías que son muy prevalentes en la actualidad alrededor del mundo, y de las cuales la acción hormonal permanece aún controversial. Si bien se han podido establecer las acciones que ejercen estos esteroides ováricos sobre la progresión tumoral en un modelo *in vivo*, éste posee sus limitaciones. El uso de cultivos primarios de los tumores obtenidos en los modelos experimentales podría arrojar herramientas de estudio mucho más versátiles, y de esta manera poder dilucidar mecanismos que el modelo *in vivo* no lo permite. También el uso de líneas celulares tumorales establecidas ha permitido una versatilidad en el desarrollo de los experimentos, aportando grandes conocimientos en la ciencia que han podido ser

aplicados a la salud humana. Específicamente hablando de los receptores esteroidales, el uso de inhibidores o su silenciamiento en células que los expresan, permite estudiar su acción sobre diferentes mecanismos en los que están implicados. Según los resultados obtenidos, sería de gran valor poder utilizar estas metodologías para dilucidar las acciones individuales o en interacción entre las diferentes isoformas de los receptores de estrógenos o progesterona y poder diferenciar si dichas acciones son llevadas a cabo por vías genómicas o no-genómicas, y la interacción entre los mismos, sobre todo en cáncer de colon, donde no ha sido dilucidado. También sería interesante poder estudiar los cambios epigenéticos que pueden llegar a producir los esteroides ováricos tanto en tejido normal como tumoral, y si estos están implicados en la carcinogénesis. Además, se podría investigar si otros tipos de muerte celular, aparte de la apoptosis, pueden estar implicados en los efectos de los esteroides en esta patología. Se espera poder seguir aportando conocimientos sobre la implicancia de estas hormonas y el impacto que tienen en la salud humana.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ahnen, D. J. (1985). Are animal models of colon cancer relevant to human disease. *Digestive diseases and sciences*, 30(12), 103S-106S.
- Arboccó, F. C. V., Sasso, C. V., Actis, E. A., Carón, R. W., Hapon, M. B., & Jahn, G. A. (2016). Hypothyroidism advances mammary involution in lactating rats through inhibition of PRL signaling and induction of LIF/STAT3 mRNAs. *Molecular and cellular endocrinology*, 419, 18-28.
- Arcos, M. (2009). Revisión y actualización general en cáncer colorrectal. *Anales De Radiologia, Mexico [revista en internet]*, 99-115.
- Armstrong, C. M., Billimek, A. R., Allred, K. F., Sturino, J. M., Weeks, B. R., & Allred, C. D. . (2013). A novel shift in estrogen receptor expression occurs as estradiol suppresses inflammation-associated colon tumor formation. *Endocrine-related cancer*, 20(4), 515-525.
- Barone, M., Tanzi, S., Lofano, K., Scavo, M. P., Guido, R., Demarinis, L., ... & Di Leo, A. . (2008). Estrogens, phytoestrogens and colorectal neoproliferative lesions. *Genes & nutrition*, 3(1), 7-13.
- Barros, A. C. S., Muranaka, E. N. K., Mori, L. J., Pelizon, C. H. T., Iriya, K., Giocondo, G., & Pinotti, J. A. (2004). Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene. *Revista do Hospital das Clínicas*, 59(5), 257-261.
- Barzi, A, Lenz, A. M., Labonte, M. J., & Lenz, H. J. (2013). Molecular pathways: estrogen pathway in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(21), 5842-5848.
- Bissahoyo A, Pearsall RS, Hanlon K, Amann V, Hicks D, Godfrey VL, Threadgill DW. (2005). Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: Effects of dose, route, and diet. *Toxicol Sci*, 88: 340–345.
- Campagnoli, C., Clavel-Chapelon, F., Kaaks, R., Peris, C., & Berrino, F. (2005). Progestins and progesterone in hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 96(2), 95-108.
- Chen, J, & Iverson, D. (2012). Estrogen in obesity-associated colon cancer: friend or foe? Protecting postmenopausal women but promoting late-stage colon cancer. *Cancer Causes & Control*, 23(11), 1767-1773.
