Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
ESCUELA DE BIOQUÍMICA

Profesor Patrocinante:Dra. Claudia Sáez S.
Instituto Hemato-Oncología
Facultad Medicina.

Pontificia Universidad Católica de Chile.
Profesor Copatrocinante: Dra. Gloria León R.
Instituto Bioquímica
Facultad Ciencias.
Universidad Austral de Chile.

Participación de la comunicación intercelular por uniones en hendidura en el efecto Quimiopreventivo del ácido All-trans Retinoico y Tamoxifeno en líneas celulares de Adenocarcinoma mamario humano

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de ***Licenciado en Bioquímica*** y al Título profesional de ***Bioquímico***

Luis Alejandro Velásquez Almonacid

Valdivia Chile 2002

Agradecimientos

- A mis padres, Julio y Mirza, quienes con su incondicional amor y cariño han sido el permanente estimulo en mi vida. Gracias por el gran esfuerzo que han hecho para la realización de mi carrera profesional y por el infinito apoyo entregado durante todo el período de tiempo transcurrido desde el día en que emigré desde Puerto Montt.
- A mis hermanos Julio y Marlen, quienes han sido pilares importantes en mi vida, quienes me han entregado incondicionalmente apoyo y amor, y han sido fuentes de inspiración e imitación en lo que a esfuerzo y dedicación respecta.
- A mis sobrinos, Fabián, Ana, Ferdinando y Rocío, quienes han sido y serán la razón de mi vida.
- A Nello y Cecilia, por todo el cariño, amistad y comprensión entregada.
- A la Dra. Claudia Sáez, por su incondicional e incesante apoyo intelectual, experimental y anímico durante el desarrollo de esta tesis. Por sus sabias enseñanzas, dirigidas a una formación profesional y humana. Por su paciencia y disposición tanto para transmitir sus conocimientos como para escuchar todo tipo de inquietudes y consultas. Por la confianza depositada en mi.
- A Mónica Soto, quien con su permanente apoyo, fue una persona esencial en mi vida desde mi llegada a Stgo.
- Al Dr. Manuel Alvarez, quien es el gestor y creador del Laboratorio de Oncología.
- A Francisco Bastidas, quien me recibió en el laboratorio y tuvo la difícil misión de enseñarme el manejo y las técnicas. Gracias por su paciencia y dedicación.
- Al personal del Laboratorio de Oncología Celular, y en forma muy especial a Claudia Acevedo y Concepción Risueño, por su constante apoyo y por la amistad entregada.

- Al Dr. Juan Carlos Sáez, por su disponibilidad y los sabios consejos entregados.
- Al personal del Laboratorio del Dr. Sáez.
- A Rita, secretaria del Departamento de Cirugía Digestiva, por la paciencia y buena voluntad.
- A mis amigos David y Victor, por su amistad, consejos y el constante apoyo entregado durante todo el desarrollo de mi carrera.
- Al departamento de anatomía patológica de la U. Católica, y en forma especial a los doctores Marcela Gallegos e Ivan Vistuba, por su colaboración en el estudio de marcadores en tumores mamarios humanos.
- Este trabajo de tesis fue financiado por el proyecto Fondecyt 1990120.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	VI
Lista de abreviaturas	VII
1.- RESUMEN	1
SUMMARY	2
2.- INTRODUCCIÓN	3
3.- MATERIALES Y METÓDOS	13
3.1.- Materiales y reactivos	13
3.2.- Métodos	15
3.2.1.- Preparación de drogas	15
3.2.2.- Cultivo celular	15
3.2.3.- Comunicación intercelular por UHs	16
3.2.3.a) Microinyección	16
3.2.3.b) “Scrape loading”	17
3.2.4.- Inmunocitoquímica	17
3.2.5.- Transferencia de “Western”	18
3.2.6.- Proliferación celular	19
3.2.6.a) Incorporación de timidina metil-^{3}H	19

3.2.6.b) Incorporación de bromo-deoxy-Uridina 20

3.2.7.- Parámetros del ciclo celular por citometría de flujo 20

3.2.8.- Muerte celular 21

3.2.8.a) Incorporación de yoduro de propidio por exclusión 21

3.2.8.b) TUNEL 21

3.2.9.- Inmunohistoquímica de conexinas y marcadores tumorales en cortes de tumores mamarios humanos 23

3.2.10.- Pacientes 23

4.- RESULTADOS 24

4.1.- Línea celular MCF-7 24

4.1.a.- Comunicación intercelular por uniones en hendidura 24

4.1.b.- Inmunodetección de conexinas en células MCF-7 27

4.1.c.- Efecto de AR+Tx en la expresión de conexinas en células MCF-7 30

4.1.d.- Efecto de AR+Tx sobre proliferación celular 33

4.1.e.- Evaluación de cambios en el grado de diferenciación celular 35

4.1.f.- Determinación de Bcl-2 y c-Myc 37

4.1.g.- Determinación de proliferación celular con el inhibidor de la CI por UHs 40

4.1.h.- Efecto de tratamiento con AR+Tx sobre muerte celular inducida 44

4.1.i.- Efecto de inhibición de la CI por UHs en la expresión de E-cadherina y marcadores tumorales 47

4.2.- Línea celular MDA-MB.231 50

4.2.a.- Comunicación intercelular por uniones en hendidura 50

4.2.b.- Niveles proteicos de Cxs en células MDA-MB.231 tratadas con ácido retinoico + tamoxifeno 53

4.2.c.- Proliferación celular en células MDA-MB.231 tratadas con AR+Tx 55

4.2.d.- Muerte celular en células MDA tratadas con AR+Tx 58

4.2.e.- Expresión de marcadores tumorales en las células MDA-MB.231 60

4.3.- Inmunohistoquímica en biopsias de tumores mamarios humanos 64

4.3.a.- Correlación significativa con el grado de diferenciación tumoral 76

4.3.b.- Tendencia 79

4.3.c.- Correlación con metástasis 81

5.- DISCUSIÓN 85

6.- BIBLIOGRAFÍA 92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 : CI por UHs en células MCF-7 control y tratadas con AR y Tx 26

Figura 2 : Inmunocitoquímica para conexinas en MCF-7 29

Figura 3 : "Western blot" para conexinas en MCF-7 32

Figura 4 : Proliferación celular por incorporación de BrdU 34

Figura 5 : Determinación de E-cadherina en MCF-7 36

Figura 6 : Niveles proteicos de Bcl2 y c-Myc 39

Figura 7 : Proliferación celular en presencia del inhibidor de CI por UHs 42

Figura 8 : Distribución de células en el ciclo celular 43

Figura 9 : Análisis de apoptosis en células MCF-7 46

Figura 10: Niveles proteicos de E-cadherina, bcl2 y c-Myc en presencia del inhibidor de UHs 49

Figura 11: CI por UHs en células MDA-MB.231 control y tratadas con AR+Tx 52

Figura 12: Niveles proteicos de Cxs en células MDA-MB.231 54

Figura 13: Proliferación celular en células MDA-MB.231 56

Figura 14: Muerte celular en MDA-MB.231: efecto de AR+Tx y de la inhibición de la CI por UHs 59

Figura 15: Niveles proteicos de marcadores tumorales en células MDA-MB.231 62

Figura 16. Inmunotinción de Cx 26 en cortes de tejido mamario humanos 67

Figura 17. Inmutinción de Cx 43 en cortes de tejido mamario humano 69

Figura 18. Inmuno-detección de Cx 40 en tejido mamario humano 71

Figura 19. Inmunodetección de E-cadherina en diferentes cortes de tejido mamario humano 73

Figura 20. Inmutinción de c-Myc en diferentes cortes de tejido mamario humano 75

INDICE DE TABLAS

Tabla I : Ciclo celular por citometría de flujo con yoduro de propidio 57

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc : adenosina mono-fosfato cíclico

AR : ácido all-trans retinoico

BGA: ácido 18-β-gliceriténico

BrdU : bromo-deoxy-uridina

cDNA: DNA complementario

Cx(s) : conexina(s)

CI : Comunicación intercelular

Da : dalton

DMSO: di-metil sulfóxido

DNA : ácido desoxi-ribonucleico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GMPc : guanosina mono-fosfato cíclico

IgG: inmunoglobulina G

IP3 : inositol-tri- fosfato

KDa : kilo dalton

M: molar

mM: mili molar

nm: nanometros

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

RARs : receptores de ácido retinoico

RE: receptor de estrógeno

SDS: dodecilsulfato de sodio

Tris: ácido tris-(hidroximetil)-aminometano

TUNEL : Terminal desoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling

UHs : Uniones en hendidura

1. RESUMEN

La utilización de la combinación de agentes anti-neoplásicos dirigidos contra uno o más mecanismos alterados en cáncer puede resultar en efectos aditivos contra células tumorales. Investigamos la participación de la comunicación intercelular por uniones en hendidura (CI por UHs), comúnmente disfuncional en células tumorales, como un posible mecanismo mediador del efecto del ácido all-trans retinoico (AR) y tamoxifeno (Tx) en las líneas celulares, MCF-7 y MDA-MB-231. Además estudiamos la correlación de la expresión de Cxs 26, 40, 43, E-cadherina y c-Myc en cortes de tumores mamarios con el grado de diferenciación tumoral y metástasis. En células MCF-7, AR+Tx estimula la CI por UHs en un 53+/-3% a partir de las 6 horas de tratamiento, permaneciendo más comunicadas que las células control por 144 h de cultivo. El aumento en la CI por UHs concuerda con la inmunolocalización de Cx26 y 43 en la membrana de aposición celular y se correlaciona con un aumento de sus niveles proteicos. En células MCF-7, aproximadamente un 35% de la inhibición de la proliferación celular y alrededor de un 30% de la inducción de la diferenciación celular estimulada por AR+Tx, fue mediada por la CI por UH. La CI no afectó la disminución de los niveles proteicos de Bcl-2 y C-myc observados por el tratamiento con AR+Tx. En células MDA-MB-231, AR+Tx induce un aumento en la CI por UHs durante las primeras 48 horas, sin afectar la proliferación celular ni la disminución de los niveles proteicos de Bcl-2 o c-Myc. El tratamiento induce mayor muerte a partir de las 96h de cultivo, sin involucrar la participación de la CI por UHs. En tumores mamarios, la expresión de Cx43 y de c-Myc en la membrana de las células tumorales se correlacionó con un mayor grado de diferenciación histológica. Los resultados obtenidos sugieren que el aumento de la CI por UHs podría facilitar el efecto antineoplásico de AR+Tx en células tumorales y posiblemente condicionarlas a una mejor acción de agentes anti neoplásicos tradicionales.

SUMMARY

Additive effect against tumor cells might be achieved using combinations of anti neoplastic agents directed to one or more altered mechanisms in cancer. We investigated the participation of gap junctional intercellular communication (GJIC), commonly dysfunctional in tumor cells, as a possible mediator mechanism of the effect of retinoic acid all-trans (RA) and tamoxifen (Tx) in MCF-7 and MDA-MB 231 human carcinoma cell lines. In addition, we studied the possible correlation of Cxs26, 43 and 40, and E-cadherin and c-Myc expression in human breast cancer biopsies with the histological degree of tumoral differentiation and with metastasis. In MCF-7 cells, RA+Tx enhanced GJIC in approximately 53+/- 3% beginning at 6h of treatment and remaining more communicated than control cells for the 144h of culture. The increased GJIC correlated with a higher immunolocalization of Cxs 26 and 43 at the membrane of contacting cells and with higher protein levels. In MCF-7 cells, approximately a 35% of the proliferation inhibition, and nearly 30% of the cell differentiation induction due to the chemopreventive agents action was mediated by GJIC. GJIC did not affect the protein down-regulation of Bcl-2 and c-Myc observed by RA+Tx. In MDA-MB 231 cells, RA+Tx induced an enhancement of GJIC during the first 48h of treatment without altering cell proliferation or the protein down-regulation of Bcl-2 and c-Myc. An increased cell death was observed in cultures with RA+Tx than in control cells starting at 96h of treatment without involving GJIC participation. In human breast tumors, the expression of Cx43 and c-Myc at the cell membrane significantly correlated with a more differentiated tumor histology. Our results suggest that the enhancement of GJIC might be facilitated the anti-tumoral effect of RA+Tx on neoplastic epithelial cells and possibly sensitizing them to the more effective action of traditional anti-cancer therapies.

2. INTRODUCCION

A pesar de los esfuerzos para mejorar los tratamientos, la mortalidad por cáncer en países desarrollados se ha mantenido en 250 muertos por 100.000 habitantes en los últimos 25 años. El pronóstico de sobrevida de los pacientes para los cuatro cánceres más frecuentes, colon, pulmón, mama y prostático, (que en conjunto representan más de la mitad de las causas de muerte en países desarrollados), no supera el 5% al ser detectados en etapa avanzada (Kosary y Bethesda, 1995). Esto refleja la necesidad de implementar nuevas estrategias terapéuticas capaces de mejorar los resultados obtenidos por los métodos convencionales, como son quimioterapia, radioterapia y cirugía.

El daño acumulado en numerosos genes reguladores, daría como resultado el desarrollo de cáncer invasivo y metastásico, que es la culminación del proceso crónico de carcinogénesis. La primera etapa de este proceso es el daño irreversible del DNA, el cual puede ser adquirido o hereditario. Luego del daño genético inicial, y por la acción mantenida de promotores de tumor, la célula va adquiriendo nuevas mutaciones, que pueden reprimir la diferenciación terminal de la célula, alterar los procesos relacionados con proliferación y/o muerte celular (Hodhes y Rowlatt, 1994).

En clínica el grado de diferenciación de un tumor, es considerado como un factor pronóstico de la enfermedad. En general, menos grado de diferenciación celular, más agresivo es el cáncer. El proceso de diferenciación celular está determinado por interacciones recíprocas entre los distintos tipos celulares de un tejido, postulándose que alteraciones en estas interacciones recíprocas juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer (Hong y Sporn, 1997). Una interacción anormal entre las células podría producir una des-regulación de la homeostasis tisular produciendo alteraciones en procesos vitales para la célula. Es así como la

mayoría de las células tumorales tienen como característica común, una proliferación descontrolada, pérdida de la inhibición por contacto, falta de diferenciación, su capacidad de adaptarse a estímulos externos está alterada y tienen el proceso de muerte celular anormales (Hodhes y Rowlatt, 1994). En células normales, estos procesos están regulados esencialmente por tres tipos de comunicación, encargados de la mantención de la homeostasis de un organismo multicelular. Hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y otros, median la comunicación extracelular, los cuales gatillan la comunicación intracelular, dada por segundos mensajeros, AMPc, Ca^{++} y otros. A su vez, los factores extracelulares y los segundos mensajeros pueden modular el tercer tipo de comunicación, la intercelular. La comunicación intercelular está dada por una serie de interacciones tales como moléculas de adhesión, uniones intercelulares e interacciones con la matriz extracelular (Trosko y cols., 1998). Un tipo de unión intercelular son las Uniones en Hendidura (UHs), que son especializaciones de la membrana plasmática que comunican el citoplasma de células adyacentes en forma directa. Cada célula aporta la mitad de un canal (hemicanal o conexón) que al unirse con el hemicanal de la célula adyacente forman el canal intercelular. A un conglomerado de canales se le denomina UHs (Bruzzone y cols., 1996). Las UHs permiten el intercambio rápido de substancias de bajo peso molecular (1000 a 1200 Dalton) (Bruzzone y cols., 1996), tales como aminoácidos, iones neutros, AMP cíclico, GMP cíclico, Ca^{++}, IP3, etc., y colorantes de bajo peso molecular, que han sido utilizados como método de análisis funcional de UHs en forma experimental.

Cada hemicanal está formado por seis subunidades de una familia multigenética de proteínas denominadas conexinas (Cxs). En mamíferos se han descubierto alrededor de 15 conexinas las que se expresan en forma específica en tejidos, células y durante el desarrollo

(Bruzzone y cols., 1996). Cada Cx se denomina de acuerdo a su peso molecular deducido a partir de su cDNA, por ej. Cx43, 37, 32, etc.

Las UHs están ampliamente distribuidas en el organismo, a excepción de glóbulos rojos, células de músculo esquelético y espermatozoides. Muchas células expresan mas de un tipo de Cx, por lo que los hemicanales aportados por esta célula pueden estar formados por más de una unidad proteica estructural (conexón heteromérico) o por un solo tipo de Cx (conexón homomérico). Los canales formados por hemicanales heteroméricos pueden tener diferente permeabilidad y por tanto, otras propiedades regulatorias distinta a los homoméricos. Esta propiedad aporta una forma diferente de regulación de las señales que pasan a través de las uniones en hendidura (Sosinsky, 1995).

La expresión de Cxs y por tanto la comunicación por UHs, puede estar regulada a diferentes niveles. En su expresión génica (algunas conexinas tienen mas de una región reguladora en su promotor) o post traduccionalmente, por fosforilación (Cx 43 por ejemplo) o por hormonas (Cxs 43 y 26) (Trosko y Randall, 1998; Bruzzone y cols., 1996). A su vez, la permeabilidad de las UHs está dada por modificaciones en los niveles de Ca^{++} y iones H^{+}. La existencia de diferentes niveles de regulación para las UHs y su amplia distribución en el organismo, hace pensar que puedan estar involucradas en el desarrollo de enfermedades como el cáncer.

La principal función de la comunicación intercelular por UHs es de coordinar señales celulares para la mantención de la homeostasis tisular (Lowenstein, 1981). Se puede pensar que si las UHs participan en la mantención normal de la homeostasis, éstas podrían tener importancia en cáncer, donde los procesos que requieren de una homeostasis altamente regulada, están alterados. De hecho la mayoría de las células tumorales no se comunican entre ellas (o con células

normales) o tienen comunicación disminuida (Yamasaki, 1990). La disfuncionalidad de las UHs aislaría a las células cancerosas de señales que llegan a través de los otros medios de comunicación. Estas señales pueden ser importantes para los procesos de diferenciación, proliferación y muerte celular (Lowenstein, 1979). Es así como se ha demostrado, mediante diferentes estrategias experimentales, una correlación directa entre la disminución de la proliferación celular y el aumento de UHs funcionales. La recuperación de la comunicación intercelular mediante la transfección del cDNA para una Cx en células no comunicadas, produce una disminución de la proliferación celular (Eghbali y cols., 1991; Mehta y cols., 1991). Además, nuevos agentes farmacológicos conocidos por su acción anti-tumoral, tales como retinoides, carotenoides, ciertos flavonoides, dexametasona, y otros, aumentan la comunicación intercelular por UHs y la expresión de Cxs (Mehta y cols., 1989). Por otro lado, oncogenes y algunos factores de crecimiento inhiben la comunicación intercelular por UHs (Ruch, 1994).

La participación de las UHs en diferenciación celular se ha demostrado mediante el uso de anticuerpos dirigidos a la porción extracelular de los canales y mediante la incorporación de secuencias antisentido para las conexinas en embriones, lo cual produjo anormalidades en el desarrollo de éstos (Lee y cols., 1987; Bevilacqua, 1989). Además, en células precursoras o pluripotentes, la inducción de diferenciación celular por retinoides se correlaciona con un aumento en la comunicación intercelular por UHs (Sheardown y Hooper 1992).

La formación de un foco pre-neoplásico podría estar siendo favorecida por la falta de comunicación intercelular entre la célula iniciada y las normales de su alrededor lo que podría estar contribuyendo a una conducta celular autónoma y a la acumulación de daños genéticos en el desarrollo del cáncer.

La etapa del proceso de carcinogénesis en la cual se acumulan daños genéticos, permite plantear nuevas estrategias para controlar la enfermedad. Entre ellas, la quimioprevención ha demostrado recientemente tener un gran potencial para el control de ciertos tipos de cáncer. La quimioprevención es el uso de agentes farmacológicos o naturales, no citotóxicos que intervienen en la cascada carcinogénica para inhibir el progreso del cáncer invasivo, ya sea bloqueando el daño al DNA que inicia el proceso carcinogénico, revirtiendo la progresión de células premalignas (Hong, 1998), induciendo apoptosis o revirtiendo la de-diferenciación celular propia de los tumores epiteliales.

Los retinoides son requeridos para la diferenciación adecuada de células, y su uso como agente quimiopreventivo en lesiones pre-neoplásicas de las vías respiratorias superiores y algunas leucemias ha demostrado ser efectivo en clínica. Por ejemplo, la pérdida del receptor β (RARβ) para el ácido retinoico es característica común de algunos cánceres de pulmón y epitelio oral. Mediante la administración de ácido retinoico 13-cis es posible restaurar la pérdida del receptor, revirtiendo el desarrollo de las lesiones (Sporn y cols., 1994). Por otro lado, se encontró que el ácido retinoico 9-cis (un agonista de los seis RARs) prevenía cáncer mamario en animales (Anzano y cols., 1994). Actualmente se encuentra en fase de estudio el efecto de un precursor del ácido retinoico, 4HPR como agente quimiopreventivo en mujeres de riesgo (Hong y Sporn, 1997).

Un gran número de genes relacionados con la diferenciación y proliferación celular son regulados por retinoides y el mecanismo exacto por el cual actúan en células tumorales se desconoce (Hong y Sporn, 1997). Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio y reportados en la literatura indican una correlación directa entre la acción de retinoides y un aumento en la comunicación intercelular por UHs. Si los retinoides restauran la comunicación

entre células tumorales, las señales para los procesos de proliferación y diferenciación estarían siendo compartidas entre las células, con lo cual el efecto de los retinoides sería más efectivo. Un fenómeno equivalente se observa en terapia génica en donde las células adyacentes a las que contienen el gen terapéutico exógeno, igualmente mueren sólo al estar comunicadas por UHs, efecto conocido como "Bystander" (Mesnil y cols., 1996). Este efecto, mediado por UHs, podría estar facilitando el efecto de agentes quimiopreventivos.

Se han realizado grandes esfuerzos en la búsqueda de agentes quimiopreventivos para el tratamiento de cáncer de mama, uno de los cánceres que produce mayor incidencia de muerte. Es sabido que existe una correlación directa entre el desarrollo de cáncer de mama y los niveles de estrógenos. Las hormonas esteroidales femeninas, estrógenos y progesterona tienen un efecto trófico en los tejidos reproductores femeninos, tales como tejido mamario y las paredes musculares del útero y las malignidades derivadas de estos tejidos. Las investigaciones han demostrado que los metabolitos de estrógeno se pueden unir al DNA e inducir daño. Los mismos compuestos producen cáncer en animales, y recientemente se ha sugerido que mujeres con deficiencia en las enzimas que ayudan a la eliminación de los productos reactivos de estrógeno tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer mamario. Antagonizar el receptor de estrógeno en tejido mamario, sin inhibir su efecto positivo en hueso, cerebro y sistema cardiovascular, ha sido uno de los tratamientos de mayor impacto en clínica. El análogo de estrógeno, Tamoxifeno y sus derivados han mostrado ser de alta eficacia en la supresión de cáncer mamario en animales y en humanos, y estudios recientes han demostrado su efectividad como agente preventivo en mujeres de riesgo (Gottardis y cols., 1989). Aparentemente, los análogos, al unirse al receptor de estrógeno, estarían regulando la transcripción de genes distintos a los del estrógeno. Sin embargo, el hecho de que estos agentes sean efectivos en cánceres de mama estrógeno independientes

(negativos al receptor), revela que los mecanismos moleculares involucrados en su efecto anticancerígeno sean aún desconocidos (Hong y Sporn, 1997).

