

# **Instituto de Oncología “Ángela H. Roffo”,**

## **Laboratorio de Biología Celular e Inmunobiología**

### **PROYECTO/S DE INVESTIGACIÓN:**

- **Valoración de las células madre tumorales como blanco para el tratamiento de tumores mamarios triple negativo y pulmonares quimioresistentes (UBACYT 20020220300151BA). Dra. Laura Todaro.**
- **Sinergia entre metformina y la inhibición de la vía de las pentosas fosfato: mecanismos asociados y potencial terapéutico antitumoral. Dra. Marcela Villaverde.**
- **Rol de las células madre tumorales mamarias en la progresión tumoral. Evaluación de la acción antitumoral de T2. Dra. Mariana Callero.**
- **Evaluación de blancos moleculares implicados en la transición del carcinoma *in situ* hacia el estadio invasor. Dra. Catalina Lodillinsky.**

### **REQUISITOS ESPECÍFICOS:**

**Ser estudiante del cuarto año de la carrera o superior.**

DOCENTE/S:Dra. Laura Todaro / Dra. Mariana Callero / Dra. Catalina Lodillinsky

E-MAIL: [aurtreger@institutoroffo.uba.ar](mailto:aurtreger@institutoroffo.uba.ar)

UBICACIÓN: Av. San Martín 5481, C1416DTB, CABA.

### **TAREAS**

#### **Dra. Laura Todaro**

- Participar en reuniones para discutir aspectos técnicos, científicos y académicos del plan de trabajo.
- Desarrollar habilidades en descongelamiento y mantenimiento de cultivos celulares tumorales humanos y murinos en monocapas y 3D (oncoesferas).
- Capacitarse en el diseño de protocolos de biología celular y molecular tumoral:
  - Curvas de crecimiento en monocapas y su modulación por tratamientos.
  - Cultivos de oncoesferas y análisis de su crecimiento con distintos tratamientos.
  - Preparación de fracciones celulares, proteicas y nucleotídicas para medición de parámetros *in vitro* (Western blot, RT-qPCR, citometría de flujo).
- Analizar datos clínicos y moleculares del plan de trabajo.

#### **Mariana Callero**

- Realizar y evaluar cultivos celulares, incluyendo cultivos primarios, mantenimiento y repique.
- Optimizar condiciones de cultivo de células madre tumorales (CMTs) a partir de muestras de pacientes.
- Determinar la frecuencia de CMTs mediante ensayos de dilución límite extrema (ELDA).
- Evaluar crecimiento tridimensional de CMTs mediante técnicas de microscopía.
- Analizar datos clínicos y correlacionarlos con la eficiencia de cultivo y

- obtención de CMTs
- Contribuir a discusiones científicas, el análisis de resultados y la propuesta de estrategias experimentales alternativas respaldadas por la evidencia disponible.

### **Catalina Lodillinsky**

- Observación de las prácticas y experimentos llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo.
- Participar en discusiones científicas, evaluando hipótesis, interpretando resultados y proponiendo estrategias experimentales basadas en la evidencia obtenida.

### **OBJETIVOS**

- Que el estudiante se incorpore a la práctica científica a través del desarrollo de habilidades relacionadas al cultivo celular y al manejo de datos.
- Que el estudiante desarrolle su pensamiento crítico a través de la elaboración de hipótesis y diseño de algunos experimentos básicos de biología celular y molecular tumoral.
- Que el estudiante pueda transmitir y poner en debate sus propios logros a través de su participación en un seminario interno.

### **CARGA HORARIA: 15 HORAS SEMANALES**

#### **Plan de trabajo**

**DOCENTE A CARGO:** Dra. Laura Todaro. Proyecto en el cual se enmarca el programa de formación del practicante: UBACyT 20020220300151BA.

**TÍTULO:** Valoración de las células madre tumorales como blanco para el tratamiento de tumores mamarios triple negativos y pulmonares quimioresistentes.