- ChoiJookhuu, N., Hino, S. I., Oo, P. S., Batmunkh, B., & Hishikawa, Y. . (2016). The role of estrogen receptors in intestinal homeostasis and disease. *Receptors & Clinical Investigation*, 3(1).
- Clarke R. (1997). Animal models of breast cancer: experimental design and their use in nutrition and psychosocial research. . *Breast Cancer Res Treat* , 46:117-33.

- Clemons, M., & Goss, P. . (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 344(4), 276-285.
- Cleveland, A. G., Oikarinen, S. I., Bynoté, K. K., Marttinen, M., Rafter, J. J., Gustafsson, J. Å., ... & Mutanen, M. . (2009). Disruption of estrogen receptor signaling enhances intestinal neoplasia in ApcMin/+ mice. *Carcinogenesis*, 30(9), 1581-1590.
- Diaz Brinton, R. (2012). Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*, 153(8), 3571-3578.
- Diep CH, Daniel AR, Mauro LJ, Knutson TP, Lange CA. . (2015). Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol.*, 54(2):R31–53.
- Druckrey, H., Preussmann, R., Matzkies, F., & Ivankovic, S. . (1967). Selective production of intestinal cancer in rats by 1, 2-dimethylhydrazine. *Die Naturwissenschaften*, 54(11), 285-286.
- Edvardsson, K., Ström, A., Jonsson, P., Gustafsson, J. Å., & Williams, C. (2011). Estrogen receptor  $\beta$  induces antiinflammatory and antitumorigenic networks in colon cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 25(6), 969-979.
- Elebro, K., Borgquist, S., Rosendahl, A. H., Markkula, A., Simonsson, M., Jirström, K., ... & Jernstrom, H. . (2016). High estrogen receptor beta expression is prognostic among adjuvant chemotherapy-treated patients-results from a population-based breast cancer cohort. *Clinical Cancer Research*, Nov 3. pii: clincanres.1095.2016. [Epub ahead of print].
- English, M. A., Kane, K. F., Cruickshank, N., Langman, M. J., Stewart, P. M., & Hewison, M. (1999). Loss of estrogen inactivation in colonic cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(6), 2080-2085.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893-2917.
- Fiorelli, G., Picariello, L., Martineti, V., Tonelli, F., & Brandi, M. L. (1999). Functional estrogen receptor  $\beta$  in colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 261(2), 521-527.
- Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. (2000). Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* , 60: 245-248.
- Fontana, C. L., Zyla, L. E., Santiano, F. E., Sasso, C. V., Cuello-Carrión, F. D., Creydt, V. P., ... & Carón, R. W. (2017). Hypothyroidism reduces mammary tumor progression via B-catenin-activated intrinsic apoptotic pathway in rats. . *Histochemistry and Cell Biology*, 1-11.
- Foster, P. A. (2013). Oestrogen and colorectal cancer: mechanisms and controversies. *International journal of colorectal disease*, 28(6), 737-749.
- Fournier A, Berrino F, Riboli E, Avenel V, Clavel-Chapelon F. (2005). Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer*, 114:448–454.

- García García, V. G.-M. (2006). Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral: Resultados preliminares. *Avances en Odontoestomatología*, 22(5), 263-269.
- Grodstein, F., Newcomb, P. A., & Stampfer, M. J. (1999). Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *The American journal of medicine*, 106(5), 574-582.
- Guo, J. Y., Li, X., Browning, J. D., Rottinghaus, G. E., Lubahn, D. B., Constantinou, A., ... & MacDonald, R. S. . (2004). Dietary soy isoflavones and estrone protect ovariectomized ER $\alpha$ KO and wild-type mice from carcinogen-induced colon cancer. *The Journal of nutrition*, 134(1), 179-182.
- Hartman, J., Edvardsson, K., Lindberg, K., Zhao, C., Williams, C., Ström, A., & Gustafsson, J. Å. (2009). Tumor repressive functions of estrogen receptor  $\beta$  in SW480 colon cancer cells. *Cancer research*, 69(15), 6100-6106.
- He, Y. Q., Sheng, J. Q., Ling, X. L., Fu, L., Jin, P., Yen, L., & Rao, J. (2012). Estradiol regulates miR-135b and mismatch repair gene expressions via estrogen receptor- $\beta$  in colorectal cells. *Experimental & molecular medicine*, 44(12), 723-732.