Las células tumorales, como parte de su des-regulación génica, sobre-expresan o disminuye la expresión de genes reguladores de proliferación, diferenciación y muerte celular. Estos genes se pueden utilizar como marcadores de pronóstico o malignidad tumoral. El oncogen, C-Myc se expresa en alrededor del 30% de los cánceres y su elevada expresión se correlaciona con una proliferación celular descontrolada, con mayor de-diferenciación celular (Wang y Metha, 1995), con una alteración de la muerte celular por apoptosis y con refractariedad a los tratamientos anti-cáncer tradicionales, resultando en un pronóstico clínico negativo. A pesar de la acción anti-proliferativa de dosis quimiopreventivas de Tamoxifeno sobre células de adenocarcinoma mamario, no induce una disminución de los niveles de C-myc, manteniéndolos inalterados en las células de adenocarcinoma mamario humano positivas a receptor de estrógeno, MCF-7 o induciendo un leve aumento de los niveles proteicos del oncogen, en células negativas para receptor de estrógeno, MDA-MB.231.

Por otro lado, se ha reportado que algunos retinoides podrían inducir una disminución de los niveles proteicos de C-Myc (Dang, 1999), dependiendo de las concentraciones utilizadas y del sistema en estudio.

El proto-oncogen, bcl-2 es uno de los genes mayormente implicados en sobrevida celular o en la prevención de procesos apoptóticos. Pertenece a la familia de Bcl2, que está compuesta por proteínas con función agonista o antagonista de apoptosis. Las proteínas pro-apoptóticas incluyen Bax, Bcl-Xs, Bak, Bid, Bik, Bim, etc. en tanto que las anti-apoptóticas son Bcl2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, etc. Con la excepción de Bad y Bid, los otros miembros de la familia poseen secuencias trans-membránicas que facilitarían su localización en la membrana externa de la

mitocondria regulando la liberación de citocromo C, y quizás en otras membranas intracelulares (Sheikh y Fornace, 2000). El desbalance de la relación agonista v/s antagonistas de apoptosis que incline la balanza hacia sobrevida, puede otorgar al tumor mayor resistencia a una variedad de estímulos de muerte, incluyendo drogas quimioterapéuticas, radiación, hipoxia, etc (Strasser y cols., 1997). La habilidad de Bcl2 de bloquear apoptosis inducida por drogas anti-cáncer constituye una nueva forma de resistencia a drogas. Células tumorales que contienen altos niveles de Bcl-2 no interfieren con la entrada o acumulación de droga, simplemente previene que el daño producido por la droga se traduzca en forma eficiente en muerte celular.

Muchas investigaciones han estudiado la co-expresión de *myc* y *bcl-2* en una variedad de tipos celulares y modelos transgénicos, demostrándose en todos ellos una cooperación relacionada con un aumento de la formación e incidencia tumoral (Fanidi y cols., 1992). Encontrar agentes que induzcan una disminución de los niveles de ambos, C-myc y Bcl-2 contribuiría importantemente a la sensibilización de células tumorales a la acción de drogas anti-neoplásicas tradicionales. Se ha demostrado que tanto Tamoxifeno como retinoides inducen una disminución de los niveles proteicos de Bcl-2 dependiendo de la línea celular utilizada.

Los genes relacionados con diferenciación celular son escasos y controversiales, sin embargo, en tumores epiteliales la disminución de la expresión de E-cadherina se asocia con de-diferenciación celular y por ende con un pronóstico clínico desfavorable. E-cadherina es una de las moléculas de adhesión celular implicada en mantener la estructura epitelial mediante la adhesión célula a célula (Aplin y cols., 1998). Estudios han demostrado que parte del efecto diferenciante de los retinoides se asocia a inducción de la expresión de E-cadherina en zona de contacto celular (Terzaghi-Howe y cols., 1997).

Si consideramos que a) las UHs participan en la regulación de los procesos de proliferación y diferenciación celular en condiciones normales, b) que la pérdida de comunicación por UHs en células tumorales se correlaciona con la alteración de los procesos celulares mencionados, y c)que la acción de los agentes quimiopreventivos estaría dirigida a revertir la alteración de estos proceso, nuestra hipótesis sería que la recuperación de la CI por UHs podría facilitar o mediar el efecto de los agentes quimiopreventivos. Si uno de los mecanismos de la acción de los quimiopreventivos es aumentar la CI por UHs, se podría postular que la combinación de agentes farmacológicos destinados a mejorar la CI podría ser un aporte para el beneficio complementario de la terapia anti-cáncer.

Los objetivos generales para probar esta hipótesis son:

1) Investigar el efecto de la combinación de ácido all-trans retinoico más Tamoxifeno, utilizados en dosis quimiopreventivas sobre la CI por UHs en células de adenocarcinoma mamario humano, correlacionando esto con proliferación, diferenciación y muerte celular.
2) Correlacionar los datos obtenidos *in vitro*, con la expresión de Cxs, E-cadherina y C-Myc, en tumores mamarios humanos con diferentes grados de diferenciación.

Los objetivos específicos para la demostración de la hipótesis son:

1) Investigar la comunicación intercelular por UHs, los niveles proteicos de Cxs, E-cadherina, C-Myc y Bcl2, en células de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7 y MDA-MB-231) tratadas con dosis quimiopreventivas de AR más Tx.
2) Correlacionar el efecto de los agentes sobre la CI, con proliferación celular, apoptosis y eventos relacionados con diferenciación celular.

3) Bloquear la CI por UHs y correlacionar la inhibición de UHs con los procesos celulares mencionados en 2).
4) Analizar la expresión de Cxs, E-cadherina y C-Myc, en tumores mamarios humanos con diferentes grados de diferenciación, con el fin de establecer una posible correlación con los estudio *in vitro*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales y reactivos:

De *Sigma Chemical Co*. : Pirofosfato de sodio decahidratado, tripsina, inhibidor de tripsina, ácido ε-amino-n-caproico, tamoxifeno, ácido retinoico all-trans, ácido 18β-gliceriténico, ioduro de propidio, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol de nitrotetrazolium (BCIP/NBT), ribonucleasa A, espermintetrahidrocloruro, ponceau S.

De *Gibco BRL*. : Suero fetal bovino, medio RPMI 1640, tripsina EDTA, albúmina bovina fracción V, acrilamida, N,N'-metilenbisacrilamida, penicilina / estreptomicina.

De *Bio Rad Laboratories*: Buffer tris/glicina/SDS 10x, persulfato de amonio.

De *Molecular Probes*: Amarillo de Lucifer.

De *Boehringer Mannheim Biochemical*: 5-Bromo-2'-deoxi-uridina.

De *Perkin Elmer Life Sciences*: Timidina tritiada [metyl-^{3}H].

De *Merck*: Etanol absoluto, ácido clorhídrico fumante (37%), ácido acético glacial (100%), metanol.

De *Bio 1000 Ltda.*: Metanol técnico, alcohol absoluto(99,5%), acetona.

De *Upstate*: Kit de detección de apoptosis TUNEL.

Líneas celulares:

a) **MDA-MB 231**: Línea celular de adenocarcinoma mamario humano negativa para receptores de estrógeno y con p53 mutado. Posee una morfología fibroblástica y es muy poco diferenciada.
b) **MCF-7**: Línea celular de adenocarcinoma mamario humano positiva para receptores de estrógeno y tiene p53 nativo. Su morfología es epitelial y posee un mayor grado de diferenciación celular que las MDA-MB 231.

Anticuerpos:

De *KPL*: Rabbit IgG Biotin Labeled, Rabbit IgG Peroxidase Labeled, Rabbit IgG Phosphatase Labeled.

De *Oncogene*: Mouse anti-MSH2, Mouse anti-P53.

De *Santa Cruz*: Mouse anti-p21, Mouse anti-p16, Mouse anti-p53, Mouse anti-MDM2, Mouse anti-Bcl_2, Goat-Mouse IgG-PA, Rabbit anti-C-Myc, Rabbit anti-E-cadherina, Rabbit anti-Bax, Rabbit anti-$Bclx_{l/s}$, Rabbit anti-Rb, Rabbit anti-hTRT.

De *Upstate*: Rabbit anti-p27.

De *Zymed*: Rabbit anti-Cx43, Rabbit anti-Cx40, Rabbit anti-Cx26.

3.2. Métodos:

3.2.1. Preparación de drogas:

El ácido retinoico all-trans (AR) y el tamoxifeno (Tx) fueron disueltos en etanol absoluto a una concentración de $1x10^{-2}$M y posteriormente diluidos en medio de cultivo hasta obtener la concentración final requerida. La solución stock de ácido 18-β-gliciretínico fue preparada en DMSO a una concentración 50mM y diluida en medio de cultivo hasta obtener una concentración final de 35μM. Todas las soluciones "stock" fueron mantenidas a –80°C.

3.2.2. Cultivo celular:

Las líneas celulares de adenocarcinoma mamario humanas MCF-7 (positiva a RE) y MDA-MB 231 (negativas a RE) fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con, 10% de suero fetal bovino previamente inactivado por calentamiento a 56°C por 40min. y

con antibióticos (penicilina / estreptomicina) en un incubador humedecido (5% de CO_2) a 37°C. Las células fueron sincronizadas por medio de la deprivación de suero 24h antes de la adición de medio de cultivo completo (40% de confluencia celular aprox.). conteniendo AR, Tx y/o BGA. Tanto el medio de cultivo como las drogas fueron renovadas cada 48h.

3.2.3. Comunicación intercelular por UHs:

a) Microinyección:

La funcionalidad de las uniones en hendidura (UHs) se determiná micro-inyectando bajo microscopio, el colorante amarillo de Lucifer (5% p/v en LiCl 150mM) en una célula (crecida en portaobjeto de vidrio) y evaluando la transferencia de este colorante a células vecinas. El colorante se micro-inyecta a través de microelectrodos de vidrio por una breve sobre-compensación del circuito de capacitancia negativa en el amplificador, hasta que la célula micro-inyectada sea claramente fluorescente. Luego de la inyección, las células se observan durante 1 a 3 minutos en un microscopio equipado con una lámpara de xenón y un filtro que permite una longitud de onda de excitación a 450-490 nm. La fluorescencia emitida por el amarillo de Lucifer se observa en la célula inyectada y/o en las adyacentes si las UHs están funcionales. El porcentaje de acoplamiento se determina sobre la base del número de células micro-inyectadas que transfirieron el colorante a dos o más células adyacentes con respecto al total de células cargadas con colorante.

b) "Scrape Loading":

Las células se crecen en placas de cultivo de acuerdo al protocolo establecido. Se lavan las células 2 veces con PBS y se cubren con amarillo de Lucifer al 1%. Luego se realiza un surco en la placa rompiendo las células. Se espera 1 minuto para permitir la total incorporación del colorante a la célula dañada. Se retira el Amarillo de Lucifer, se esperan 5 minutos para permitir el paso del colorante incorporado por la célula dañada a las células vecinas en caso de estar comunicadas por UHs. Las células se fijan a un portaobjeto con Gelvatol y se observa bajo un microscopio de fluorescencia. La incorporación de colorante a las células adyacentes al surco indica presencia de UHs funcionales. Este ensayo es un poco menos preciso que la microinyección.

3.2.4. Inmunocitoquímica:

Las células se crecen en placas de cultivo celular que contiene en su interior cubreobjetos estériles. Luego de los tratamientos con o sin los agentes en estudio, los cubreobjetos se retiran, se lavan en solución salina y se fijan con etanol al 70 % por 20 minutos a -20^{o}C. Posteriormente, los sitios inespecíficos de unión a anticuerpos se bloquean con una solución de suero normal de cabra al 10%, por 1 hora a temperatura ambiente y luego las células se incuban con el anticuerpo primario por toda la noche a 4^{o}C. Las células se lavan 3 veces por 5 minutos con solución salina y posteriormente, se incuban con el anticuerpo secundario conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 1 hora, a temperatura ambiente. Las células se lavan tres veces por cinco

minutos en solución salina y se montan en Gelvatol airvol 205 más 100 mg/ml de DABCO. Las muestras se observan bajo luz fluorescente (450-490 nm de longitud de excitación) en un microscopio Olympus BX60 y fotografiadas usando un film T-max 400 (Kodak).

3.2.5. "Western Blot":

Los niveles relativos de expresión de proteínas (Conexinas y marcadores celulares) fueron analizados por SDS-PAGE y por inmunoblot. Las células cultivadas en placas fueron lavadas en solución salina (PBS) y colectadas con inhibidores de proteasas (inhibidor de tripsina 200 µg/ml, EDTA 20nM, pH 10) y de fosfatasas (pirofosfato 20 nM, NaF 100 mM, $NaVO_3$ 200 µg/ml, fluoruro fenilmetilsulfonil 3mM), y lisadas por ultrasonido con un sonicador celular ultrasónico (Microson, sistema Heat) por 16 segundos. El contenido total de proteínas en el lisado celular fue determinado por el método de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad). Las muestras conteniendo una concentración total de proteínas de 200 µg fueron separadas en una electroforesis en geles de polacrilamida (SDS-PAGE) al 8, 10 y 12% respectivamente. La cantidad de proteína cargada se determina en cada carril mediante tinción con rojo de Ponceau y posteriormente son electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo de los sitios inespecíficos de unión a anticuerpos con leche al 5% en agua destilada por 1 hora a temperatura ambiente, las membranas se incuban durante toda la noche con el anticuerpo primario especifico. La membrana se lava cuatro veces por 15 minutos con PBS y se incuba luego con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG conjugado a fosfatasa alcalina por 1 hora a temperatura ambiente. Después de 4 lavados por 15 minutos cada uno con PBS, las proteínas se visualizan colorimétricamente

mediante la incubación con los sustratos para la fosfatasa alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y nitroazul tetrazolium (BCIP-NBT). Las imágenes fueron digitalizadas en un scanner: Snap Scan 1212 a una resolución de 200 dpi, grabadas como archivo TIF, y la cuantificación de la intensidad de cada banda en la imagen se determinó con el programa Scion image 1.62c.

3.2.6. Proliferación celular:

a) Incorporación de deoxy-Timidina [metyl-^{3}H]

La proliferación de células controles y tratadas con drogas fue determinada por monitoreo de la síntesis de DNA por medio del ensayo de incorporación de deoxy-Timidina [metyl-^{3}H]. Brevemente, después de 12 horas de incubación (en placas de cultivo de 60mm) con 0,1 µCi de Timidina [metyl-^{3}H], las células fueron lavadas 2 veces con 1 ml de PBS frío, luego lavadas una vez con 1ml ácido tricloroacético al 10%, y nuevamente con 1 ml de PBS. Las placas se incubaron finalmente con 500µl de una solución NaOH 0,4N y SDS 0,1% por 15 minutos a 4 ^{o}C y por último, las células se colectaron para su análisis posterior. De la muestra total (500 µl) se toman 400µl y se transfieren a un vial que contiene 5 ml de líquido de centelleo (Eco lite) y se cuantifica la radiactividad en un espectrómetro de centelleo liquido.

b) Incorporación de Bromo deoxy-Uridina (BrdU)

Para evaluar la proliferación celular en células controles y tratadas, se realizó el ensayo de incorporación de 5-Bromo-2'-deoxy-uridina (BrdU). Esta técnica se basa en la incorporación de la BrdU al DNA que se está replicando, en lugar de d-Timidina. Las células crecidas en cubreobjetos se incuban con 1 µl de BrdU disuelto en 700µl de medio de cultivo (concentración 1,5X) en placas multiwell por 1 hora a 37 ^{o}C. Posteriormente las células se lavan una vez con PBS y fijadas con etanol al 70% a –20 ^{o}C. Las células se incuban con el anticuerpo primario anti-BrdU por 30 min. a 37 ^{o}C. Se lavan los cubreobjetos tres veces por 5 minutos y se incuban las células con el anticuerpo secundario anti-BrdU-FITC acoplado a fluoresceína. Las muestras son observadas y analizadas en el microscopio de fluorescencia. Aquellas células que están proliferando han incorporado la BrdU en su DNA en replicación. Se visualizan por la presencia de núcleos claramente fluorescentes.

3.2.7. Parámetros del ciclo celular por citometría de flujo:

Las células fueron tripsinizadas y lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en 0,5 ml de solución de fluorocromo hipotónico, 50µg/ml de ioduro de propidio en 0,1% de citrato de sodio, y 0,1% de Tritón X-100. La fluorescencia de núcleos individuales (10,000 eventos) fue analizada por citometría de flujo (FACScan Becton Dickinson) usando el "software" LYSIS II (BDIS) para controlar el instrumento y la fecha de adquisición. Las señales de DNA fluorescentes fueron usadas para excluir dobletes y agregados del análisis. El porcentaje de células en las

regiones sub-G_0/G_1, G_0/G_1, S y G_2-M, correspondientes a las diferentes etapas del ciclo celular fueron determinadas usando el "software" Mod FIT.

3.2.8. Muerte celular:

a) Incorporación de ioduro de propidio por exclusión

Las células se crecen en cubreobjetos de vidrio y se incuban con 5µl de ioduro de propidio a una concentración de 4mg/ml disuelto en 700µl de medio de cultivo, por 20 minutos a 37°C. Se lavan las células 1 vez con solución salina y se fijan con paraformaldehido al 3.7% por 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente, se montan en un portaobjeto y se observa al microscopio. Debido a que las células no son permeabilizadas, sólo las muertas van a incorporar el cromóforo el cual se une al DNA dañado intercalándose entre los nucleótidos de éste. Al microscopio estas células van a presentar núcleos claramente teñidos de color rojo.

b) TUNEL

El TUNEL (Terminal desoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) es un método que identifica células apoptóticas *in situ* por medio del uso de la enzima desoxynuecleotidil transferasa terminal (TDT), para transferir d-UTP marcado con biotina

(Biotin-dUTP) al extremo 3'-OH libre del DNA clivado (Gavrieli y cols., 1992). Los sitios de clivaje marcados con biotina son visualizados por una reacción con avidina conjugada a fluoresceina (Avidina-FITC). Las células crecidas en cubreobjetos de vidrio de acuerdo al protocolo establecido, se lavan 1 vez con PBS y se fijan con paraformaldehido al 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas, las células se lavan 3 veces por 5 minutos con solución salina y se permeabilizan por 15 minutos a 37ºC con 30µl de solución de permeabilización que contiene: 0,1% Tritón X-100, 0,1% citrato de sodio, en agua mili-Q. Posteriormente, las células se lavan 3 veces por 2 minutos.

En el caso del control positivo, las células se incuban con 1µg/ml de DNAsa en PBS por 60 minutos a 37ºC y luego se lavan los portaobjetos con PBS 3 veces por 5 minutos. El protocolo que sigue a continuación vale tanto para el control positivo como para las células en estudio. Se mezclan tampón TDT, Biotin-dUTP y TDT, a una razón 90:5:5, y las células se incuban con 30µl de la mezcla por 1 hora a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavan con tampón TB 1X (kit de detección de apoptosis, *Upstate*) por 5 minutos a temperatura ambiente y 4 veces con PBS por 2 minutos. Las células fueron tratadas con tampón de bloqueo (kit de detección de Apoptosis, *Upstate*) a temperatura ambiente por 20 minutos y luego se incuban con 30µl de Avidina-FITC por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavan 3 veces por 5 minutos con PBS, se montan en un portaobjeto y se observan al microscopio. Las células con DNA fragmentado, signo de apoptosis, presentan núcleos claramente fluorescentes.

3.2.9. Inmuno-histoquímica de conexinas y marcadores tumorales en cortes de tumores mamario humanos:

Se realizaron criocortes de 6 micras, de biopsias criopreservadas de tejido mamario tumoral. Posterior a una fijación con acetona fría por 10 minutos, las muestras se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de al menos tres lavados con PBS, los criocortes se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado por 1 hora a temperatura ambiente. El revelado de la inmunotinción se realizó utilizando un complejo avidina-biotina conjugado a peroxidasa, y amino etil carbazol, como sustrato cromógeno. Se realizó una tinción de contraste con hematoxilina y se montaron las muestras con medio de montaje hidrosoluble.

3.2.10. Pacientes

Se analizaron 24 biopsias congeladas de tumores mamarios humanos con diferentes grados de diferenciación tumoral obtenidas del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile. De las 24 biopsias analizadas, 15 son ductales, 2 lobulillares, 1 lobulillar-ductal, 1 túbulo lobulillar, 1 ductal microinvasivo, 1 micropapilar, 1ductal metaplasico, 1 mucinoso y un tubular mixto. En crio-cortes de diferentes tumores se estudió la expresión de E-cadherina, Cx26, Cx40, Cx43 y C-Myc con el fin de determinar una posible correlación entre uno o más de los marcadores y el grado de diferenciación tumoral o metástasis.

Las biopsias se tomaron bajo el previo consentimiento del paciente.

4. RESULTADOS

4.1. Línea celular MCF-7

4.1.a. Comunicación intercelular por uniones en hendidura

La funcionalidad de las Uniones en Hendidura en células de adenocarcinoma mamario humano, MCF7 sometidas a tratamiento con agentes quimiopreventivos se determinó mediante la transferencia de colorante amarillo de Lucifer. Las células capaces de transferir el colorante a dos o más células vecinas en un período de 2 a 3 minutos presentan Uniones en Hendidura (UHs) funcionales, es decir están acopladas entre ellas.

De acuerdo a lo reportado para la mayoría de las células tumorales estudiadas, el nivel basal de comunicación en las células MCF-7 es sólo de un 15+/-5%, el que se mantiene a través del tiempo de cultivo (Fig. 1), indicando que estas células presentan UHs disfuncionales o con un muy bajo nivel de funcionalidad. Estudios previamente realizados en el laboratorio demostraron que, en forma independiente, tanto AR como Tx aumentan la CI por UHs (Fig. 1A y 1B). En ambos casos se observó un aumento en la CI a partir de las 6 horas de tratamiento, alcanzando un máximo entre las 24 y 72 horas en células tratadas con AR, y entre las 6 y 24 horas en células tratadas con Tx. En cada uno de los tratamientos la CI por UHs disminuye a los niveles de las células control, luego de 72 horas de cultivo. Con el propósito de poder obtener una mayor CI estudiamos el efecto de la combinación de AR+Tx sobre la inducción de la CI por UHs en células MCF'7.

Como muestra la Fig. 1C, la combinación AR+Tx aumentó el acoplamiento celular a partir de las 6 horas de cultivo, observándose en este tiempo un efecto sinérgico respecto a los tratamientos en forma independiente. Desde las 24h, alrededor del 50% de las células MCF'7 se mantienen comunicadas, disminuyendo paulatinamente a partir de las 72 horas llegando a un 30% a las 144 horas de tratamiento. El acoplamiento de las células control aumenta levemente a través del tiempo de cultivo de acuerdo a un mayor grado de confluencia celular, llegando a un máximo de 18+/-2% a las 168 horas de cultivo.