#### **INTRODUCCION:**

En los últimos tiempos se ha comenzado el estudio de la biología de un nuevo componente celular: las células madre tumorales (CSC, de sus siglas en inglés). Estas podrían proveer de nuevas herramientas para abordar terapéuticas contra el cáncer ya que, a pesar de ser sólo una minúscula parte dentro de los tumores, son las responsables de la falla de los tratamientos convencionales. Tanto la quimioterapia como la radioterapia reducen sustancialmente la masa tumoral, removiendo las células proliferantes, pero fracasan en curar al paciente dado que las CSC sobreviven, por tener una tasa de proliferación muy baja, pudiendo regenerar luego el tumor. Estudios recientes demostraron además que parte de la importancia de las CSC radica en el hecho de ser consideradas como semillas de la metástasis.

En el presente proyecto estudiaremos la biología de las CSC mamarias y de pulmón especialmente en tumores mamarios triple negativo y de pulmón no microcítico o de células no pequeñas (NSCLC) experimentales y humanos.

Nos proponemos estudiar el efecto de nuevas estrategias terapéuticas, que combinando de manera diferente moléculas ya conocidas (a manera de reposicionamiento), podrían tener como blanco a la CSC y de esta manera modular

múltiples aspectos vinculados a crecimiento tumoral y diseminación metastásica. Este nuevo enfoque, sobre el conocimiento de las CSC resultaría en un verdadero aporte a la toma de decisiones de los equipos de salud.

## **OBJETIVO GENERAL**

Las células madre tumorales o Cancer Stem Cells estarían implicadas en la formación, crecimiento y progresión del tumor además de ser resistentes a los tratamientos convencionales. Todas estas características ponen de manifiesto la importancia del estudio de este componente tumoral.

En el presente proyecto, nos proponemos estudiar el efecto de novedosas estrategias terapéuticas, que combinando de manera diferente moléculas ya conocidas, podrían tener como blanco a la CSC y de esta manera modular múltiples aspectos vinculados a crecimiento tumoral y diseminación metastásica. Este nuevo enfoque, sobre el conocimiento de las CSC resultaría en un verdadero aporte a la toma de decisiones de los equipos de salud.

Nuestro grupo de trabajo se encuentra abocado desde hace algunos años a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos en la patología oncológica. En este sentido, hemos evidenciado que la terapia con Ácido Retinoico, un metabolito activo de la Vitamina A y potente diferenciador celular, ha logrado disminuir la progresión maligna de distintos modelos experimentales mamarios. Incluso su combinación con moduladores de distintas vías de señalización intracelular ha logrado inhibir la progresión tumoral evitando la proliferación de células con fenotipo stem / progenitor.

A partir de nuestra experiencia, conjuntamente a la evidencia bibliográfica, nos proponemos ahora estudiar cual es el efecto de novedosas estrategias terapéuticas que nos permitan intervenir especialmente las características de las CSC, que contribuyen a la progresión maligna. Nos proponemos abordar esta problemática empleando modelos de mama triple negativo (para los cuales no existe hasta el momento terapéutica dirigida) y modelos de cáncer de pulmón no microcítico (también denominado de células no pequeñas, NSCLC) quimioresistentes, tumores para los cuales no existe un tratamiento de segunda línea eficaz.

**HIPÓTESIS:** Hipotetizamos que las células madre tumorales de mama y pulmón presentan un perfil de expresión génica compatible con características fenotípicas más agresivas que el resto de las células que conforman el tumor. Un tratamiento combinando retinoides (inductores de diferenciación) con inhibidores de HER2 para cáncer de mama o Cisplatino para cáncer de pulmón, reducirá en forma sinérgica el crecimiento y el potencial metastásico afectando específicamente el crecimiento del componente stem tumoral. Es importante aclarar que las CSC de los tumores mamarios triple negativos o HER2 negativos, pueden expresar el receptor HER2 a pesar de que el resto de las células del tumor no lo expresen.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Objetivo 1: Estudio de la modulación del perfil marcadores de pluripotencialidad y de vías de señalización implicadas en el mantenimiento de CSC, por los distintos tratamientos.

1a. Evaluar el perfil de expresión de los principales genes pluripotenciales y componentes del sistema retinoide en líneas tumorales mamarias y pulmonares como así también en sus respectivos componentes stem/progenitores.

Se evaluará la modulación de estos perfiles bajo tratamientos en forma simple o combinada con:

- Retinoides: ATRA (panagonista de los receptores retinoicos), agonistas/antagonistas específicos para los receptores retinoicos RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  (implicado en diferenciación y mantenimiento de stem cells respectivamente)
- Inhibidores de HER2 (Lapatinib) para los modelos de cáncer mamario triple negativos o HER2 negativos. Es importante aclarar que las CSC de estos tumores, pueden expresar el receptor HER2 a pesar de que el resto del tumor no lo expresen.
- Cisplatino para los modelos de cáncer de pulmón no microcítico sensibles y resistentes a dicho quimioterápico.