- Heijmans, J., Muncan, V., Jacobs, R. J., de Jonge-Muller, E. S., Graven, L., Biemond, I., ... & Hommes, D. W. . (2011). Intestinal tumorigenesis is not affected by progesterone signaling in rodent models. *PLoS one*, 6(7), e22620.
- Huggins, C., Grand, L. C., & Brillantes, F. P. (1961). Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature*, 189, 204-207.
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2015). Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/diagnostico/hoja-informativa-marcadores-de-tumores>
- Jiang, H., Teng, R., Wang, Q., Zhang, X., Wang, H., Wang, Z., ... & Teng, L. (2008). Transcriptional analysis of estrogen receptor alpha variant mRNAs in colorectal cancers and their matched normal colorectal tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 112(1), 20-24.
- Jordan VC. (2015). The new biology of estrogen-induced apoptosis applied to treat and prevent breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 22: R1–31.
- Jucá, M. J., Bandeira, B. C., Carvalho, D. S., & Leal, A. T. . (2014). Comparative study of 1, 2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. *Journal of Coloproctology*, 34(3), 167-173.
- Kadam, C. Y., & Abhang, S. A. . (2016). Chapter Five-Apoptosis Markers in Breast Cancer Therapy. *Advances in clinical chemistry*, 74, 143-193.
- Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B., & Houshmand, M. (2015). Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? . *Iranian biomedical journal* 19(2), 69.

- Kuhl, H., & Schneider, H. P. G. (2013). Progesterone—promoter or inhibitor of breast cancer. *Climacteric*, 16(sup1), 54-68.
- LaMont JT, O’Gorman TA. (1978). Experimental colon cancer. *Gastroenterology*, 75: 1157–1169.
- Lanari, C., & Molinolo, A. A. (2002). Diverse activation pathways for the progesterone receptor: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Research*, 4(6), 240-243.
- Lange, C. A., & Yee, D. (2008). Progesterone and breast cancer. *Women’s Health*, 4(2), 151-162.
- Lee, O., Choi, M. R., Christov, K., Ivancic, D., & Khan, S. A. (2016). Progesterone receptor antagonism inhibits progesterone-related carcinogenesis and suppresses tumor cell proliferation. *Cancer letters*, 376(2), 310-317.
- Lewis-Wambi, J. S., & Jordan, V. C. (2009). Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Research*, 11(3), 1.
- Lin, K. J., Cheung, W. Y., Lai, J. Y. C., & Giovannucci, E. L. (2012). The effect of estrogen vs. combined estrogen-progesterone therapy on the risk of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 130(2), 419-430.
- Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. (2006). ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *J Clin Oncol* 24(33):, 5313-5327.
- López-Fontana, C. M., Sasso, C. V., Maselli, M. E., Santiano, F. E., Semino, S. N., Cuello Carrión, F. D., ... & Carón, R. W. (2013). Experimental hypothyroidism increases apoptosis in dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors. *Oncology reports*, 30(4), 1651-1660.
- Marino, M. (2014). Xenoestrogens challenge 17 $\beta$ -estradiol protective effects in colon cancer. *World J Gastrointest Oncol*, 6(3), 67-73.
- Melling, N., Kowitz, C. M., Simon, R., Bokemeyer, C., Terracciano, L., Sauter, G., ... & Marx, A. H. . (2016). High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology*, 69(3), 209-214.
- Meresman, G. (2011). Relevancia de la apoptosis en la reproducción femenina. *Investigación Clínica*, 52(3), 274-290.
- Mohammed, H., Russell, I. A., Stark, R., Rueda, O. M., Hickey, T. E., Tarulli, G. A., ... & Menon, S. . (2015). Progesterone receptor modulates ER alpha action in breast cancer. *Nature*, 523(7560), 313-317.
- Mørch, L. S., Lidegaard, Ø., Keiding, N., Løkkegaard, E., & Kjær, S. K. (2016). The influence of hormone therapies on colon and rectal cancer. *European journal of epidemiology*, 31(5), 481-489.