Aunque el aumento de la CI inducido por AR+Tx no fue superior al obtenido con los agentes en forma separada, fue más perdurable a través del tiempo de cultivo, lo que permitiría un intercambio de señales entre las células durante un tiempo más prolongado.

Los resultados de CI obtenidos por microinyección y transferencia del colorante amarillo de Lucifer fueron confirmados por medio de la técnica “Scrape loading”, otra metodología para estimar la funcionalidad de las UHs. Un ejemplo de células poco comunicadas, MCF-7 Control y, de comunicadas, MCF-7 tratadas con AR+Tx se muestran en las micrografías de la figura 1D.

De esta manera, sabiendo que efectivamente la **combinación** de drogas anti-neoplásicas logra inducir un aumento perdurable y significativo de la CI por UHs, evaluamos las conexinas que participan en el aumento de la CI. Para esto se estudió la localización sub-celular de las conexinas en células MCF-7 control y tratadas con AR+Tx, mediante inmunocitoquímica con anticuerpos específicos.

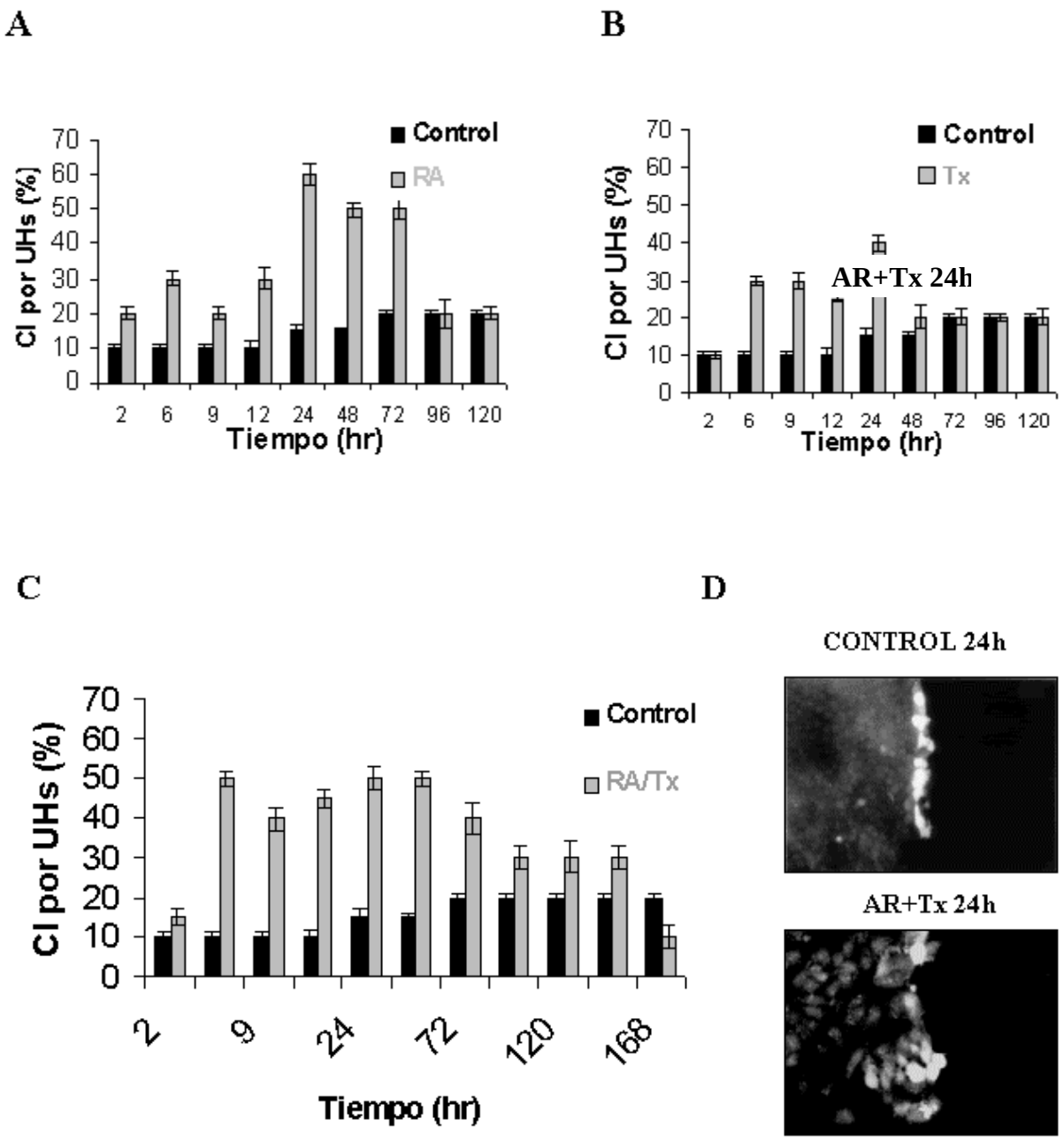


Fig.1. **Efecto de AR y Tx sobre la CI por UHs en células MCF-7.** Células sincronizadas por privación de nutrientes, en aproximadamente 30% de confluencia se trataron con **A**. AR 10^{-6}M o **B**:10^{-6}M de Tx por 120h y **C** con 10^{-6} M AR+Tx por 168h. Los gráficos representan los valores promedio del porcentaje de células que transfirieron el colorante amarillo de Lucifer a dos o mas células vecinas. Barras negras: células control, barras grises: células tratadas. n=15. **D.** Las

micrografías muestran un ejemplo de la determinación de la CI por UHs en células controles y tratadas con AR+Tx a las 24 horas mediante la técnica “scrape loading”.

4.1.b. Inmunodetección de conexinas en células MCF-7

La inmunodetección de Cx en membrana de células en contacto identifica, en general, la o las conexinas que participan en la formación de las UHs. Las células MCF-7, crecidas en condiciones normales, expresan las Cxs 26, 40 y 43.

La Fig.2 muestra las inmunofluorescencias para las tres conexinas mencionadas, en células MCF-7 control y tratadas con la combinación de los agentes quimiopreventivos en estudio.

Concordante con la baja CI por UHs reportada para las células MCF-7 crecidas bajo condiciones normales (controles), la inmunotinción de las células para las Cx 26, 40 y 43, fue débil y difusa. Las proteínas se localizaron predominantemente en el citoplasma celular, sin embargo se pudo inmunovisualizar Cx 26 en la membrana de algunas células, la que podría ser causante de la baja CI que presentan estas células en condiciones normales de crecimiento.. El tratamiento con AR+Tx, induce una redistribución de las tres conexinas desde el citoplasma hacia la membrana de aposición celular, es decir a las zonas de contacto célula-célula (Fig. 2). Este efecto se observa a partir de las 6 horas de tratamiento (datos no mostrados) hasta aproximadamente las 48 horas de cultivo. Se observa la permanencia de las Cxs 26 y 43 en las membranas de contacto celular hasta las horas tardías de incubación, sin embargo la Cx 40, a partir de las 48 horas de cultivo, reduce drásticamente su marca en membrana adquiriendo las células tratadas, una inmunotinción similar a las células control. Estos hallazgos sugieren que el

incremento inicial en la CI por UHs, se debería a las tres conexinas (Cxs 26, 40 y 43). Sin embargo, la permanencia en el tiempo de CI estaría dado esencialmente por las Cxs 26 y 43.

Por otro lado, se observa claramente que en las células tratadas con la combinación de drogas hay una mayor intensidad de marca para las tres conexinas, respecto a las células control (Fig. 2), lo que sugeriría que además de la redistribución subcelular de las conexinas, los agentes quimiopreventivos podrían estar induciendo un aumento de los niveles proteicos de las Cxs 26 y 43. Para poder demostrar esto último se evaluó la expresión de conexinas por un método más cuantitativo que la inmunofluorescencia, el “Western blot”.

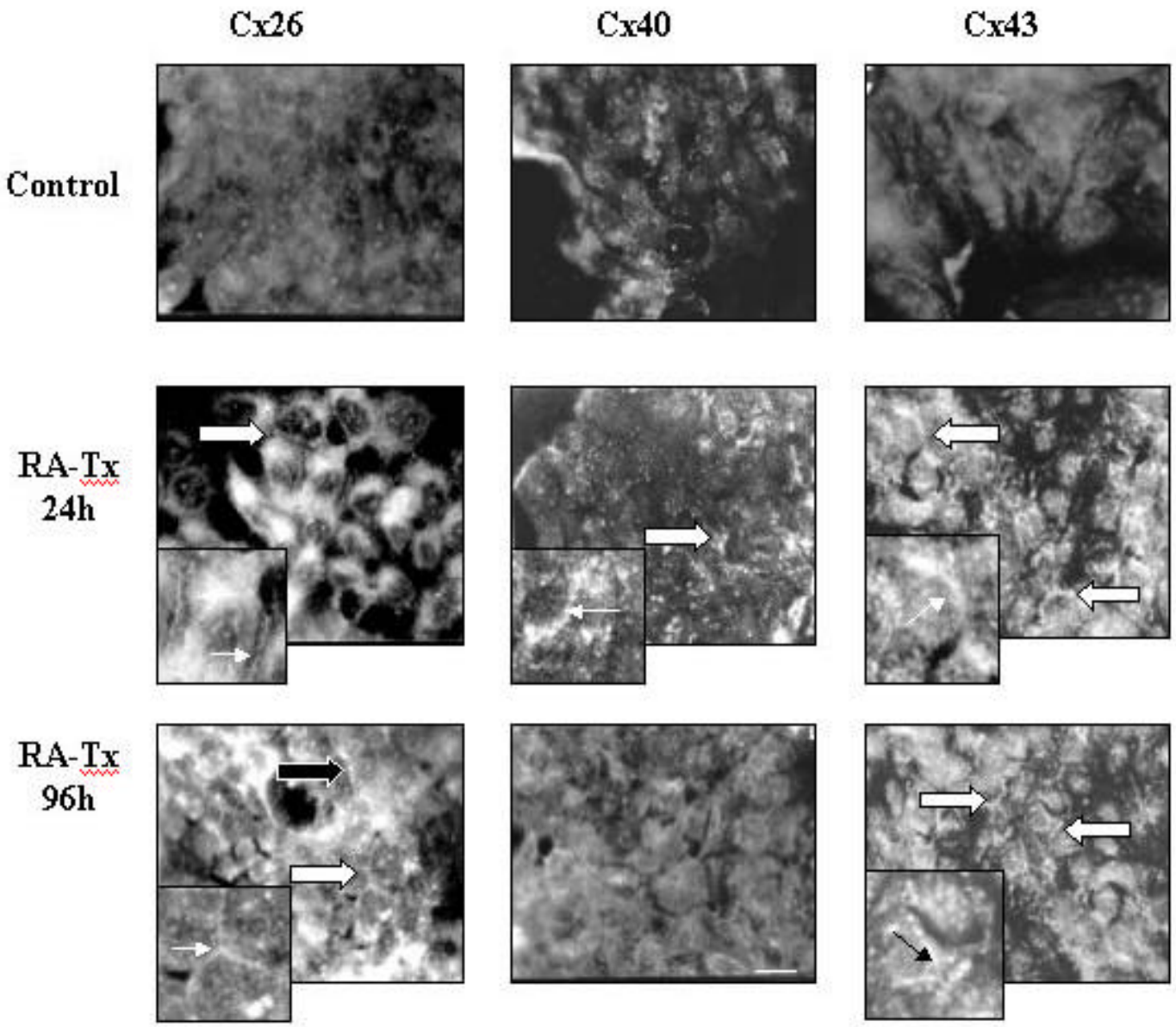


Fig.2. Inmunocitoquímica para Conexinas en células MCF-7. En células control y tratadas con AR+Tx se detectaron las Cxs 26,40 y 43 a 24 y 96h de cultivo. Las flechas muestran la inmunotinción para cada Cx en la membrana de células en contacto. Se muestran magnificaciones fotográficas de las conexinas en membrana. Barra: 6 micras.

4.1.c. Efecto del AR + Tx en la expresión de conexinas en células MCF-7

La inmunocitoquímica reveló que el aumento en la CI por UHs mediado por las drogas AR+Tx involucra una movilización de las Cxs desde el citoplasma hacia la membrana celular. Por otro lado el análisis por "Western blot" nos permite estudiar que, además del efecto anteriormente mencionado, los quimiopreventivos inducen cambios en los niveles proteicos de Cxs, lo que permitiría correlacionar el aumento en las Cxs con la inducción del acoplamiento celular.

Se observa un incremento en los niveles proteicos de Cxs 26 y 43 en células MCF-7 tratadas con AR+Tx, desde las 6 horas de tratamiento. La Fig. 3. - A y C, muestra el aumento de los niveles para ambas Cxs en las células tratadas respecto a las control. A pesar de observarse una disminución de los niveles proteicos para Cxs 26 y 43 posteriores a 24h de tratamiento, éstos se mantienen más altos que los de las células control durante 96h de tratamiento, lo cual es concordante con los resultados obtenidos por inmunohistoquímica. Los niveles proteicos de Cx26 disminuyen a las 120 horas de cultivo comparadas con las células control. Sin embargo los niveles de Cx 43 se mantienen superiores a los de células control a través de todo el tiempo de cultivo.

Los resultados obtenidos por "Western blot" para la Cx40 indican que, a pesar de haber sido inmunovisualizada en la membrana de células MCF-7 tratadas con AR+Tx a las 24-48 horas de cultivo, esto no involucró un cambio significativo en sus niveles proteicos, al contrario, se observa una disminución de sus niveles a partir de las 96 horas de incubación (Fig. 3B), sugiriendo que el tratamiento solamente provoca una redistribución subcelular de la proteína a

tiempos tempranos de cultivo lo que no está dado por cambios importantes en sus niveles proteicos.

Los resultados obtenidos muestran que la combinación de agentes quimiopreventivos, AR+Tx, induce un aumento en la CI por UHs de aproximadamente un 50 +/-3% que perdura por 144h de tratamiento. La combinación de AR+Tx estimula una redistribución de Cxs 26, 40 y 43 desde el citoplasma celular a la membrana de contacto durante las primeras 48h, concomitante con un aumento de los niveles proteicos para Cxs26 y 43, sin cambios en los niveles para Cx40. Resultados obtenidos en el laboratorio, en el cual se estudió la expresión génica de las Cxs en MCF-7 control y tratadas con AR+Tx mostró un aumento de los niveles de mRNA para Cxs26 durante las primeras horas de tratamiento (48h), un aumento paulatino de Cx43 durante 96h de tratamiento y una disminución de los niveles de RNAm para Cx40, lo que sugiere una correlación cercana entre los resultados proteicos y los de RNAm.

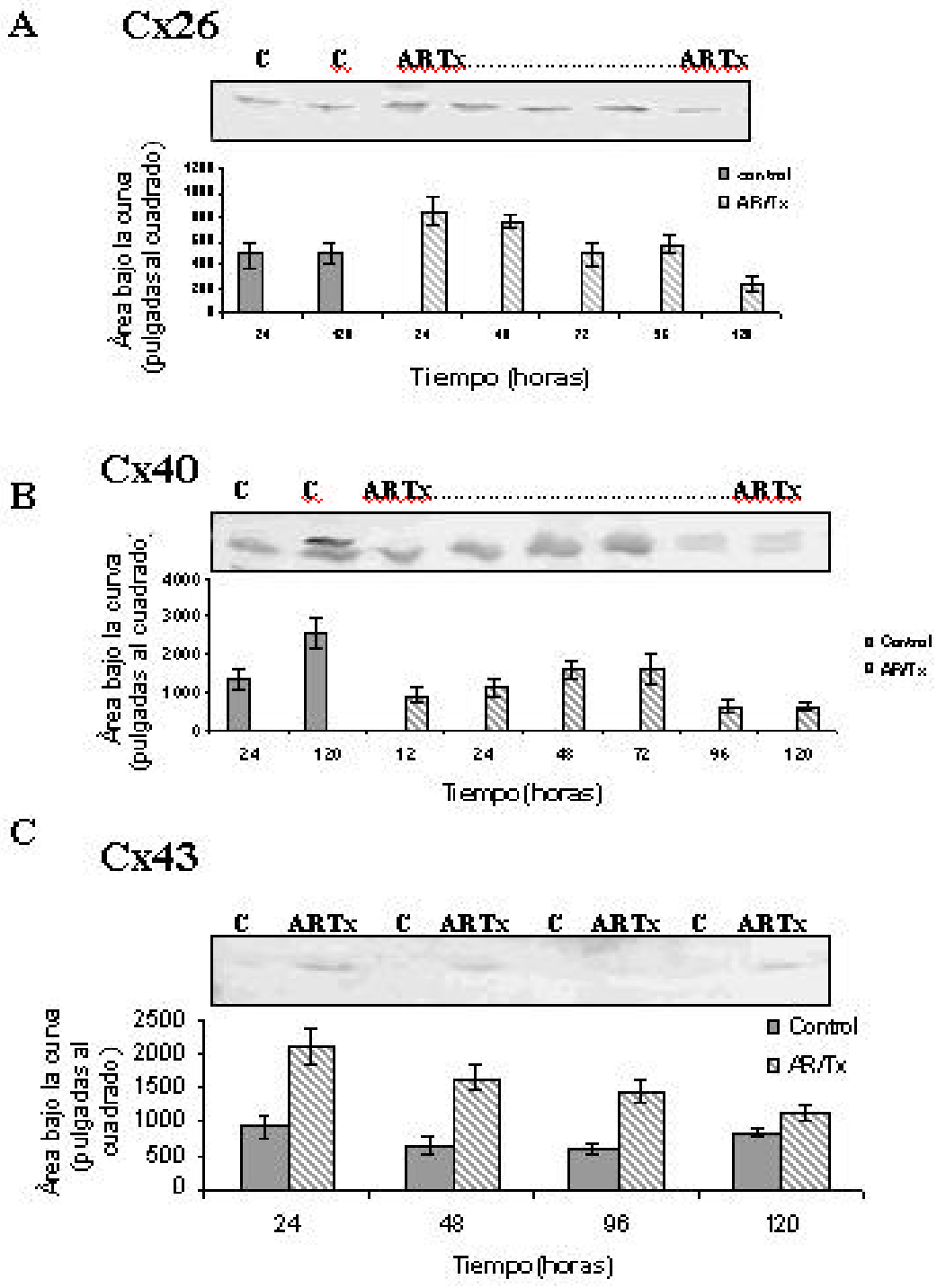


Fig.3. **Inmuno blots para conexinas en células MCF-7**. La evaluación de los niveles proteicos de las Cx26,40 y 43 se determinó mediante análisis western blott. Los gráficos representan el valor relativo de la densidad de cada banda.

4.1.d. Efecto de AR+Tx sobre proliferación celular.

Existen algunos reportes que indican un efecto anti-proliferativo ya sea del ácido retinoico o tamoxifeno en células de cáncer mamario positivas a receptores de estrógeno (Dietze y cols., 2002; Dokmanovic y cols., 2002). Sin embargo, el grado de participación del aumento de CI por UHs en relación a este efecto no ha sido estudiado en cáncer mamario.

El primer ensayo realizado fue la determinación de la incorporación de bromo-deoxy-uridina (BrdU) en células MCF-7 control y tratadas con AR+Tx. La molécula de BrdU actúa como un análogo de timidina y se incorpora en el DNA que se está replicando. El desarrollo de un anticuerpo anti-BrdU permite detectar las células que han estado en fase de síntesis de DNA, las cuales se visualizan en un microscopio de fluorescencia luego de completar la reacción con un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo. La Fig.4 muestra micrografías de células con núcleos proliferantes de células control y de células tratadas con AR+Tx. Se observa una gran proporción de células proliferando en condiciones control durante el tiempo de cultivo sin embargo, en las células tratadas con AR+Tx se observa una disminución de la proliferación celular a partir de las 24 h de tratamiento con resultados óptimos a las 96-120h de tratamiento.

Estos resultados indican que la mezcla de agentes quimiopreventivos induce una disminución de la proliferación celular, lo que se correlaciona con el aumento de la CI por UHs. Nos interesó estudiar además, si este efecto se relacionaba con un aumento del grado de diferenciación celular, lo que puede ser evaluado por cambios fenotípicos de las células tratadas y con la mayor expresión de una molécula de adhesión reconocida como marcador de diferenciación epitelial, E-cadherina.

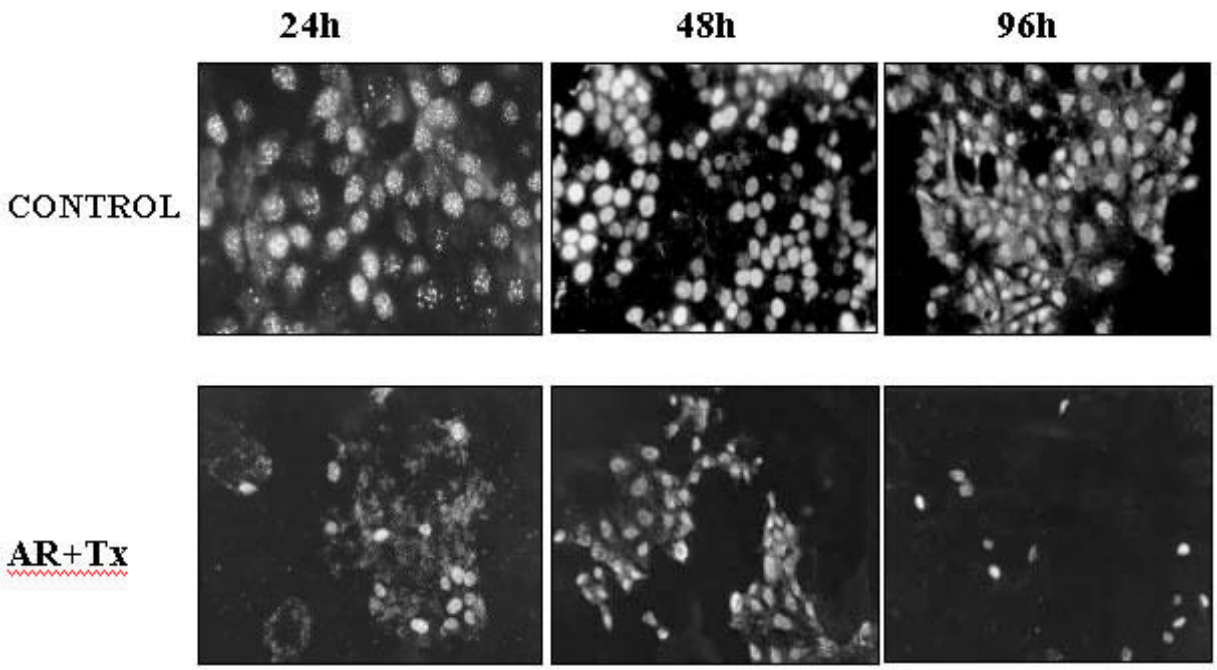


Fig. 4. Incorporación de Br-d-Uridina en células MCF-7. La evaluación de la proliferación de células MCF-7 control y tratadas a 24, 48 y 96 h de cultivo, se determinó mediante incorporación de BrdU.