1b. Estudiar las principales moléculas de las vías de señalización intracelular, vinculadas a proliferación (ERK/MAPK), sobrevida (PI3K/Akt), apoptosis (Caspasas 3, 8 y 9 activadas, BcLx, BcL2) y mantenimiento de células stem/progenitoras ( $\beta$ -catenina/Wnt y Nanog) en respuesta a los tratamientos antes mencionados tanto en monocapas como sobre el componente CSC aislado.

Alternativamente, estudiaremos el estado de activación de las vías de Wnt y NF- $\kappa$ B (involucradas en mantenimiento del nicho stem) a través de la expresión y/o actividad de  $\beta$ -catenina y de p65/NF- $\kappa$ B respectivamente, en las CSC de las líneas mencionadas, así como su modulación por los tratamientos simples o combinados de retinoides con Lapatinib o cisplatino (según la línea celular)

1c. Dado que el nicho stem es inmunoprivilegiado, evaluaremos en las CSC la expresión de PD-1, PD-L1, CTLA-4 y su modulación por los tratamientos antes mencionados.

Objetivo 2: Evaluación de efectos biológicos relacionados con crecimiento tumoral y diseminación metastásica del componente CSC y su modulación por los tratamientos.

2a. Estudiar *in vitro* el efecto del tratamiento con Lapatinib o Cisplatino/ CIGB-300 (según se trate de modelos mamarios o pulmonares respectivamente) en presencia o no de retinoides, sobre el crecimiento, el potencial migratorio e invasivo, la capacidad clonogénica y la actividad de enzimas proteolíticas secretadas del componente CSC.

2b. Evaluar *in vivo* el efecto del tratamiento con Lapatinib en presencia o no de retinoides sobre la progresión tumoral del modelo experimental mamario murino, inoculando las CSC en ratones. Se analizará además el efecto de estos tratamientos sobre los últimos pasos de la cascada metastásica, mediante ensayos de metástasis experimentales.

Objetivo 3: Estudio descriptivo y valoración de las células madre tumorales presentes en las muestras de pacientes de nuestra población en el IOAHR.

A fin de lograr la validación clínica de nuestro modelo experimental, nos proponemos analizar el perfil de expresión de genes o marcadores relacionados con el mantenimiento de las CSC y genes del sistema retinoide en muestras de pacientes con cáncer de mama y pulmón de nuestra institución.

Actualmente el sector de Patología de nuestro instituto no contempla el estudio de células madre tumorales en las biopsias de los pacientes. Por este motivo, nuestro aporte además de tener traslación directa a este sector constituirá, para el área

médica, una herramienta de orientación pronóstica, terapéutica y de seguimiento del paciente oncológico. Emplearemos muestras criopreservadas del Biobanco de tejidos del Instituto “Ángel H. Roffo”, realizaremos un estudio retrospectivo empleando muestras de cáncer de mama triple negativo (n= 20), Luminal A (n=40), Luminal B (n=40) y HER2+ (n=20) y muestras de cáncer de pulmón NSCLC (n= 50) y SCLC (n=20).

## **METODOLOGÍA**

**Líneas celulares:** Utilizaremos la línea mamaria murina triple negativa 4T1 (tumorigénicas y metastásicas en ratones BALB/c), las líneas humanas triple negativas MDA-MB231 y HCC 70 y la línea humana HER2 negativa MCF-7. Asimismo, utilizaremos las líneas humanas de tumor de pulmón no microcítico A549 y NCI-H125 con sus variantes resistentes desarrolladas por nuestro equipo.

**Tratamientos:** Retinoides (ATRA, antagonista RAR $\alpha$  LE 135, antagonista RAR $\beta$  MM 11253) 1 $\mu$ M, Lapatinib 1- 5  $\mu$ M, (IC50 puesta a punto previamente), cisplatino 7-18  $\mu$ M; PMA (16nM) como control positivo en el estudio de la vía NF- $\kappa$ B. Se utilizará el medio condicionado de células L de fibroblastos de ratón rico en el factor wnt3a como control positivo de estimulación de la vía Wnt.