- Motylewska E, Mefen-Mucha G. (2009). Estrone and progesterone inhibit the growth of murine MC38 colon cancer line. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* , 113, 75–79.

- Nair, H. B., Santhamma, B., Krishnegowda, N. K., Dileep, K. V., & Nickisch, K. J. (2016). Effects of Combination of Estradiol with Selective Progesterone Receptor Modulators (SPRMs) on Human Breast Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *PloS one*, 11(3), e0151.
- Nakayama, Y., Sakamoto, H., Satoh, K., & Yamamoto, T. . (2000). Tamoxifen and gonadal steroids inhibit colon cancer growth in association with inhibition of thymidylate synthase, survivin and telomerase expression through estrogen receptor beta mediated system. *Cancer letters*, 161(1), 63-71.
- Nalini, N., Sabitha, K., Chitra, S., Viswanathan, P., & Menon, V. P. . (1997). Histopathological and lipid changes in experimental colon cancer: effect of coconut kernal (*Cocos nucifera* Linn.) and (*Capsicum annum* Linn.) red chilli powder. *Indian journal of experimental biology*, 35(9), 964-971.
- Nanda, K., Bastian, L. A., Hasselblad, V., & Simel, D. L. . (1999). Hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*, 93(5, Part 2), 880-888.
- Oshima, C. T., Wonraht, D. R., Catarino, R. M., Mattos, D., & Forones, N. M. . (1998). Estrogen and progesterone receptors in gastric and colorectal cancer. *Hepato-gastroenterology*, 46(30), 3155-3158.
- Osipo C, Gajdos C, Liu H, Chen B, Jordan VC. (2003). Paradoxical action of fulvestrant in estradiol-induced regression of tamoxifen-stimulated breast cancer. . *J Natl Cancer Inst*, 95:1597-1608.
- P. Lointier, D.M. Wildrick, B.M. Boman. (1992). The effects of steroid hormones on a human colon cancer cell line in vitro. *Anticancer Res*, 12 (4) 1327–1330.
- Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G. R., Firestone, G. L., & Leitman, D. C. (2004). Estrogen receptor  $\beta$  inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer research*, 64(1), 423-428.
- Peta E. Jackson, Donald P. Cooper, Peter J. O'Connor, and Andrew C. Povey. (1999). The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: tumour development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. *Carcinogenesis*, 20 (3): 509-513.
- Pozharisski, K.M., Likhachev, A.J., Klimashevski, V.F. and Shaposhnikov, J.D. (1979). Experimental intestinal cancer research with special reference to human pathology. *Adv. Cancer Res.*, 30, 165–237.
- Qasim, B. J., Ali, H. H., & Hussein, A. G. (2011). Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in human colorectal adenoma and carcinoma using specified automated cellular image analysis system: a clinicopathological study. *Oman Med J*, 26(5), 307-314.
- Qasim, B. J., Ali, H. H., & Hussein, A. G. (2012). Immunohistochemical expression of PCNA and CD34 in colorectal adenomas and carcinomas using specified automated cellular image analysis

- system: A clinicopathologic study. *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 18(4), 268.
- Rajkumar, L., Guzman, R. C., Yang, J., Thordarson, G., Talamantes, F., & Nandi, S. (2003). Prevention of mammary carcinogenesis by short-term estrogen and progesterin treatments. *Breast Cancer Research*, 6(1), 1.
- Rogers, A. E. and Nauss, K. M. . (1985). Rodent models for carcinoma of the colon. *Dig. Dis. Sci*, 30, 875–1025.
- Sasso, C. V., Santiano, F. E., López-Fontana, C. M., Pistone-Creydt, V., Ezquer, M. E., Hapon, M. B., ... & Carón, R. W. (2014). Effects of parity and serum prolactin levels on the incidence and regression of DMBA-induced tumors in OFA hr/hr rats. *BioMed research international*.
- Sharma, D., Smits, B. M., Eichelberg, M. R., Meilahn, A. L., Muelbl, M. J., Haag, J. D., & Gould, M. N. (2011). Quantification of epithelial cell differentiation in mammary glands and carcinomas from DMBA-and MNU-exposed rats. *PLoS one*, 6(10), e26145.