4.1.e. Evaluación de cambios en el grado de diferenciación celular

Las células MCF-7 cultivadas en condiciones control, crecen adheridas al plato de cultivo tanto en monocapa celular como en forma de cúmulos, típico de células tumorales. A partir de las 24h de tratamiento con AR+Tx se detectan cambios fenotípicos, observándose células más extendidas, con características más epiteliales que las células control y prácticamente no se observa crecimiento superpuesto de células en crecimiento hasta horas tardías del tratamiento.

La molécula de E-cadherina se ha considerado como un marcador de diferenciación por estar disminuida en carcinomas de bajo grado y en células poco diferenciadas (Gamallo y cols., 1993). La re-expresión de E-cadherina se ha correlacionado con un menor grado de tumorigenicidad y con un mayor grado de diferenciación. Determinamos mediante "Western blot" la expresión de E-cadherina en células control y durante el tratamiento con AR+Tx.

La fig.5.A muestra el "Western blot" y la cuantificación de los niveles proteicos de E-cadherina. A pesar de observarse E-cadherina en células control, AR+Tx inducen un aumento de los niveles proteicos de la molécula de adhesión correlacionándose con la inhibición de proliferación y con el aumento de la CI por UHs.

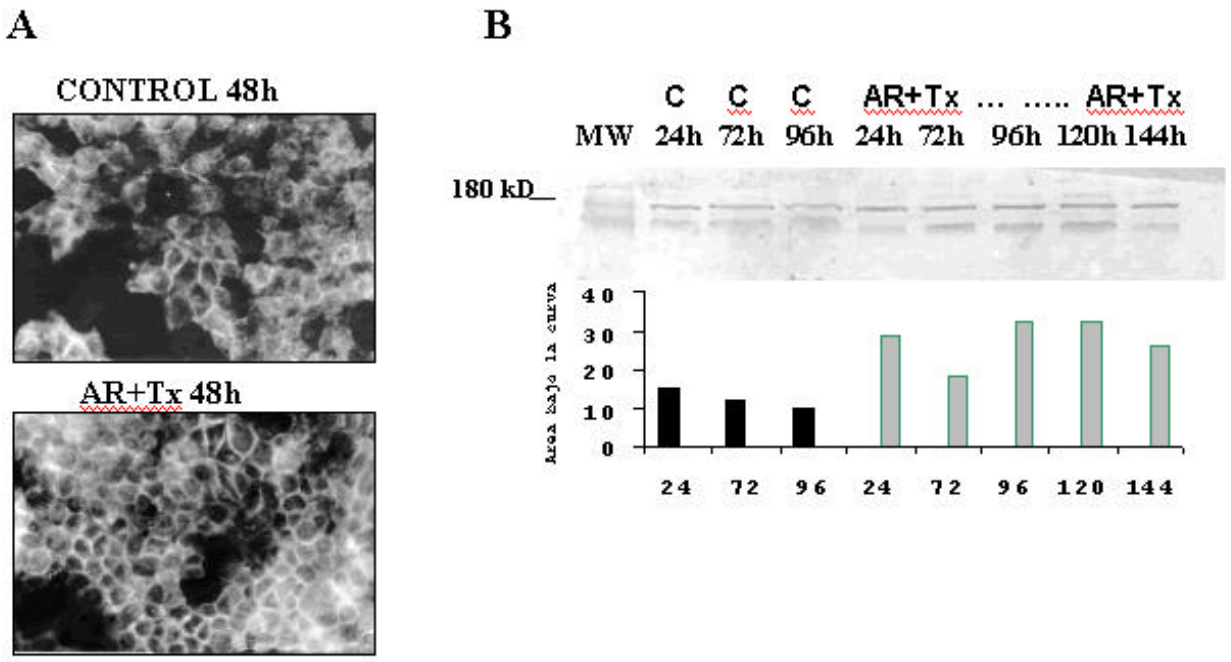


Fig. 5. Evaluación de la expresión de E-cadherina en células MCF-7. A: Inmunofluorescencia para la detección de E-cadherina en células MCF-7 control y tratadas con AR+Tx a 48h de cultivo. **B**: Evaluación de los niveles proteicos de E-cadherina mediante "Western blot" en MCF-7 controles y tratadas a diferentes tiempos de cultivo. El gráfico corresponde a la cuantificación de la intensidad de cada banda. El estudio de la expresión proteica de E-cadherina se realizó por duplicado.

4.1.f. Determinación de Bcl-2 y C-myc.

Para evaluar si los cambios celulares inducidos por los agentes quimiopreventivos involucraban cambios de otros marcadores tumorales, evaluamos los niveles proteicos de c-Myc y de Bcl-2 en células MCF-7 a través del tratamiento.

Se escogieron estos marcadores por ser esenciales para la proliferación y sobrevida celular, por estar aumentados en una gran proporción de tumores y por su posible participación en resistencia a terapia anti-tumoral (Terzaghi-Howe y cols., 1997; Shang y cols., 1998; Reed, 1994).

La Fig. 6. A y B muestra los niveles proteicos para c-Myc y Bcl-2 en células control y tratadas con AR+Tx. Las células MCF-7 control, expresan ambos marcadores y sus niveles proteicos no varían durante el tiempo de cultivo. Sin embargo, los niveles proteicos de ambos marcadores disminuyen drásticamente durante el tratamiento con AR+Tx.

Los resultados hasta aquí obtenidos sugieren que la mezcla de AR+Tx induce una reversión parcial del fenotipo tumoral de las células MCF-7 y que éstos cambios se correlacionan con un aumento de la CI por UHs.

Una forma de determinar la participación real de la CI por UHs en los procesos celulares inducidos por la combinación de agentes quimiopreventivos, es utilizar un bloqueador de la CI tal como, el ácido 18-β-gliceriténico (BGA) cuya función es disgregar los canales de UHs de la membrana intercelular bloqueando el intercambio directo de señales entre células en contacto. El bloqueador, BGA, se utilizó a una concentración de 35 μM, luego de haber estudiado varias dosis para su efecto inhibitorio de la CI por UHs y para la falta de toxicidad celular. Incluso dosis mayores de BGA a las utilizadas, no indujeron citotoxicidad ni cambios en los parámetros en

estudio durante 144h de cultivo. BGA 35µM, inhibió por completo la CI por UHs durante 120 h de tratamiento.

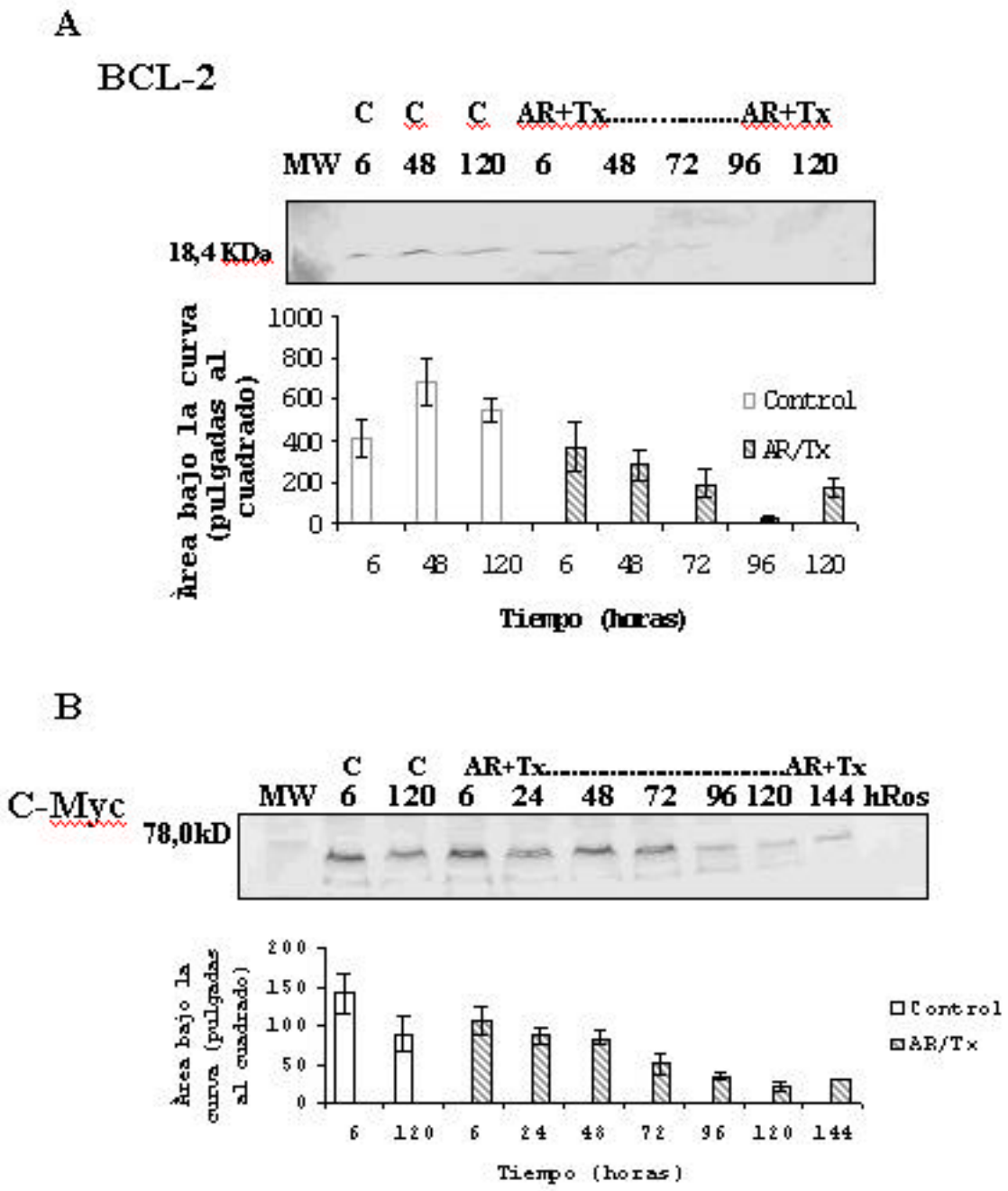


Fig.- 6. Expresión de marcadores tumorales en células MCF-7. Evaluación de los niveles proteicos de Bcl-2 y de c-Myc en células MCF-7 control y tratadas a diferentes tiempos de cultivo. Los gráficos representan la cuantificación de la intensidad de cada banda obtenida por "Western blot" mediante el programa NIH-Scion Image 1.62c.

4.1.g. Determinación de proliferación celular en presencia del inhibidor de la CI por UHs

Se utilizaron dos métodos cuantitativos para determinar proliferación celular en MCF-7 control, tratadas con AR+Tx y tratadas en presencia del inhibidor de la CI por UHs, BGA: incorporación de ^{3}H-timidina y análisis del contenido del DNA celular por citometría de flujo.

La técnica de incorporación de ^{3}H-timidina permite cuantificar las células que se encuentran en fase de síntesis de DNA y de acuerdo con los resultados obtenidos por incorporación de BrdU, se observa una disminución de la proliferación celular a partir de 24 h de tratamiento con AR+Tx con resultados óptimos entre 96 y 120 h de tratamiento (Fig.7 A).

En células MCF-7 tratadas con AR+Tx pero en las cuales se ha bloqueado el aumento de la CI por UHs con BGA, se observa una reversión parcial de la inhibición de la proliferación con resultados óptimos entre 96 y 120 h de tratamiento en donde células tratadas con AR+Tx pero impedidas de comunicarse por UHs, proliferan un 33,4% más que células tratadas y comunicadas entre ellas (Fig.7 A). En otras palabras, resultados obtenidos mediante incorporación de ^{3}H-timidina sugieren que la CI por UHs inducida por AR+Tx es responsable de aproximadamente un 33,4% de la inhibición de la proliferación celular observada a las 96h de cultivo.

Con el objetivo de caracterizar el perfil del ciclo celular de células MCF-7 tratadas con AR+Tx y tratadas con el bloqueador de la CI, se realizaron ensayos de citometría de flujo en células cuyo DNA se ha teñido con Ioduro de propidio (IP). El IP se une al DNA intercalándose entre los nucleótidos, y por lo tanto la cantidad de IP incorporado es directamente proporcional a la masa de DNA en la célula. El histograma que entrega el equipo al analizar el contenido de IP de cada célula agrupa a las células dependiendo del estadío del ciclo celular en el cual se encuentren (contenido de DNA). Confirmándose los resultados obtenidos anteriormente, el

análisis cito-fluorométrico demostró que a las 96-120 horas de tratamiento se produce el mayor nivel de inhibición de la proliferación, reduciéndose el número de células tratadas con AR+Tx en fase S del ciclo celular en un 84% a las 96h, con respecto a las células control (Fig. 7 Ba). El análisis de las células MCF-7 tratadas con los agentes pero en las cuales se ha bloqueado el aumento de la CI por UHs, mostró una mayor cantidad de células en fase S que las tratadas con AR+Tx (Fig.7 Bb). A las 96h de tratamiento, se observa solamente un 50% de reducción de células en fase S, en comparación con un 84% de inhibición observada en células tratadas y comunicadas. Los resultados obtenidos sugieren que aproximadamente entre un 34 y 45% del efecto de inhibición de la proliferación celular inducida por AR+Tx estaría mediado por la CI por UHs.

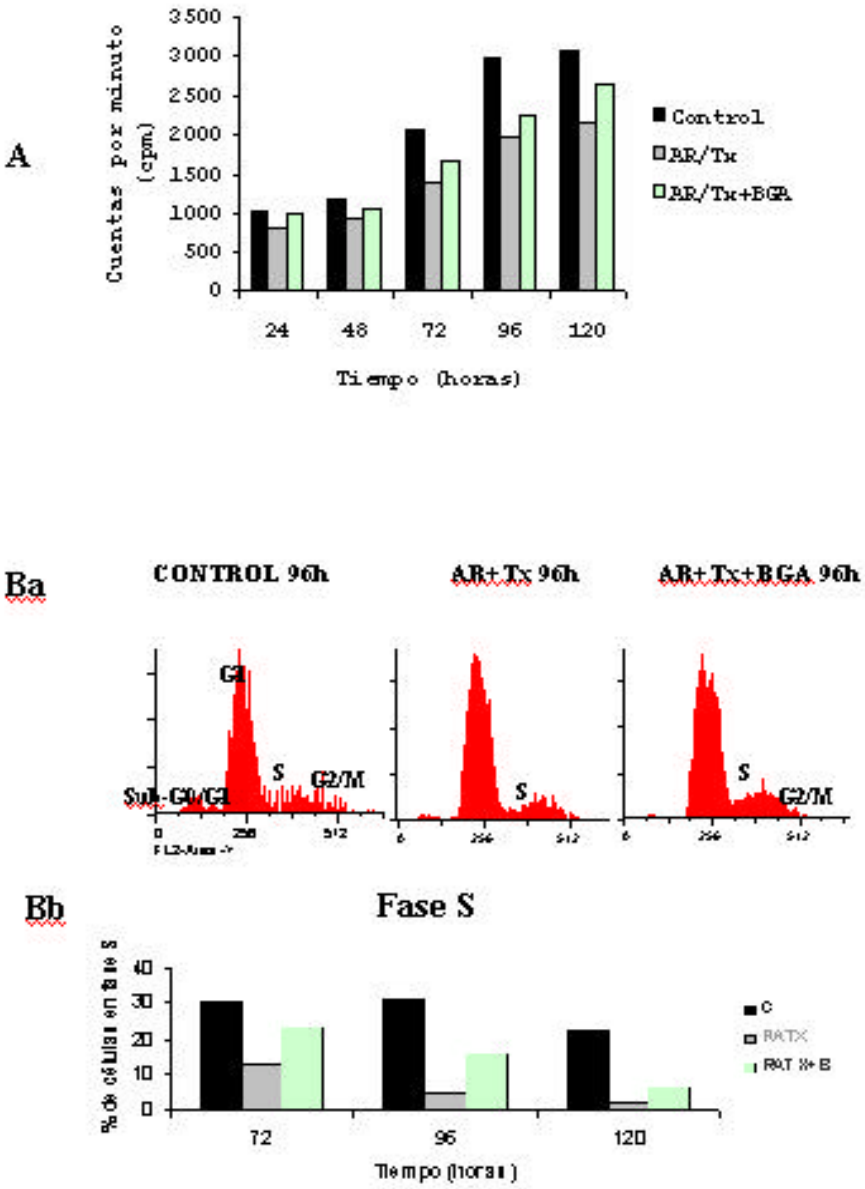


Fig. 7. Determinación de la proliferación celular en células MCF-7. La tabla I muestra los valores promedio de dos experimentos de la incorporación de ^{3}H-timidina en células MCF-7 control y tratadas a diferentes tiempos de cultivo. **A**: gráfico correspondiente a los valores de cuentas por minuto especificados en la Tabla. **Ba**: Un ejemplo de histograma obtenido por citometría de flujo que refleja el perfil del ciclo celular de células MCF-7 control y tratadas a 96h de cultivo. **Bb**: gráfico que representa el porcentaje de células MCF-7 en fase S del ciclo celular bajo las diferentes condiciones de cultivo, a 72, 96 y 120 h de incubación. Estos experimentos se hicieron por duplicado.

La disminución de células MCF-7 tratadas con AR+Tx en fase S ocurre con una acumulación de éstas en los límites del ciclo celular G2/M y en G1/G0. Fig.8 A y B.

El retorno de células tratadas en presencia de BGA a la fase S se realiza en su mayoría, a expensas de las acumuladas en G2/M del ciclo celular. Fig.8 A y B.

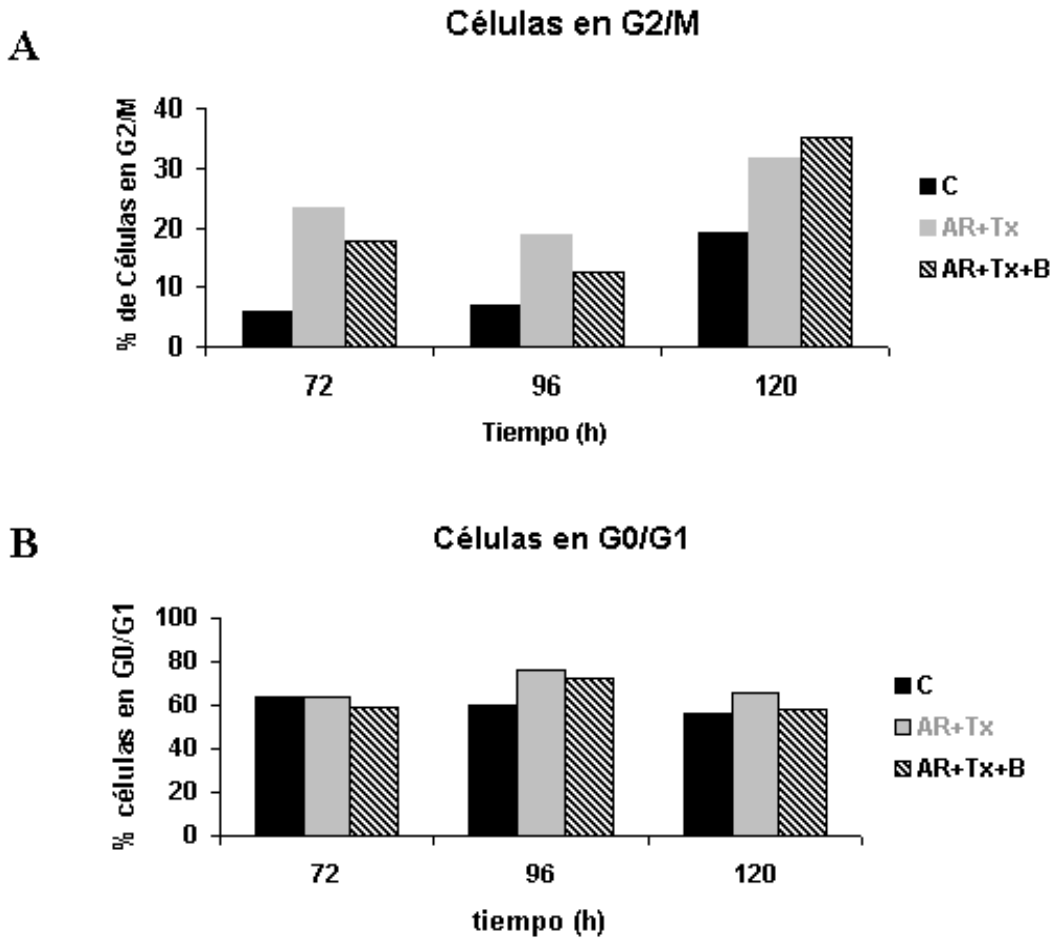


Fig.8. Distribución de células MCF-7 control y tratadas en los diferentes estadíos del ciclo celular. A: Gráfico que representa los porcentajes de células MCF-7 control y tratadas retenidas en el límite G2/M de ciclo celular determinado por citometría de flujo. **B**.- Gráfico representativo del porcentaje de células MCF-7 control y tratadas retenidas en el límite G0/G1 del ciclo celular, a 72, 96 y 120 h de cultivo. Estos experimentos se hicieron por duplicado.

4.1.h. Efecto del tratamiento con AR+Tx sobre muerte celular inducida.

Algunos reportes indican que tanto tamoxifeno como el ácido retinoico all-trans pueden ejercer su acción mediante la inducción de muerte celular por apoptosis (Perry y cols., 1995). En estudios realizados en el laboratorio se observó un bajo grado de apoptosis en células MCF-7 tratadas solo con 10^{-6}M de tamoxifeno, en tanto que 10^{-6}M de ác.retinoico all-trans indujo un retardo de la muerte celular comparado con células control. Observaciones visuales de los cultivos durante los diferentes tratamientos sugerían una importante inhibición de la muerte celular en cultivos tratados con AR+Tx comparados con los cultivos control. En consecuencia, se determinó apoptosis en células control, tratadas con AR+Tx y tratadas en presencia de BGA, mediante tres técnicas independientes: ensayos de exclusión de Ioduro de propidio, análisis del porcentaje de células en la porción Sub-G0/G1 del ciclo celular y mediante la técnica TUNEL.

La Fig.9 A, muestra un gráfico de los porcentajes de células en sub-G0/G1 bajo las diferentes condiciones de cultivo. Se observa que la combinación de agentes quimiopreventivos redujo drásticamente la muerte celular programada lo que se hace evidente desde las 72h de tratamiento en donde se detectan células apoptóticas en los cultivos control y no en células tratadas con AR+Tx.

En cultivo de células MCF-7 tratadas con AR+Tx y además con el inhibidor de la CI por UHs, no se detectó diferencias significativas en el porcentaje de muerte celular comparado con los cultivos tratados solamente con AR+Tx (Fig. 8B y 9 A).

El análisis de células MCF-7 apoptóticas bajo las diferentes condiciones de cultivo se corroboró mediante la técnica de exclusión de ioduro de propidio *in situ*, en el cual se observan los núcleos teñidos de rojo (blancos en la micro fotografía blanco y negro) que corresponden a

células muertas que han permitido la entrada del colorante (Fig.9 B). En la Fig.9B se muestra las células MCF-7 apoptóticas en condiciones control comparada con la casi ausencia de células muertas en las tratadas con AR+Tx y aproximadamente el mismo grado de inhibición de apoptosis en células tratadas en las que se ha bloqueado la CI por UHs.

El ensayo de apoptosis mediante la técnica de TUNEL, que se basa en la transferencia de nucleótidos marcados con un cromóforo, por medio de la enzima nucleotidil transferasa, al extremo 3'del DNA fragmentado característico de células apoptóticas, se realizó solamente a las 96h, corroborando los resultados obtenidos por citometría de flujo (Fig.9 C).

Los resultados obtenidos muestran que la combinación de agentes quimiopreventivos, redujo drásticamente la muerte celular programada a partir de las 72 horas de cultivo, y que la adición del bloqueador de la CI por UHs, BGA, no tuvo un efecto significativo sobre la inhibición de la muerte inducida por las drogas, sugiriendo que, en este modelo experimental, la CI por UHs no está participando activamente en la transmisión de señales de muerte entre células.

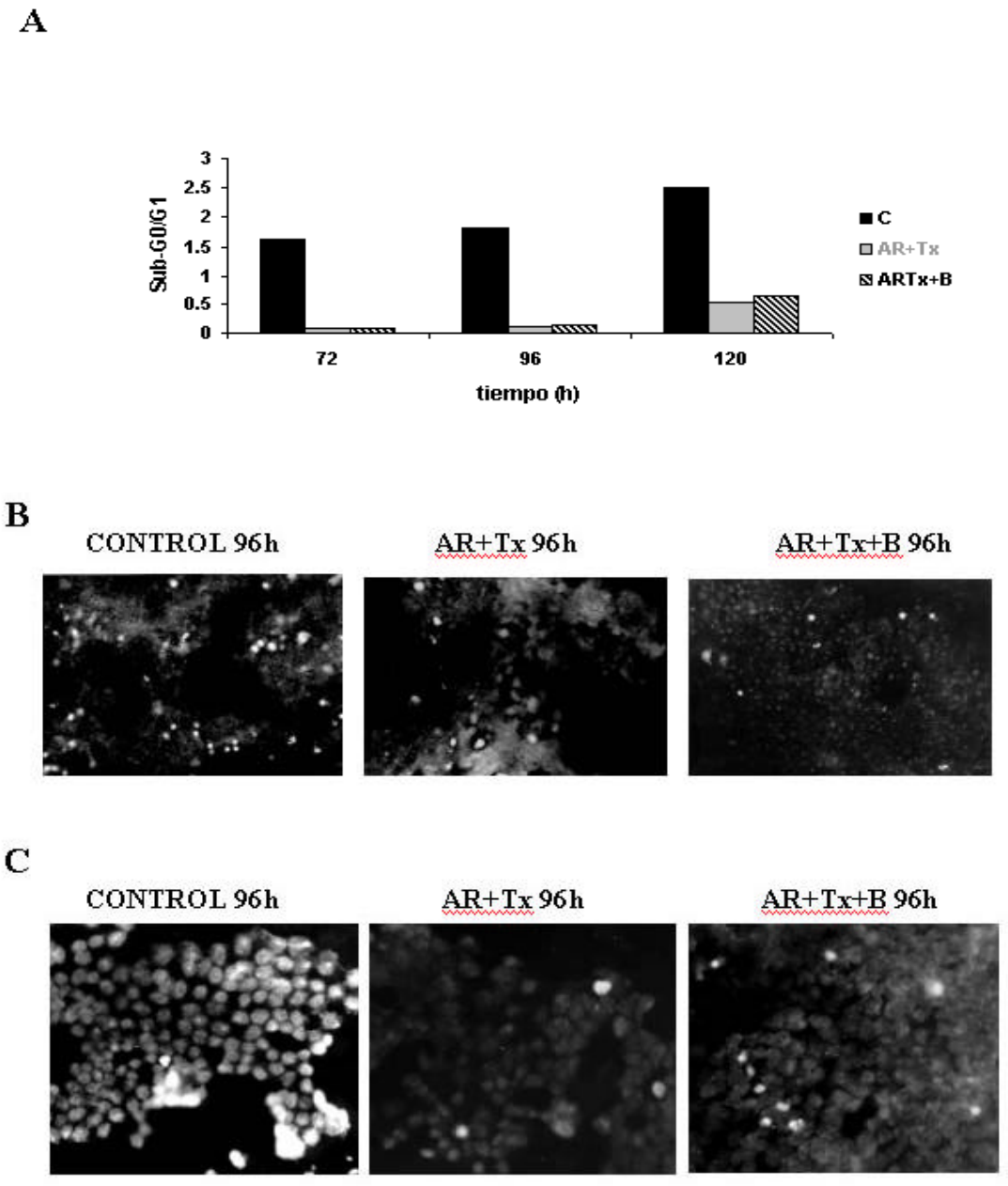


Fig. 9. Muerte celular en células MCF-7. A: Gráfico que representa el porcentaje de células MCF-7 apoptóticas en cultivos control y tratados encontradas en la región sub-G0/G1, determinadas por citometría de flujo. Este análisis se hizo por duplicado. **B**. Micro-fotografías representativas de muerte celular determinada por exclusión de yoduro de propidio en células MCF-7 control y tratadas a 96h de cultivo. **C**.Análisis de fragmentación de DNA por el método de TUNEL en células MCF-7 control y tratadas por 96 h.

4.1.i. Efecto de la inhibición de la CI por UHs en la expresión de E-cadherina y marcadores tumorales.

Los resultados hasta ahora obtenidos indican que la CI por UHs participa en aproximadamente un 34-45% en la inhibición de la proliferación celular inducida por AR+Tx y, que el retardo de la muerte celular inducida por la mezcla de agentes quimiopreventivos en comparación con los cultivos controles, no es afectada por la CI por UHs. Estudiamos a continuación si el bloqueo de la CI por UHs tenía influencia en el aumento de E-cadherina o la disminución de c-Myc y Bcl-2 inducida por AR+Tx.

La Fig.10 A muestra una transferencia de Western para E-cadherina en células MCF-7 control, tratadas con AR+Tx y tratadas en presencia de BGA y el gráfico muestra la cuantificación de la densidad relativa de las bandas para cada punto experimental. Como se mencionó anteriormente, AR+Tx induce un aumento de los niveles proteicos de E-cadherina a partir de las 24h de tratamiento y el bloqueo de la CI por UHs inducida por AR+Tx revierte parcialmente el aumento de los niveles proteicos de E-cadherina con un efecto máximo de un 28-30% entre las 96 y 120h de cultivo (Fig.10). Este resultado sugiere que la CI por UHs estaría mediando el paso de señales relacionadas con diferenciación celular inducidas por AR+Tx.

Nuestros resultados habían demostrado que AR+Tx inducían una disminución de c-Myc, proteína esencial en proliferación celular y de Bcl-2 involucrada en sobrevida celular. Puesto que la CI por UHs participa en el intercambio de señales anti-proliferativas, quisimos estudiar si también participaba en la disminución de estos marcadores de tumorigenicidad.

La Fig.10, muestra los inmuno blots para la detección de Bcl-2 y c-Myc bajo las diferentes condiciones de cultivo. Se observa una disminución de ambas proteínas por efecto de

AR+Tx, a partir de las 24h de tratamiento con un efecto máximo a las 96h de cultivo. Células MCF-7 cultivadas con AR+Tx en presencia de BGA, con el aumento de CI bloqueado, muestran una disminución de los niveles de c-Myc y Bcl-2 similar a los obtenidos en células tratadas y comunicadas. Estos resultados sugieren que los mecanismos utilizados por la CI por UHs para mediar los efectos anti-proliferativos y diferenciantes inducidos por AR+Tx son diferentes o no relacionados a los utilizados por Bcl-2 y c-Myc en su efecto celular.

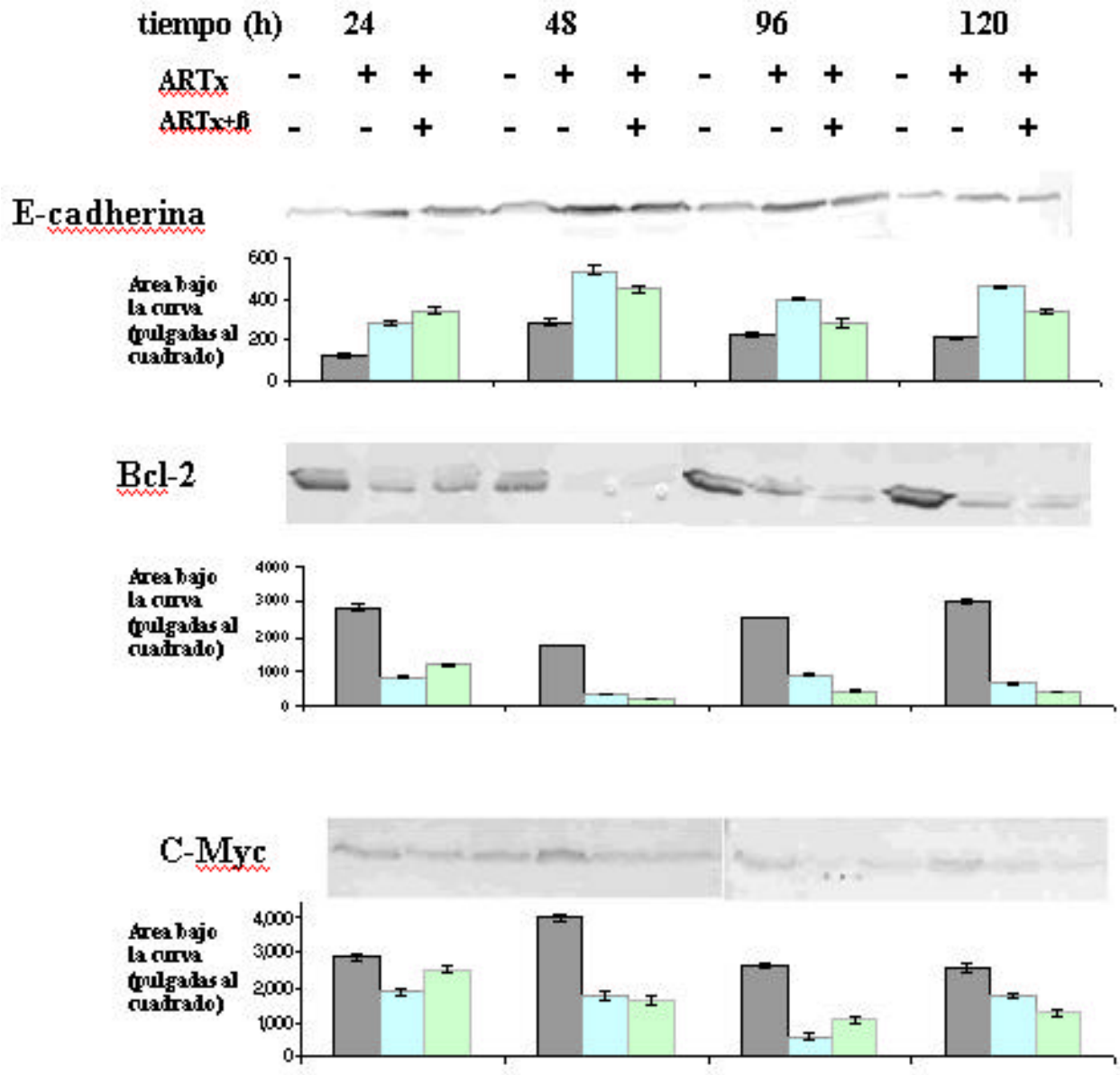


Fig. 10. Expresión de marcadores tumorales en células MCF-7. Determinación de los niveles proteicos de E-cadherina, Bcl-2 y c-Myc, por Western blot, en células MCF-7 control, tratadas con AR+Tx y en presencia del inhibidor de la CI por UHs a diferentes tiempos de cultivo. Los gráficos representan la cuantificación de la intensidad de cada banda inmunoreactiva mediante el programa NIH Scion Image 1.62c.

4.2. Línea celular MDA-MB-231

4.2.a. Comunicación Intercelular por Uniones en Hendidura

Las células de adenocarcinoma mamario humano, MDA-MB-231, presentan características particulares que las diferencian de la línea celular anteriormente estudiada, como por ejemplo, carecen de receptores de estrógeno, tienen un P53 mutado, no poseen marcadores epiteliales tales como, citokeratinas o E-cadherina y tienen un fenotipo poco diferenciado con características fibroblásticas. A pesar de haberse obtenido de un adenocarcinoma mamario, por las características mencionadas, muchos autores las consideran de origen mesenquimático y no epiteliales.

Basándose en los resultados experimentales obtenidos con el tratamiento combinado de agentes quimiopreventivos sobre la línea celular MCF-7, nos interesó estudiar el efecto de la combinación de AR+Tx sobre las células MDA-MB.231 dadas sus características no epiteliales.

La comunicación intercelular de las células MDA-MB231, cultivadas en condiciones normales es de un 45+/-5% (Fig. 10), el cual aumenta con la confluencia celular a partir de las 96 horas alcanzando un 70+/-2% de acoplamiento. El tratamiento con AR+Tx induce un aumento de la CI por UHs en un 25 +/-5% por sobre el valor basal a partir de las 6 horas de incubación hasta las 48 horas. Es decir, durante las primeras 48h de tratamiento un 70+/-2% de células MDA-MB231 estuvieron comunicadas por UH. Desde las 72h hasta las 120h de tratamiento, la CI por UH en las células tratadas con AR+Tx disminuye a un 40+/-1%, bajo el nivel de acoplamiento intercelular de las células control a tiempos equivalentes de cultivo. En la Fig. 11 se muestra el gráfico correspondiente a la medición de CI por UHs mediante la técnica de microinyección del colorante amarillo de Lucifer. Las fotografías representan un ejemplo de medición de CI por UHs

por “Scrape loading” correspondientes a células control y tratadas con AR+Tx a las 24h de cultivo.

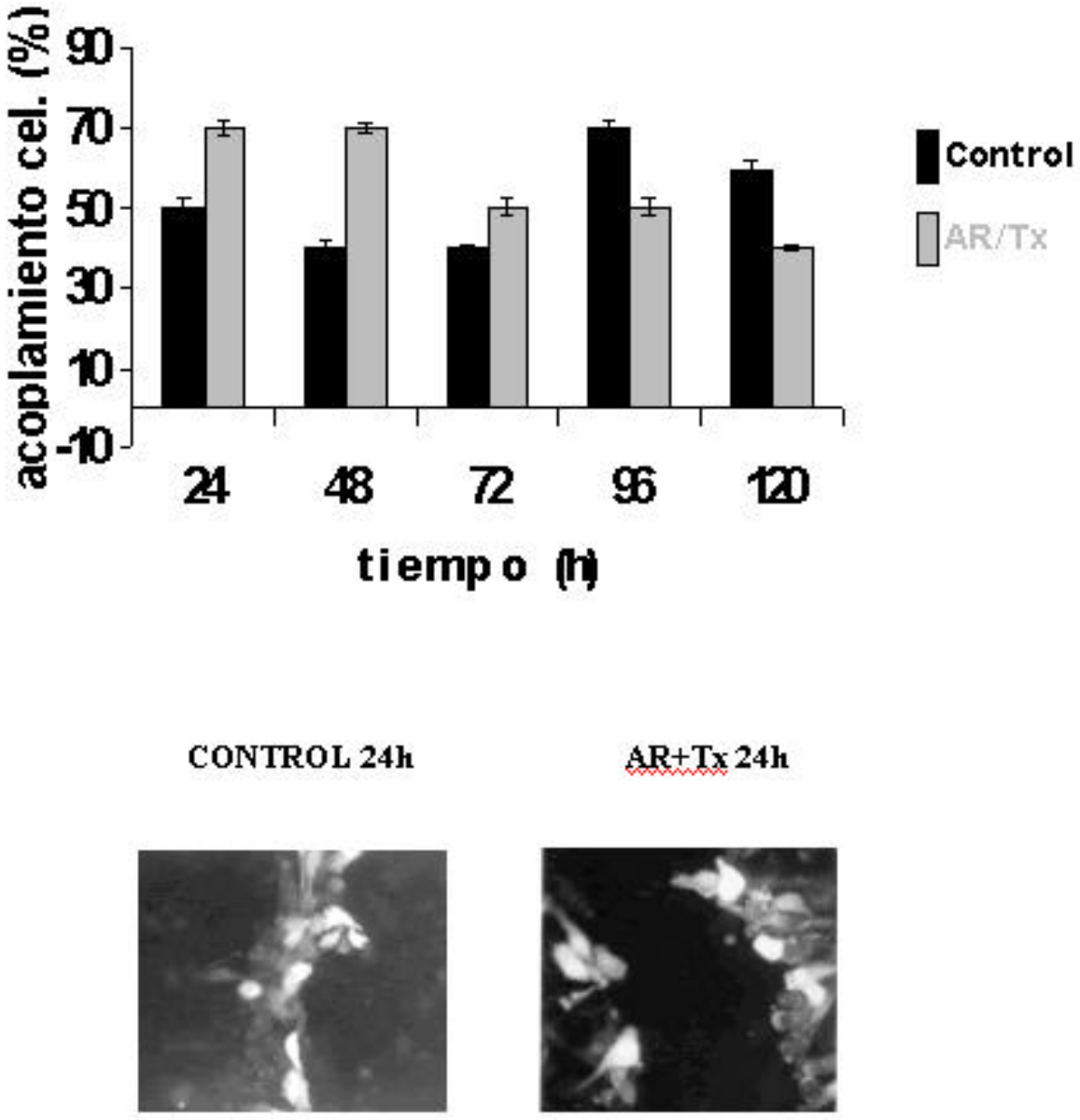


Fig. 11. CI por UHs en células MDA-MB-231 controles y tratadas. Efecto del tratamiento con 10^{-6}M de AR+Tx en células MDA-MB.231 a diferentes tiempos de incubación. El gráfico representa el valor promedio del porcentaje de células micro-inyectadas que transfirieron el colorante amarillo de Lucifer a dos o mas cé lulas en adyacentes. Barras negras: MDA-MB.231 control: barras grises: MDA-MB.231 tratadas con AR+Tx. n=15.

4.2.b. Niveles proteicos de Cxs en células MDA-MB231 tratadas con ácido retinoico +tamoxifeno.

Se evaluaron los niveles proteicos de Cxs con el objetivo de determinar cuáles son las que inducían las variaciones de la CI por UH tanto en células control como en las tratadas con AR+Tx.

El estudio por Western blott mostró que Cx43 aumenta gradualmente con el tratamiento observándose un mayor nivel proteico que las células control hasta las 96h de cultivo. Las células MDA-MB231 expresan Cx 26 en condiciones basales observándose un aumento hasta las 72h de cultivo. El tratamiento con AR+Tx induce una disminución de los niveles proteicos de Cx 26 a partir de las 48h de tratamiento a niveles prácticamente indetectables a las 96 h de incubación.

Los resultados de Western blot para Cx40 en células MDA-MB 231 cultivadas en condiciones normales muestran un aumento discreto de ésta proteína a través de 72h de cultivo. Los niveles proteicos para Cx40 en células tratadas con AR+Tx muestran un aumento por sobre el nivel de células control solamente a las 24h de tratamiento, disminuyendo progresivamente durante el tratamiento.

Los resultados sugieren que, en MDA-MB.231 control, las tres Cxs estudiadas serían responsables de la CI por UHs observada a tiempos tempranos, en tanto que principalmente la Cx26 y Cx40 participarían en la CI observada a tiempos tardíos de cultivo.

En los cultivos tratados con AR+Tx, principalmente, la inducción de mayores niveles de Cx43 explicaría el aumento de la CI por UHs a tiempos tempranos, participando además la Cx40 en menor grado. Con los resultados obtenidos, sin embargo, no es posible descartar la participación de Cx26 y Cx40 en la formación de canales de UHs.

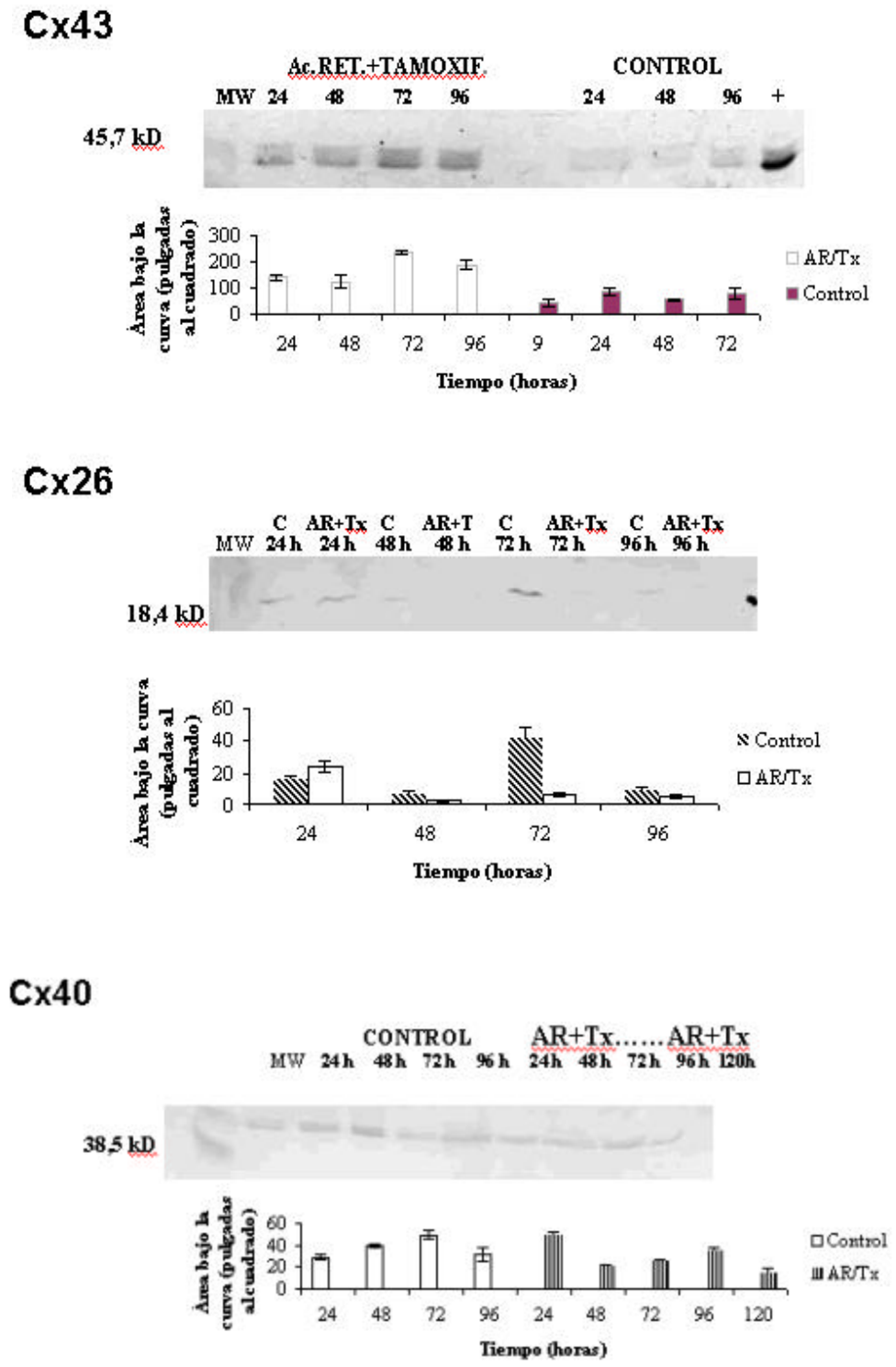


Fig. 12. Niveles proteicos para Cxs 26, 40 y 43 en células MDA-MB 231 determinados mediante Western blot. Los gráficos representan el valor densitométrico correspondiente a la intensidad de cada banda, cuantificado con el programa NIH Scion Image 1.62c.