- Singh, S., Sheppard, M. C., & Langman, M. J. (1993). Sex differences in the incidence of colorectal cancer: an exploration of oestrogen and progesterone receptors. *Gut*, 34(5), 611-615.
- Slattery, M. L., Samowitz, W. S., & Holden, J. A. (2000). Estrogen and progesterone receptors in colon tumors. *American journal of clinical pathology*, 113(3), 364-368.
- Spiliotaki, M., Mavroudis, D., Kapranou, K., Markomanolaki, H., Kallergi, G., Koinis, F., ... & Agelaki, S. Spiliotaki, M., Mavroudis, D., Kapranou, K., Markomanolaki, H., Kallergi, G., Koinis, F., ... & Agelaki, S. (2014). Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy. *Breast Cancer Research*, 16(6), 485.
- Stires, H., Saboya, M., Globerman, S. P., & Cohick, W. S. (2016). Peroral Estradiol Is Sufficient to Induce Carcinogen-Induced Mammary Tumorigenesis in Ovariectomized Rats without Progesterone. *PLoS one*, 11(9), e0162662.
- Sweeney EE, Fan P, Jordan VC. (2014). Molecular modulation of estrogen-induced apoptosis by synthetic progestins. *Cancer Res*. 2014, 74: 7060–7068.
- Taggarshe, D., Loboeki, C., Silberberg, B., McKendrick, A., & Mittal, V. K. (2012). Clinicopathological significance of the expression of estrogen receptor-beta and vascular endothelial growth factor-A in colorectal cancer. *The American Surgeon*, 78(12), 1.
- Tanaka Y, Kato K, Mibu R, Uchida S, Asanoma K, Hashimoto K, Nozaki M, Wake N. (2008). Medroxyprogesterone acetate inhibits proliferation of colon cancer cell lines by modulating cell cycle-related protein expression. *Menopause*, 15(3):442-53.
- Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 8, 5. <http://doi.org/10.4103/1477-3163.49014>
- Troncoso, M., Carrión, F. D. C., Guiñazu, E., Fanelli, M. A., Montt-Guevara, M., Cabrini, R. L., ... & Kreimann, E. L. . (2011). Expression of NHERF1 in colonic tumors induced by 1, 2-

- dimethylhydrazine in rats is independent of plasma ovarian steroids. *Hormones and Cancer*, 2(4), 214.
- Tsukamoto, R., Mikami, T., Miki, K., Uehara, N., Yuri, T., Matsuoka, Y., ... & Tsubura, A. (2007). N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis is promoted by short-term treatment with estrogen and progesterone mimicking pregnancy in aged female Lewis rats. *Carcinogenesis*, 8, 15.
- Venkatachalam, K., Gunasekaran, S., & Namasivayam, N. . (2016). Biochemical and molecular mechanisms underlying the chemopreventive efficacy of rosmarinic acid in a rat colon cancer. *European Journal of Pharmacology*, 791, 37-50.
- Weige, C. C., Allred, K. F., & Allred, C. D. (2009). Estradiol alters cell growth in nonmalignant colonocytes and reduces the formation of preneoplastic lesions in the colon. *Cancer research*, 69(23), 9118-9124.
- Weyant, M. J., Carothers, A. M., Mahmoud, N. N., Bradlow, H. L., Remotti, H., Bilinski, R. T., & Bertagnolli, M. M. . (2001). Reciprocal expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  is associated with estrogen-mediated modulation of intestinal tumorigenesis. *Cancer Research*, 61(6), 2547-2551.
- Williams, A. T., & LIPNER, H. (1982). The contribution of gonadostatin (inhibin-F) to the control of gonadotropin secretion in a simulated estrous cycle in steroid-treated ovariectomized rats. *Endocrinology*, 111(1), 231-237.
- Williams, C., DiLeo, A., Niv, Y., & Gustafsson, J. Å. (2016). Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. *Cancer letters*, 372(1), 48-56.
- Zhang Y, Zhao H, Asztalos S, Chisamore M, Sitabkhan Y, Tonetti DA. (2009). Estradiol-induced regression in T47D:A18/PKCalpha tumors requires the estrogen receptor and interaction with the extracellular matrix. *Mol Cancer Res*, 7:498-510.