4.2.c. Proliferación celular en células MDA-MB-231 tratadas con AR+Tx.

En el ensayo de proliferación celular evaluado mediante la incorporación de BrdU, no se observaron diferencias significativas entre las células control y las tratadas, a partir de las 24 horas y hasta las 96 horas de cultivo (Fig. 13 **A**). Estos resultados se corroboraron al realizar el estudio adicionando el inhibidor de la CI por UH (BGA). La Fig. 13 **B** muestra los resultados obtenidos de un ensayo de incorporación de ^{3}H-timidina en células control, tratadas con AR+Tx y tratadas con el inhibidor. Se observa una incorporación similar del nucleótido marcado tanto en células control como con los diferentes tratamientos. Los resultados obtenidos por citometría de flujo no muestran diferencias significativas en el porcentaje de células en cada estadío del ciclo celular, a excepción de las células cultivadas a las 120 h en donde hay una marcada reducción de MDA-MB 231 tratadas en la fase G1 del ciclo celular concomitante con un aumento en células en sub-G0/G1(datos no mostrados).

El tratamiento de las células con quimiopreventivos en asociación con el bloqueador de canales de conexinas (BGA) no mostró efecto hasta las 96 horas de cultivo. A tiempos más tardíos (120h) aumenta el número de células en fase S en presencia de las drogas, y de los agentes más el inhibidor (Fig.13 **B**).

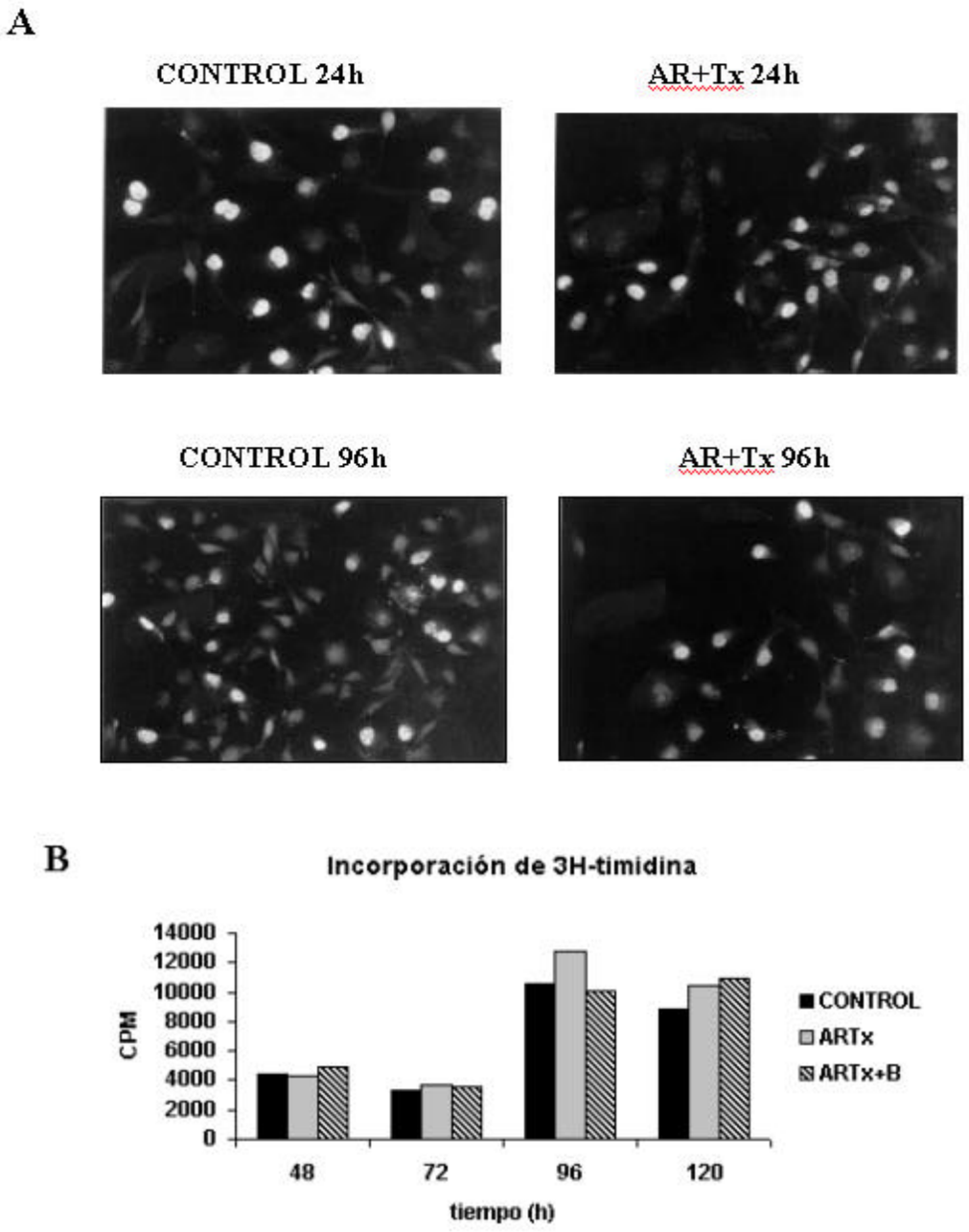


Fig.13. Proliferación celular en células MDA-MB-231. A: Microfotografías de células MDA-MB 231 control y tratadas con AR+Tx que han incorporado Br-deoxy-Uridina a las 24 y 96 h de cultivo. **B:** gráfico de los resultados de incorporación de ^{3}H-timidina en células control, tratadas y tratadas en presencia del bloqueador de CI por UH.Este experimento se realizo en duplicado.

Tabla I.-CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO CON YODURO DE PROPIDIO

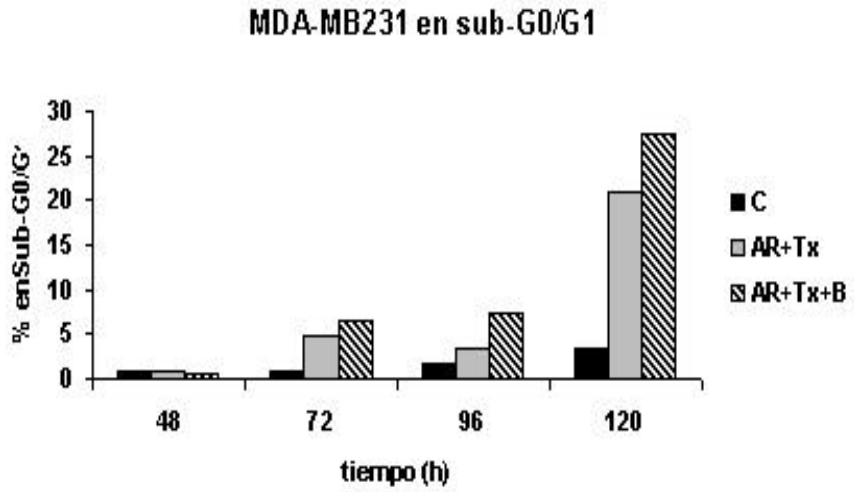
CONDICIÓN		FASE S	G0/G1	G2-M	Sub-G0/G1
CONTROL	48 h	34,1 %	55,3 %	10,67 %	0,68 %
AR+Tx	48 h	38,7 %	52,0 %	9,3 %	0,69 %
AR+Tx+ ß-Gly	48 h	38, 6 %	49,8 %	11,6 %	0,62 %
CONTROL	72 h	39, 4 %	51,7 %	8,82 %	0,95 %
AR+Tx	72 h	38, 7 %	45,7 %	16, 1 %	4, 91 %
AR+Tx+ ß-Gly	72 h	39,9 %	48,3 %	4,6 %	6,63 %
CONTROL	96 h	23,0 %	70,2 %	6,8 %	1,75 %
AR+Tx	96 h	25, 6 %	67,2 %	7,25 %	3,5 %
AR+Tx+ ß-Gly	96 h	30,3 %	64,3 %	5,4 %	7,4 %
CONTROL	120 h	35,3 %	50,7 %	14,0 %	3,32 %
AR+Tx	120 h	69,3 %	20,5 %	10,2 %	21,20 %
AR+Tx+ ß-Gly	120 h	83,5 %	11,5 %	4,9 %	27,60 %

4.2.d. Muerte celular en células MDA tratadas con AR+Tx.

A diferencia de los resultados obtenidos en células MCF-7, el tratamiento con AR+Tx, indujo un aumento en la muerte celular en las células MDA a partir de las 72 horas de cultivo, sin embargo este incremento se hizo significativo a las 120 horas de tratamiento en donde el porcentaje de células en sub-Go/G1 del ciclo celular aumenta en aproximadamente un 20% por sobre las células control (Fig.13 Ca y Fig.14 A). Al incubar las células en presencia de AR+Tx más el inhibidor de la CI por UH (BGA) se produce un aumento no significativo en la muerte celular respecto a las células tratadas solamente con la combinación AR/Tx (Fig.13 Ca y Fig.14 A). Estos resultados fueron confirmados por medio del ensayo TUNEL (Fig. 14B).

Los resultados obtenidos indican que el efecto pro-apoptótico inducido por los agentes quimiopreventivos (AR+Tx) no involucra el paso de señales a través de las UHs, sino mecanismos independientes de la CI que quedan por ser investigados.

A



B

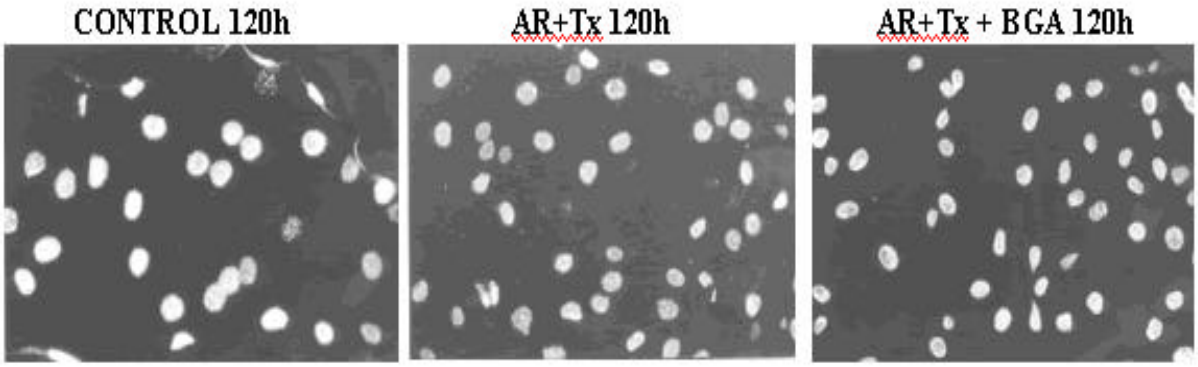


Fig. 14. Estudio de muerte celular en MDA-MB 231 control, tratadas con 10^{-6}M AR+Tx y tratadas con el inhibidor de la CI por UHs. A: Gráfico representativo del porcentaje de células MDA-MB 231 en diferentes condiciones tiempos de cultivo con contenido de DNA sub-G0/G1, determinado por citometría de flujo. B: Fotografías de fluorescencia de células MDA-MB 231 para la detección de DNA fragmentado mediante la técnica de TUNEL.

4.2.e. Expresión de marcadores tumorales en las células MDA-MB-231.

Debido a la mayor muerte celular observada en las células MDA-MB 231 por el tratamiento con la combinación de drogas quimiopreventivas comparado con las control, y por no observarse variaciones en la proliferación celular, nos interesó estudiar los niveles proteicos de los marcadores tumorales, Bcl-2 y c-Myc en los diferentes tratamientos durante el período de cultivo.

La Fig.15 A muestra los niveles proteicos para Bcl-2 en donde se observa una disminución significativa solamente a las 24h de tratamiento con AR+Tx. Durante los tiempos posteriores de tratamiento no se observan variaciones significativas con respecto a los niveles de Bcl-2 de las células control. La inhibición de la CI por UHs con BGA, solamente tuvo un efecto preventivo de la disminución de Bcl-2 a las 24h de tratamiento (Fig. 15 A). Desde las 72h de tratamiento en adelante no se observan cambios significativos ni de disminución de los niveles de Bcl-2, ni de la inhibición de la CI sobre los niveles proteicos de Bcl-2 (Fig. 15 A).

El oncogen c-Myc participa no solo en proliferación celular sino que también en apoptosis, por lo que nos interesó estudiar sus niveles proteicos en células MDA-MB 231 sometidas a los diferentes tratamientos. Los niveles proteicos de c-Myc aumentan levemente en las células MDA-MB 231 control, a excepción de las 96h en donde se produce una disminución probablemente debido al inicio de muerte celular por sobre-crecimiento (Fig.15 B). A partir de las 24h de tratamiento con AR+Tx se observa una disminución de los niveles proteicos de c-Myc comparado con las células control obteniéndose la mayor disminución a las 72 de tratamiento (Fig.15 B). No se observó variaciones de los niveles de c-Myc en cultivos en donde la CI por UH se bloqueó con BGA (Fig.15 B), sugiriendo mecanismos independientes para el efecto sobre muerte celular inducido por AR+Tx.

Debido a que la disminución de los niveles proteicos de Bcl-2 y de c-Myc se podrían asociar con la mayor muerte celular observada con el tratamiento de AR+Tx, investigamos si estas observaciones se asociaban además a un aumento de los niveles proteicos de Bax, una de las proteínas pro-apoptóticas. La Fig. 15 C muestra los niveles de Bax en células control y tratadas con AR+Tx. No se observan variaciones significativas en sus niveles a través del tratamiento, sugiriendo la participación de otras proteínas en el fenómeno de muerte celular.

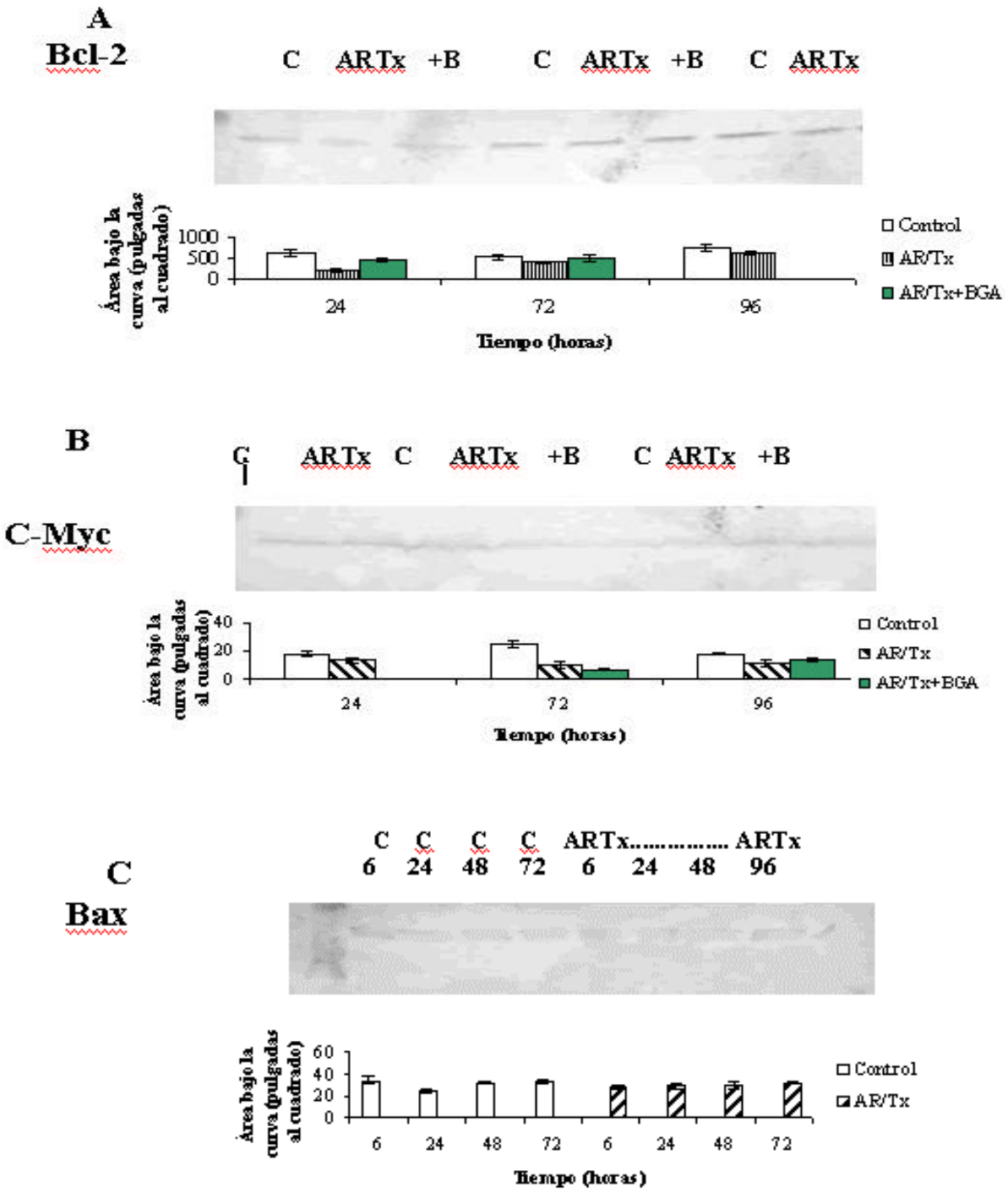


Fig. 15. Niveles proteicos de marcadores tumorales determinados por "Western blot" en células MDA-MB231 control y tratadas. Los gráficos representan el valor de la densidad relativa de cada banda del inmuno-blot, cuantificado mediante el programa NIH Scion Image 1.62c.

Los resultados obtenidos en la línea celular MDA-MB 231 sugieren que la combinación de AR+Tx induce un aumento de la CI por UH durante las primeras 48h de tratamiento que no se correlaciona con proliferación celular pero que podría facilitar la disminución de los niveles proteicos de Bcl-2. Sin embargo, el efecto de AR+Tx sobre muerte celular no involucra la participación de la CI por UH.

4.3. Inmunohistoquímica en biopsias de tumores mamarios humanos.

Uno de los objetivos del trabajo fue estudiar una posible correlación entre la participación de la CI por UHs en la restauración del potencial de diferenciación celular *in vitro* y la inmuno-detección de Cxs en tumores mamarios de diferentes grados de diferenciación. Para llevar a cabo este objetivo se analizaron 24 biopsias de tumores mamarios con diferentes grados de diferenciación histológica y con diferente potencial metastásico.

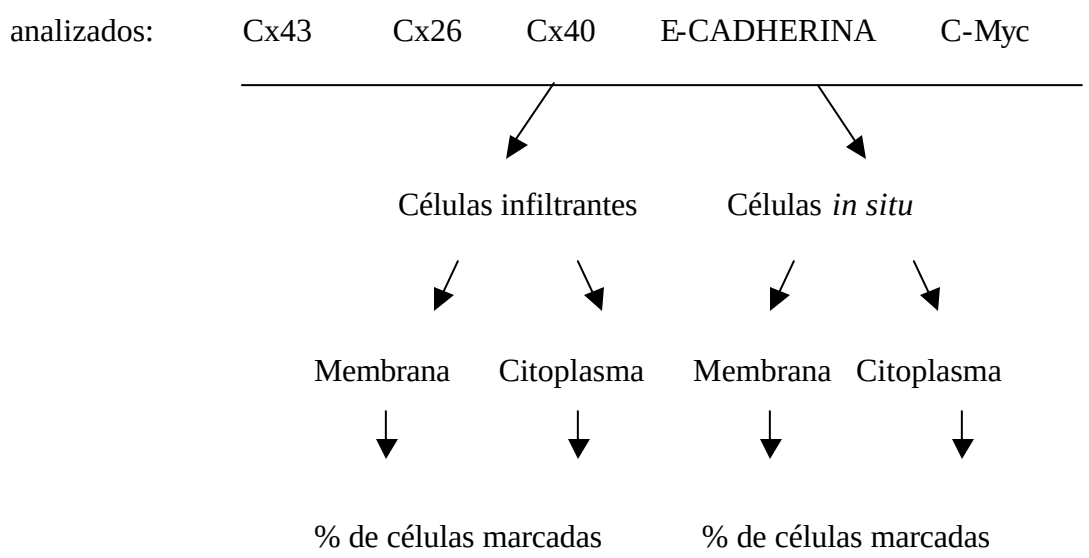
Las biopsias se obtuvieron y congelaron hasta el momento de realizar los cortes histológicos, los que en su mayoría fueron de 6 micras.

Con la intención de poder realizar un estudio potencialmente comparativo, se analizó la expresión de los mismos marcadores que se estudiaron en las células de adenocarcinoma mamario *in vitro*. Las proteínas estudiadas fueron:

- Conexina 26
- Conexina 40
- Conexina 43
- E-cadherina
- C-Myc

La inmuno-histoquímica se desarrolló con el método de fosfatasa alcalina unida al anticuerpo secundario, la que al reaccionar con su sustrato origina una tinción colorimétrica de tonalidad café en los sitios reconocidos por el anticuerpo primario específico. Esto permite observar la localización sub-celular de las proteínas en estudio mediante microscopía de luz visible.

Se evaluó la localización sub-celular de cada proteína en las zonas infiltrantes e *in situ* de cada tumor, y considerando el número de células que expresan la proteína en relación a su expresión en membrana o en citoplasma celular, según el siguiente esquema de estudio:



Estos parámetros se analizaron respecto a:

- Grado de diferenciación histológica del tumor: 1, 2 o 3 (de menor a mayor grado de diferenciación)
- Grado de metástasis: positivo o negativo

Los parámetros del grado de diferenciación tumoral y de metástasis fueron obtenidos del informe histológico de cada tumor reportado por el departamento de anatomía patológica de la U. Católica.

Los resultados de ésta evaluación se analizaron estadísticamente con el método de regresión logística multinomial univariada con un 95% de confianza, considerando el valor o punto estimado límite de 1 para el grado de diferenciación o de metástasis.

Se consideró una correlación significativa cuando el análisis estadístico arrojó un $P < 0.1$ para los parámetros evaluados y una tendencia de correlación cuando el análisis obtenido arrojó un $P < 0.2$.

A continuación se muestran ejemplos de las inmuno-tinciones realizadas para cada marcador en tumores mamarios humanos.

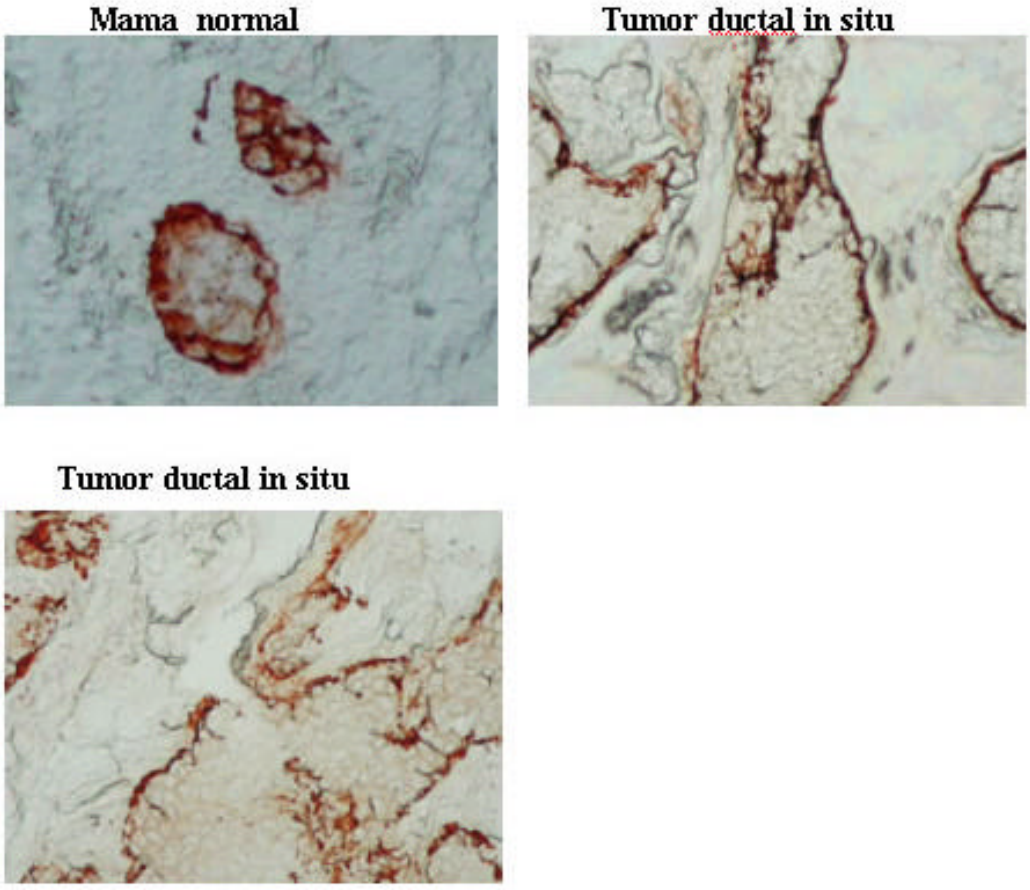


Figura 16. Inmunotinción de Cx 26 en cortes de tejido mamario humano. En mama normal Cx 26 se expresa abundantemente tanto en membrana como en citoplasma. En tumores, tanto ductales como *in situ*, la conexina se localizó predominantemente en la membrana basal del tumor.

La figura 16 muestra que en mama normal, la Cx26 se encuentra abundante en la membrana de las células ductales en tanto que en tumores la marca para Cx26 se encuentra débil, prácticamente indetectable correlacionándose con lo descrito para células tumorales. Se puede detectar inmuno-tinción para esta Cx principalmente en la membrana basal del tumor *in situ.* Por no observarse marca significativa en células tumorales, los resultados para Cx26 no fueron informativos y no pudieron ser incluidos en el estudio estadístico

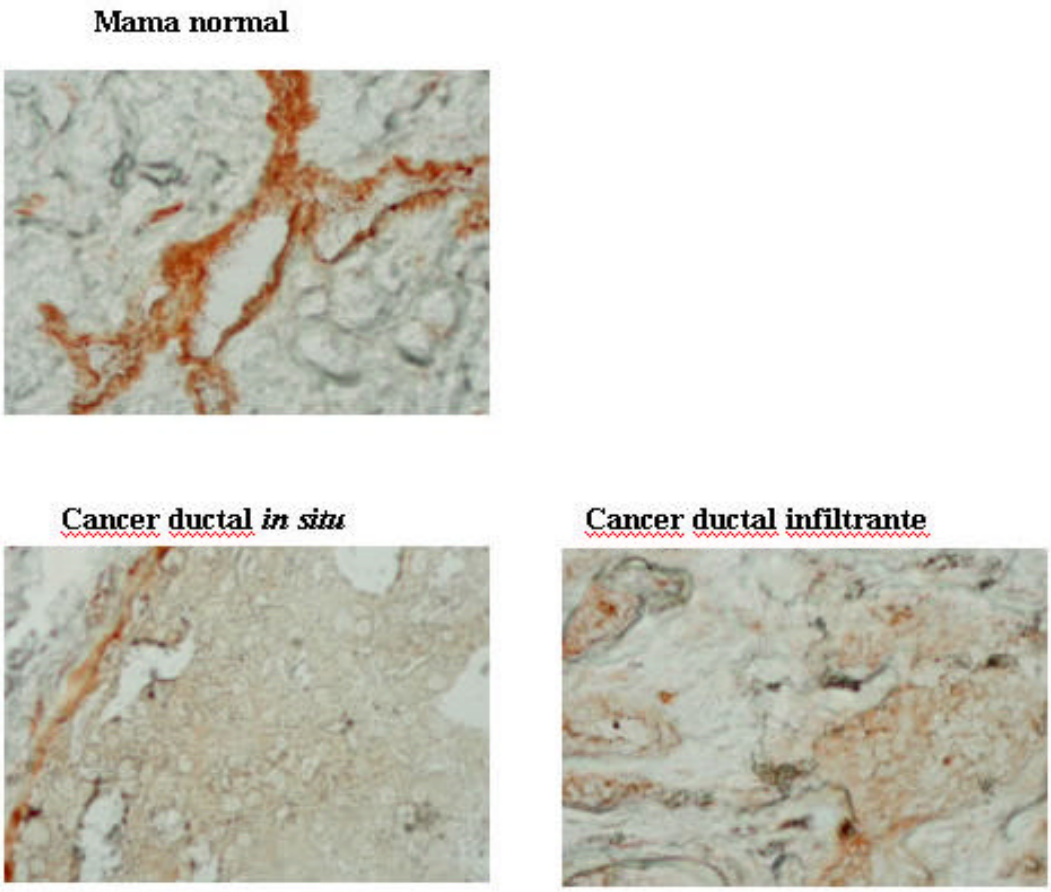


Figura 17. Inmutinción de Cx 43 en cortes de tejido mamario humano. En mama normal la proteína se expresó abundantemente tanto en membrana plasmática como en citoplasma. En tumores ductales *in situ* la marca se inmuno-detectó principalmente en citoplasma, mientras que en tumores ductales infiltrantes la expresión fue tanto citoplasmática como en membrana

En mama normal, la Cx43 se encuentra en la membrana de las células ductales, observándose también inmuno-reacción en la membrana basal.

En ambos casos, células de tumor *in situ* e infiltrantes, la expresión de Cx43 es significativamente más débil que en células normales, lo que concuerda con las observaciones para células tumorales mamarias *in vitro*. En el tumor ductal *in situ*, la débil reacción para Cx43 es mayormente citoplasmática, lo que se correlaciona con un menor grado de diferenciación histológica. En el tumor ductal infiltrante, la marca para Cx43, a pesar de ser más débil que en células normales, se encuentra en citoplasma y en la membrana de las células tumorales, correlacionándose con el grado de diferenciación intermedio del tumor (Fig. 17).

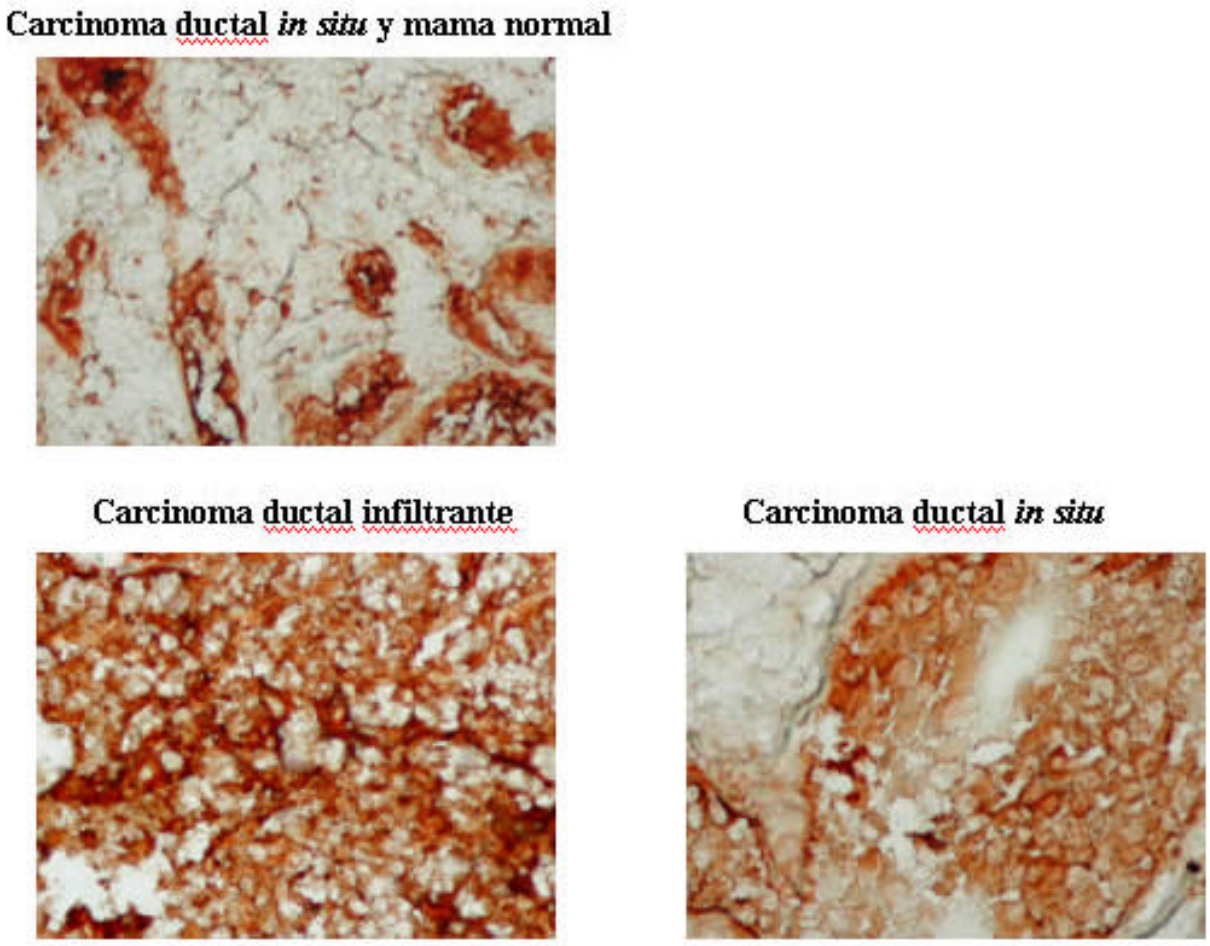


Figura 18. Inmuno-detección de Cx 40 en tejido mamario humano. Cx 40 se localizó abundantemente tanto en mama normal como en cortes de tumores ductales. Sin embargo en estos últimos la localización de la proteína fue predominantemente citoplásmatica.

Como se observa en la figura 18 la expresión de Cx40 en mama normal es abundante y se observa en membrana y más débilmente en el citoplasma de las células mamarias ductales.

En las células de tumor ductal infiltrante, la Cx40 se expresa mayormente en la membrana celular observándose además inmuno-tinción citoplasmática, lo que potencialmente se correlacionó (tendencia) con un mayor grado histológico de diferenciación tumoral. En cambio, las células del tumor ductal *in situ* expresan Cx40 mayormente en el citoplasma, lo que potencialmente se correlaciona (tendencia) con un menor grado de diferenciación histológica, es decir con tumores de mayor agresividad (Fig.18).

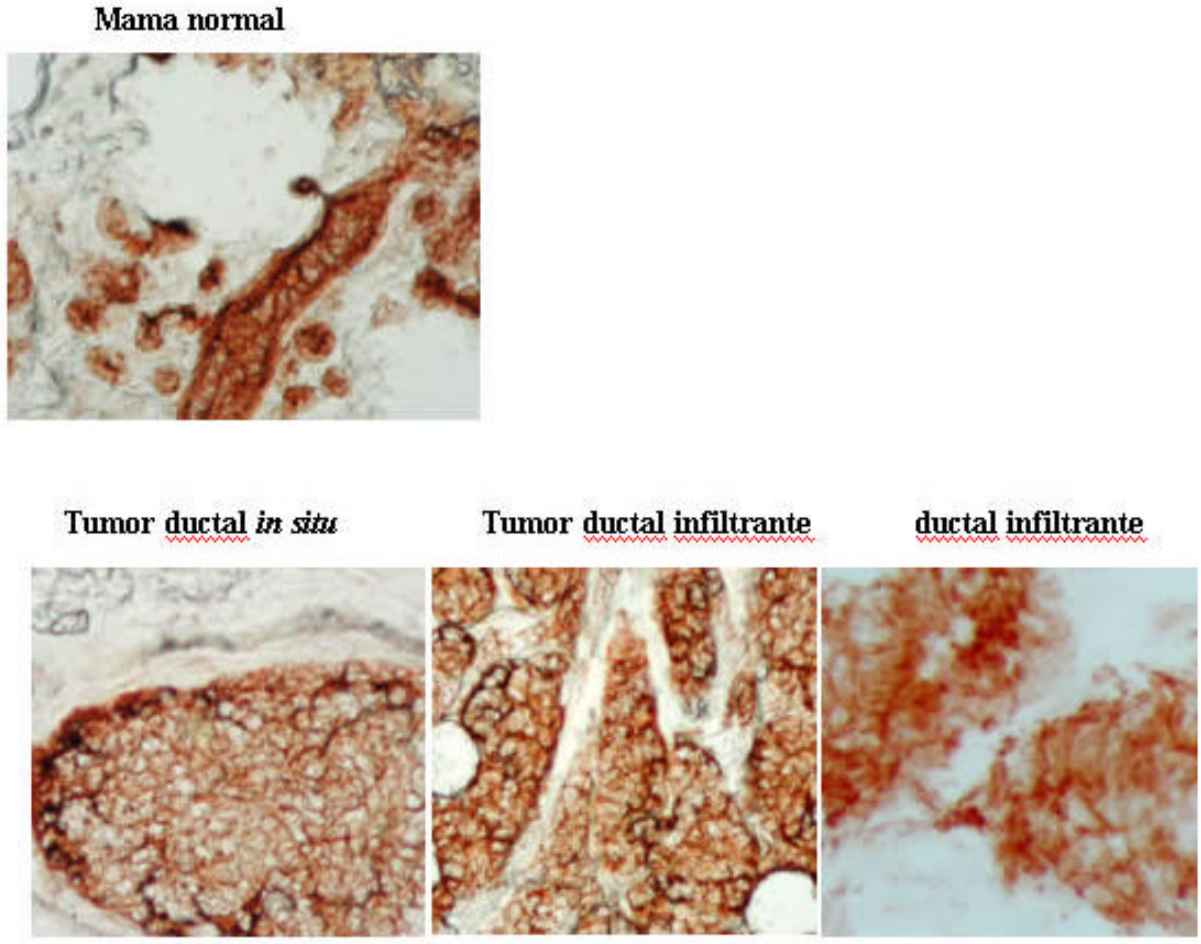


Figura 19. Inmunodetección de E-cadherina en diferentes cortes de tejido mamario humano. La detección fue bastante más discreta en tumores respecto a la mama normal, localizándose en tumores ductales infiltrantes predominantemente en citopasma.

En mama normal, E-cadherina se expresa abundantemente y se localiza mayoritariamente en la membrana de las células ductales, observándose además marca débil en el citoplasma celular (Fig. 19).

En todos los tipos tumorales, la marca para E-cadherina es más débil que en mama normal, lo que se correlaciona con un estadío de de-diferenciación celular propio de células tumorales. Sin embargo es posible detectar E-cadherina en la membrana de las células de tumores *in situ*, con débil expresión citoplasmática. Las células de tumores infiltrantes, en general expresan E-cadherina en el citoplasma celular, detectándose también marca en la membrana citoplasmática. Un mayor número de células de tumores infiltrantes expresando E-cadherina en citoplasma se correlacionó con cánceres menos diferenciados (Fig. 19).

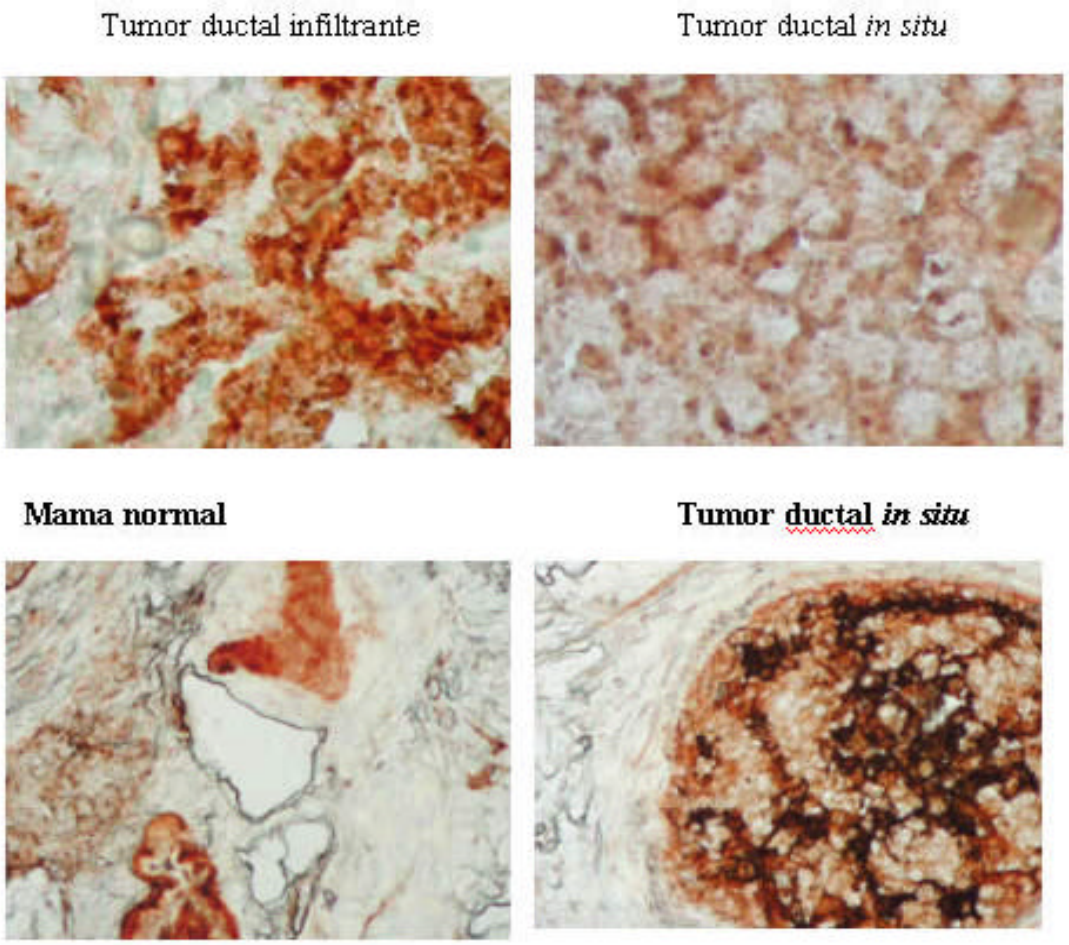


Figura 20. Inmutinción de c-Myc en diferentes cortes de tejido mamario humano. En mama normal c-Myc se expresa tanto en membrana, como en citoplasma y núcleo. Sin embargo la inmuno-localización de este marcador en células tumorales es predominantemente citoplasmática.

En la figura 20 se muestra una micrografía correspondiente a una porción normal de mama del corte de tumor donde se aprecia expresión de C-myc en el núcleo de algunas células, también se observa en la membrana de algunas células.

Las células de tumores *in situ* que expresan C-Myc predominantemente en el citoplasma celular se correlacionaron con tumores de menor grado de diferenciación y fue el único marcador que expresado en estas condiciones se correlacionó significativamente con tumores metastásicos (Fig. 20).

Células de tumores ductales infiltrantes que expresan C-Myc en membrana, tomando en consideración la intensidad de la tinción y el porcentaje de células que lo expresan, se correlacionó significativamente con un mayor grado de diferenciación tumoral (Fig. 20).

A continuación se resumen los resultados obtenidos de los análisis de Cx26, cx40, Cx26, E-cadherina y C-Myc en los 24 tumores mamarios humanos estudiados.

4.3.a-CORRELACIÓN SIGNIFICATIVA CON EL GRADO DE DIFERENCIACIÓN TUMORAL:

Punto estimado: >1 menor grado de diferenciación (mayor malignidad).
<1 mayor grado de diferenciación (menor malignidad).
Porcentaje grupal, rangos: 0-5% de células que expresan la proteína
5-40% “ “ “
> 40 % “ “ “

Conexina 43 con respecto a diferenciación tumoral

Correlación significativa

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx43;infiltrante;membrana;intensidad.	0.0486	0.421

Una mayor intensidad de Cx43 en membrana de células tumorales infiltrantes se correlaciona con un mayor grado de diferenciación (menor grado de malignidad) tumoral.

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx43;infiltrante;membrana;porcentaje.	0.0847	0.983

Se observa una correlación significativa entre mayor número de células expresando Cx43 en membrana de células tumorales infiltrantes y el grado de diferenciación (menor grado de malignidad) tumoral.

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx43;infiltrante;membrana;porcentaje por grupo.	0.0573	0.439

E-cadherina con respecto a diferenciación tumoral

Correlación significativa

Marcador	Pr	Punto Estimado
E-cadh;infiltrante;citoplasmática;porcentaje.	0.0419	1.018

Hay una correlación entre mayor número de células que expresan E-cadherina en el citoplasma de células infiltrantes y un menor grado de diferenciación (mayor grado de malignidad) de las células tumorales.

Marcador	Pr	Punto Estimado
E-cadh;infiltrante;citoplasmática;porcentaje por grupo.	0.0371	2.422

C-Myc con respecto a grado de diferenciación tumoral.

Correlación significativa:

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-Myc;infiltrante;membrana; intensidad.	0.0919	0.393

La presencia de c-Myc en membrana se correlaciona con un mayor grado de diferenciación (menor malignidad) de las células tumorales.

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-Myc;infiltrante;membrana;porcentaje.	0.0666	0.981

Hay correlación significativa entre mayor porcentaje de células que expresan c-Myc en membrana, mayor diferenciación (menor malignidad) tumoral.

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-Myc;infiltrante;membrana;porcentaje grupal	0.0892	0.426

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-Myc; *in situ*; citoplasmático; intensidad	0.0961	2.351

La expresión de C-Myc en el citoplasma se correlaciona con un menor grado de diferenciación (mayor grado de malignidad) de las células tumorales.

4.3.b. Tendencia:

Correlación potencial o tendencia de correlación quiere decir que el estudio estadístico de regresión logística multinomial univariada arrojó una significancia con un $P < 0.2$, el que puede llegar a ser < 0,1 con el análisis de un mayor número de tumores.

Conexina 40 con respecto a diferenciación tumoral

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx40;infiltrante;membrana;porcentaje.	0.1478	0.988

Un mayor número de células infiltrantes que expresan Cx40 en membrana tiende a correlacionarse con un mayor grado de diferenciación (menor grado de malignidad) de estas células.

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx40;*in situ*;citoplamsmática;porcentaje.	0.1906	1.260

Hay una potencial correlación entre mayor número de células tumorales *in situ* expresando Cx40 en el citoplasma con un menor grado de diferenciación (mayor grado de malignidad) tumoral.

Conexina 43 con respecto a diferenciación tumoral

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx43;*In situ*;membrana; intensidad.	0.1614	0.350

La intensidad de Cx43 en membrana de células tumorales no *in situ* tiene tendencia a correlacionarse con un mayor grado de diferenciación (menor grado de malignidad) tumoral.

C-myc con respecto a diferenciación tumoral

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-Myc;infiltrante;citoplasmático;intensidad.	0.1771	1.780

Mayor expresión de C-myc en citoplasma, mayor es el grado de malignidad del tumor (menor grado de diferenciación).

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-myc; *in situ*; citoplasmático; porcentaje.	0.1808	1.014

Mayor número de células in situ expresando C-Myc en el citoplasma se correlaciona con un menor grado de diferenciación (mayor grado de malignidad) de las células tumorales.

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-myc; *in situ*; membrana; porcentaje.	0.1923	0.987

Mayor porcentaje de células in situ expresando C-myc en membrana se correlaciona con un mayor grado de diferenciación (menor malignidad) de las células tumorales.

4.3.c. Correlación con metástasis

- Punto Estimado: >1 mayor grado de metástasis (mayor malignidad).

  <1 menor grado de metástasis (menor malignidad).

Correlación significativa:

C-myc:

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-Myc; *in situ*; citoplasmático; porcentaje	0.0929	1.021

Se observa una correlación significativa entre el número de células que expresan C-Myc en el citoplasma de células *in situ* con los tumores metastásicos.

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-myc ;in situ; citoplasmático; porcentaje por grupo	0.0762	2.828

Tendencia:

Conexina 43 con respecto a metástasis

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx43; infiltrante;citoplasmática; porcentaje	0.1959	1.015

Se observa una posible correlación entre el número de células infiltrantes que expresan conexina 43 en el citoplasma con la presencia de metástasis.

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx43; *in situ*; membrana; intensidad	0.1958	4.317

La intensidad de Cx43 en la membrana de células tumorales *in situ* tiende a correlacionarse con tumores metastásicos.

Conexina 40 con respecto a metástasis

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx40;infiltrante; citoplasmática; porcentaje	0.1591	1.027

La expresión de Cx40 en el citoplasma de células tumorales infiltrantes tiende a correlacionarse con tumores metastásicos.

Marcador	Pr	Punto Estimado
Cx40; *in situ*; membrana; porcentaje	0.1265	1.025

Un mayor número de células in situ expresando Cx40 en membrana tiende a correlacionarse con tumores metastásicos.

C-myc con respecto a metástasis

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-myc;infiltrante;citoplasmático;intensidad	0.1988	1.909

La expresión de C-Myc en el citoplasma de células tumorales infiltrantes tiende a correlacionarse con tumores metastásicos.

Marcador	Pr	Punto Estimado
C-myc;infiltrante;citoplasmático;porcentaje	0.1685	1.030

C-myc tiende a expresarse en el citoplasma de células tumorales infiltrantes en los tumores metastásicos

En general, los análisis de tumores mamarios mostraron correlación significativa entre la expresión de Cx43 en membrana de las células tumorales y un mayor grado de diferenciación histológica. Se encontró correlación significativa entre la mayor intensidad y número de células expresando c-Myc en el citoplasma celular y un menor grado de diferenciación tumoral que se relacionó además con tumores metastásicos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos *in vitro* para células MCF-7, en donde el tratamiento con AR+Tx inducía un aumento de Cx43 en la membrana de células en contacto y se correlacionó con una mayor expresión de E-cadherina, marcador de diferenciación epitelial. Es decir, el tratamiento estimuló el potencial de diferenciación celular que se correlacionó con una mayor marca para Cx43 en la membrana celular, equivalente a los resultados obtenidos en biopsias de tumores mamarios.

Por otro lado, la expresión de c-Myc en tumores mamarios se correlaciona con menor grado de diferenciación y mayor malignidad. El tratamiento de células MCF-7 *in vitro* indujo una disminución de los niveles proteicos de c-Myc sugiriendo una reversión parcial del fenotipo tumoral.

5. DISCUSION

La participación de la CI por UHs y su correlación con una reversión del fenotipo tumoral ha sido documentada en diferentes modelos experimentales mediante la expresión forzada de Cxs (Trosko y cols., 1998). La búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas, accesibles clínicamente, dirigidas a la inducción de un aumento de CI por UHs en células tumorales podría contribuir a la cooperación o mayor eficacia de los tratamientos anti-neoplásicos actuales.

En un intento por estimular y maximizar la CI por UHs en células de adenocarcinoma mamario, MCF-7 y MDA-MB.231, estudiamos el efecto combinado de dos agentes quimiopreventivos, ácido all-trans retinoico, conocido como modulador de la CI por UHs, y tamoxifeno, usado ampliamente para la prevención del cáncer de mama.

El tratamiento combinado de dosis quimiopreventivas de AR+Tx aumenta la CI por UHs en células MCF-7 más eficientemente que con los agentes en forma separada solamente a las 6 horas de tratamiento. A tiempos posteriores de tratamientos, el aumento de la CI por UHs inducida por AR+Tx fue similar al obtenido con AR o Tx. Sin embargo, el incremento de comunicación fue más perdurable a través de los tiempos de cultivo, con la combinación de agentes, que con ellos separadamente. Estudios previos realizados en el laboratorio indicaban que con dosis de 10^{-6}M de AR o de Tx, en forma separada, se obtenía el aumento óptimo de la CI por UH, sin inducir muerte celular o toxicidad celular. Estas observaciones podrían explicar el efecto no aditivo de AR+Tx sobre la comunicación de células MCF-7, sin embargo, la mayor duración de la CI a través del tratamiento sugeriría una cooperación entre los mecanismos de acción de AR y Tx.

El hecho de que las células permanezcan comunicadas por más tiempo permitiría el intercambio de señales celulares y de metabolitos por un mayor período, y por lo tanto facilitando el efecto anti-tumoral de los agentes quimiopreventivos en forma más eficiente. Como se ha reportado en otros sistemas en donde se han sobre-expresado Cxs (Hirshi y cols., 1996), el aumento de la CI por UHs se correlaciona con una disminución del crecimiento celular y cambios en el fenotipo, hacía un estadío de mayor diferenciación celular (Hirshi y cols., 1996). Con el objetivo de poder estudiar la posible correlación entre el incremento en la CI por UHs y los cambio observados en la proliferación y diferenciación celular en nuestro sistema, bloqueamos la comunicación intercelular inducida por AR+Tx con BGA, el cual suprime completamente la comunicación celular hasta 120 horas de cultivo. La acción de AR+Tx, sin la CI por UHs como mediador, tiene un efecto disminuido en la inhibición de la proliferación celular y en la estimulación de la diferenciación, lo que fue probado mediante, ensayos de proliferación celular, contenido de DNA celular y expresión de E-cadherina respectivamente. La participación de la CI por UHs en estos efectos celulares fue significativa, puesto el bloqueo de la CI previno en aproximadamente un 30% el efecto anti-proliferativo debido a AR+Tx y la expresión proteica de E-cadherina, un marcador de diferenciación celular.

Concordante con el aumento de la CI por UHs, una mayor inmunotinción de Cxs 26 y 43 pudo ser visualizada en la membrana de células en contacto en los cultivos con AR+Tx. De acuerdo a estas observaciones el tratamiento indujo mayores niveles proteicos para estas conexinas, determinados por Western blot durante la mayor parte de los tiempos de cultivo. A pesar de haberse observado inmunotinción de Cx40 en la membrana de contacto celular de células MCF-7 durante las primeras 48 horas de tratamiento, esto no se correlacionó con cambios significativos en los niveles proteicos de esta conexina. Sin embargo desde las 72 horas de

cultivo se observa una disminución de los niveles proteicos para Cx40. Estos resultados sugieren que el aumento inicial de la CI por UHs inducido por AR+Tx podría estar mediado por las tres conexinas, en tanto que la mantención de la CI durante el tiempo se debería principalmente a canales formados por Cx 26 y 43. El efecto de AR sobre la expresión de Cx43 ha sido reportado para otros sistemas, sin embargo, la expresión de Cx26 y la regulación diferente de Cx40 en nuestro sistema aún no ha sido investigada. Estudiar los mecanismos que regulan la expresión de las Cxs podría dar indicios de la formación de canales de UHs que participen preferentemente en la inhibición de la proliferación celular o de la inducción de la diferenciación celular, dependiendo de que Cx lo está formando.

El bloqueo de la expresión de c-Myc con oligonucleótidos anti-sentido ha demostrado una participación importante de esta proteína en proliferación celular (Koskinen y Alitalo, 1993). Nuestros resultados y de otros (Perry y cols., 1995) investigadores, muestran que los niveles proteicos de c-Myc no cambian cuando células MCF-7 son tratadas con 1µM de Tx y también de acuerdo con nuestros hallazgos y con otros reportes, la expresión de c-Myc no se bloquea eficientemente con sólo AR (Shang y cols., 1998). En este trabajo nosotros mostramos que el tratamiento de células MCF-7 con la combinación de dosis quimiopreventivas de AR+Tx regula en forma negativa la expresión de c-Myc observándose una disminución de sus niveles proteicos a partir de las 48h de tratamiento.

Por otro lado, la disminución de la expresión de Bcl2 ha sido correlacionada con apoptosis inducida por algunos retinoides (Toma y cols., 1997). Si bien es cierto, algunas células apoptóticas fueron observadas en cultivos de células MCF-7 después de 120 horas de exposición a AR 1µM, éstas fueron significativamente menos que las observadas en cultivos control a iguales tiempos de incubación. Los niveles proteicos de Bcl-2 disminuyen a partir de 72-96h de

tratamiento sólo con AR (datos no mostrados) y se ha reportado que Tx 1µM induce una disminución de la expresión de bcl2 pero no de bax o de bcl-X_L en células MCF-7 lo que se correlaciona con muerte celular (Zhang y cols., 1999). Nuestros resultados muestran que, en células MCF-7 la combinación de AR+Tx 1µM induce una disminución de la expresión proteica de Bcl2 a las 24 horas de tratamiento. Sin embargo, a pesar de los bajos niveles de Bcl-2 durante las 120 horas de tratamiento, no se observó muerte celular significativa. En efecto, los cultivos tratados con AR+Tx fueron seguidos por 7 días observándose un gran número de células viables, en tanto que las células de los cultivos controles mueren a partir de las 96h por sobre-crecimiento. El bloqueo de la CI por UHs con BGA no tiene efecto sobre la disminución de los niveles proteicos de c-Myc o Bcl-2, sugiriendo que el efecto mediador de la CI por UHs sobre la inhibición de la proliferación celular inducido por AR+Tx probablemente involucra mecanismos independientes a los que involucran la participación de c-Myc o Bcl-2.

El análisis de integridad del DNA por citometría de flujo, TUNEL o exclusión de IP mostraron un bajo número de células apoptóticas en células MCF-7 tratadas con AR+Tx y la inhibición de la CI por UHs no tuvo un efecto significante en la reducción de la muerte celular observada en cultivos tratados sin el bloqueador, sólo con AR+Tx. Estos resultados sugieren que el aumento de la CI por UHs debida a AR+Tx estaría principalmente mediando la reversión del fenotipo neoplásico en células MCF-7 sin participar en la facilitación de procesos de muerte celular. Nosotros hemos usado dosis quimiopreventivas de agentes que no provocan daño celular, por lo que, expansión de señales de muerte a través de las UHs no sería esperable.

Hasta aquí nuestros resultados muestran que el tratamiento combinado de AR+Tx induce un significante aumento de CI por UHs en células MCF-7 y facilitó aproximadamente un 34% de la inhibición del crecimiento celular observada, y alrededor de un 30% del incremento de los

niveles proteicos de E-cadherina, un marcador de diferenciación celular. Nosotros creemos que la inducción de CI por UHs por AR+Tx en conjunto con la reducción de los niveles proteicos de Bcl-2 y c-Myc no solamente resulta en una reversión parcial del fenotipo maligno, sino también puede contribuir a una mayor sensibilidad de las células tumorales para una acción más efectiva de las drogas anti-neoplásicas tradicionales.

El efecto de la combinación de AR+Tx en células MDA-MB 231 fue diferente al obtenido en células MCF-7. A pesar de que las células MDA-MB 231 fueron aisladas de un tumor mamario humano, no poseen características de células epiteliales, como por ejemplo no expresan citoqueratinas, consideradas marcadores epiteliales. Estas células tampoco expresan E-cadherina, razón por la cual no se informaron resultados con respecto al efecto de AR+Tx y/o CI por UHs sobre el potencial de diferenciación celular. Ha sido reportado que algunas células tumorales expresan N-cadherina en vez de E-cadherina, lo que estaría relacionado con mayor potencial de invasión. Las células MDA-MB 231 son altamente invasivas, sin embargo no fue posible detectar la expresión de N-cadherina ni de algún otro marcador epitelial. El fenotipo de estas células es más bien fibroblástica lo que hace que, en conjunto con las observaciones anteriores, y de acuerdo a otros reportes, se consideren células mesenquimáticas aisladas de tumor mamario humano y no epiteliales tumorales. A pesar de estar comunicadas en aproximadamente un 40%, la combinación de AR+Tx estimula la CI por UHs en células MDA-MB 231 en un 25% por sobre la CI basal durante las primeras 48h de tratamiento. El aumento de la CI por UHs no se correlacionó, en estas células, con cambios significativos en la proliferación celular. Sin embargo, el tratamiento con la combinación de agentes quimiopreventivos indujo, comparada con las células control, una disminución de los niveles de Bcl-2 y c-Myc y un aumento de apoptosis a partir de las 96h de cultivo. El bloqueo de la CI por UHs no alteró los cambios inducidos por

AR+Tx a excepción de los niveles proteicos de Bcl-2, en donde se observó una discreta reversión de la disminución en presencia de BGA durante solamente las primeras 48h de tratamiento, sin embargo, sería necesario realizar otros tipos de estudios para establecer éste efecto. A pesar de que, en células MDA-MB 231, la CI por UH no tiene participación activa en los efectos inducidos por AR+Tx, el tratamiento podría ser beneficioso por inducir una disminución de dos marcadores tumorales importantes en refractariedad a terapia anti-neoplásica: Bcl-2 y c-Myc. La disminución de Bcl-2 y c-Myc, que se correlaciona con aumento de muerte celular comparada con células control podría dar como resultado una célula más sensible a apoptosis inducida por agentes anti-tumorales tradicionales.

Reportes previos habían demostrado la expresión de Cx43 y 26 en cortes mamarios humanos normales y una disminución de la expresión de estas Cxs en carcinoma mamarios humanos (Monaghan y cols., 1996). Además de corroborar estas observaciones, nuestros resultados pudieron establecer una correlación significativa entre los tumores mamarios que expresaban Cx43 en la membrana de células tumorales y un mayor grado de diferenciación histológica, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en células MCF-7, en donde un aumento de los niveles de E-cadherina, marcador de diferenciación celular, ocurre concomitante con un aumento de la CI por UH y de Cx43 en la membrana de contacto celular. La expresión de Cx26 en tumores fue débil y por lo tanto los resultados obtenidos no fueron significativos. La expresión de Cx40 en tejido mamario humano no había sido reportada y se observó abundantemente en el citoplasma o en membrana de células tumorales. Aunque su expresión no arrojó correlación significativa, su localización citoplasmática en un alto porcentaje de células tuvo una tendencia a relacionarse con tumores de menor grado de diferenciación histológica y con metástasis, en tanto que su expresión en membrana, con un mayor grado de diferenciación

tumoral. La expresión de E-cadherina en tejido mamario normal es abundante y observada en la membrana de las células ductales. En tumores mamarios su expresión está disminuida y cuando se observa en el citoplasma de la mayoría de las células tumorales se correlaciona con un menor grado de diferenciación histológica o con tumores mas malignos. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos *in vitro* sugiriendo que la mayor expresión de E-cadherina y de Cx43 en la membrana de contacto celular serían indicativos de un mayor grado de diferenciación, lo que a su vez se correlaciona con un mejor pronóstico. La estimulación farmacológica, con AR+Tx, de mayores niveles proteicos y localización en membrana de E-cadherina y Cx43 podrían dar como resultado células de menor malignidad, lo que validaría otro aspecto de la terapia quimiopreventiva en el tratamiento contra el cáncer.

La restauración farmacológica de la comunicación celular por UHs puede ofrecer potencialmente un mecanismo blanco con la posibilidad de modulación, para complementar las estrategias terapéuticas contra el cáncer.

6. BIBLIOGRAFIA

Anzano, M.A., Byers, S.W., Smith, J.M. (1994). Prevention of breast cancer in the rat with 9-cis retinoic acid as single agent and in combination with tamoxifen. *Cancer Res.* 54: 4614-4617.

Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, K., Juliano, R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, inmunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*. 50: 197-263.

Bevilacqua,A., Looch Caruso, R ., Erickson, R.P. (1989). Abnormal development and dye coupling produced by antisense RNA to gap junction protein in mouse preiplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5444-5448.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bruzzone, R., White, T.W., Paul, D.L. (1996). Conections with connexins the molecular basis of direct intercelluar signaling. *Eur. Biochem*. 238: 1-10.

Dang, C.V. (1999). C-Myc target genes involved in cel growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1-11.

Dietze, E.C., Calwell, L.E., Marcom, K., Collins, J., Yee, L. (2002). Retinoids and retinoic acid receptors regulate growth arrest and apoptosis in human mammary epithelial cells and modulate expression of CBP/p300. *Microsc. Res. Tech.* 59: 23-40.

Dokmanovic, M., Chang, B.D., Fang, J., Roninson, I.B. (2002). Retinoid-induced growth arrest of breast carcinoma cells involves co-activation of multiple growth-inhibitory genes. *Cancer Biol. Ther.* 1: 24-7.

Eghbali, B., Kessler, J.A., Reid, L.M., Roy, C., Spray, D.C. (1991). Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 10701-10705.

Fanidi, A., Harrington, E.A., Evan, G.I. (1992). Cooperative interaction between c-Myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature Lond.* 359: 554-556.

Gamallo, C., Palacios, J., Suarez, A., Pizarro, A., Navarro, P., Quintanilla, M., Cano, A. (1993). Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am. J. Pathol*. 142: 987-993.

Gavrieli, Y., Sherman, Y,S., Ben-Sasson, S.A (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 503-512.

Gottardis, M.M., Wagner, R.J, Borden, E.C., Jordan, V.C. (1989). Differential ability of abtiestrgens to stimulate breast cancer cell (MCF-7) growth *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.* 49: 4765-4769.

Hirshi, K.K., Xu, C.E., Tsukamoto, T., Sager, R. (1996). Gap junction genes Cx26 and Cx individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Differ.* 7: 861-870.

Hodhes, G., Rowlatt, C. (1994). *Developmental Biology and Cancer*.3rd edition CRC Press.

Hong, W.K. (1998). American Society of Clinical Oncology. *Educational book.34th Annual Meeting*. Los Angeles California.

Hong, W.K., Sporn, M.B. (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*, 278; 5340 1073-7

Kosary, C.L., Bethesda, M.D (1995). Seer Cancer Statistics Review, 1973-1992 *NIH Publ. Nº. 95-2789, National Cancer Institute.

Koskinen, P.S., Alitalo, K. (1993). Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation and death. *Semin. Cancer Biol.* 4: 3-12.

Lee,S., Gilula, N.B., Warner, A.E. (1987). Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development. *Cell* 51, 851-860.

Lowenstein W.R. (1979). Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem. Biophys. Acta* 560: 1-65.

Lowenstein, W.R. (1981). Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev*. 61: 829-913.

Mehta, P.P., Bertram, J.S., Lowenstein, W.R. (1989). The actions of retinoids on cellular growth correlate with their actions on gap junctional communication. *J. Cell Biol*. 108: 11053-11065.

Mehta, P.P., Hotz-Wagenblatt, A., Rose,B., Shalloway, D., Lowenstein, W.R. (1991). Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J. Memb. Biol*. 124, 207-225.

Mesnil, M., Piccoli, C., Tiraby, G., Willecke, K., Yamasaki, H. (1996). Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93: 1831-1835.

Monaghan, P., Clarke, C., Perusinghe, N.P., Moss, D.W., Chen, X,Y., Evans, H. (1996). Gap junction distribution and connexin expression in human breast. *Exp. Cell Res.* 223: 29-38.

Perry, R.R., Kang, Y., Greaves, B. (1995). Effects of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and –independent human breast cancer cells. *Ann. Surg. Oncol.* 2: 238-284.

Reed, J.C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* 124: 1-6.

Ruch, R.J. (1994). The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann. Clin. Lab. Sci* 24: 216-231.

Shang, Y., Baumrucker, C.R., Green, M.T. (1998). C-Myc is a major mediator of the synergistic growth inhibitory effects retinoic acid and interferon in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 46: 608-13.

Sheardown, S.A., Hooper, M.L. (1992). A relationship between gap junction-mediated intercellular communication and the in vitro developmental capacity of murine embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* 198: 276-282.

Sheikh, M.S., Fornace, A.J. (2000). Role of p53 family members in apoptosis. *Cellular Physiol*. 182: 171-181.

Sosinsky, G. (1995). Mixing de connexins in gap junction membrane channels. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 92: 9210-9214.

Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. (1994). The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine. 2nd edition. Raven Press.

Strasser, A., Huang, D.C., Vaux, D.L. (1997). The role of the bcl2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim. Biophys Acta* 1333: F151-F178.

Terzaghi-Howe, M., Chang, G.W., Popp, D. (1997). Emergence of undifferentiated rat tracheal cell carcinomas, but not squamous cell carcinomas, is associated with a loss of expression of E-cadherin and of gap junction communication. *Carcinogenesis*. 18: 2043-2050.

Toma, S., Isnardi, L., Raffo, P., Dastoli, G., De Francisci, E.,. Riccardi, L., Palumbo, R., Bollag, W. (1997). Effects of all-trans retinoic acid and 13-cis retinoic acid on breast cancer cell lines: growth inhibition and apoptosis induction. *Int. J. Cancer* 70: 619-627.

Trosko,J.E., Randall, R.J. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience* 33: D208-236.

Wang, Y., Metha, P.P. (1995). Facilitation de gap junctional communication and gap junction formation in mammalian cells by inhibition of glycosylation. *Eur. J. Cell. Biol.* 67: 285-296.

Yamasaki, H. (1990). Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11, 1051-1058.

Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, Tsuchiya A, Abe R, Takenoshita S. (1999). Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X_L, without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res* 5: 2971-2977.