**Cultivo de Oncoesferas:** Teniendo en cuenta que las células stem a diferencia de las células diferenciadas normales, pueden crecer en suspensión a muy baja densidad, independientes de anclaje y en ausencia de suero, los métodos más utilizados para enriquecer esta población están basados en la formación de oncoesferas en medio libre de suero: Una suspensión monocelular de cada una de las líneas mencionadas previamente serán cultivadas en placas de 6 hoyos de baja adhesividad celular en medio libre de suero, suplementado con penicilina/streptomicina, EGF y el suplemento para oncoesferas B27. Una vez formadas las oncoesferas, éstas se podrán disgregar utilizando tripsina/EDTA, para poner las células en cultivo nuevamente y obtener segundas y terceras generaciones de estas.

**Tratamientos de las Oncoesferas:** Las oncoesferas obtenidas por cultivo en suspensión, serán tratadas con Lapatinib 1 $\mu$ M para la línea celular mamaria murina y 2,5 - 5  $\mu$ M para las mamarias humanas, o cisplatino 15  $\mu$ M para las líneas de pulmón (IC50 puesta a punto por nuestro grupo previamente) en presencia de retinoide (1 $\mu$ M) o vehículo (DMSO) como control durante cuatro días, a fin de evaluar in vitro distintos parámetros asociados a progresión maligna o entre 48-72 hs para proceder a su lisado total para la extracción de ARN o Proteínas. A partir del ARN total, mediante RT-qPCR se evaluará el perfil de expresión de genes pluripotenciales indicadores de la presencia de CSC, tales como Nanog, Sox2, Oct4, Sox9 y Slug en las líneas mencionadas y en sus oncoesferas derivadas. Asimismo, se evaluará por la misma técnica la expresión de los receptores retinoides RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  y  $\mathbb{X}$ . A partir de lisados totales de oncoesferas y monocapas se estudiará la expresión de ERK/pERK, AKT/ pAKT, Caspasas 3, 8 y 9 activadas, BcLx, BcL2, a través de Western Blot (WB). Eventualmente y dado el poco rendimiento proteico obtenido a partir de los lisados celulares, podrán analizarse expresión y localización subcelular de estas moléculas mediante Inmunofluorescencia (IF) y microscopía sobre monocapas celulares y oncoesferas ya sea fijadas en vidrios por cito-spin o cortes citológicos obtenidos a partir del material embebido en agar (ambos métodos permiten mantener la arquitectura de la oncoesfera y ha sido puesto a punto previamente en nuestro laboratorio con la colaboración del Dpto. de Patología).

Para evaluar el estado de activación de las vías de Wnt y NF-κB, A partir de lisados totales de oncoesferas y monocapas tratadas o no como se indicó previamente, se estudiarán la expresión de Wnt1, GSK3β, βCatenina, p65/NF-κB y P-NF- κB/p65, BAX y c-MYC (blancos de NF-κB) a través de Western Blots (WB) utilizando anticuerpos específicos. Algunas de estas detecciones requieren fraccionamiento celular previo al lisado. Para la detección de βCatenina se utilizará buffer saponina para la obtención de la fracción citosólica y para las detecciones nucleares se utilizará centrifugación diferencial siguiendo el protocolo de Abcam para separar las proteínas nucleares de las citoplasmáticas. Podrán, además, analizarse expresión y localización subcelular de estas moléculas mediante Inmunofluorescencias (IF) y microscopía sobre monocapas celulares y oncoesferas fijadas en vidrios por cito-spin.

Eventualmente se podrán realizar ensayos de genes reporteros para la actividad de NF-κB: las monocapas serán co- transfectadas transitoriamente con el Vector Reporter de Luciferasa Firefly NF-κB-RE-luc (pGL4.32) y el Vector Control de Luciferasa Renilla (pRL-TK) (Promega).

Exclusivamente para las líneas de mama: a partir de lisados totales de las células de las

mamosferas y de monocapas de cada una de las líneas celulares mamarias, se analizará por WB la expresión de HER2. Eventualmente, la expresión de este receptor podrá ser evaluada por la técnica de IF y el uso de microscopía confocal ya sea en monocapa o en mamosferas.

Evaluación de parámetros asociados a progresión maligna

Crecimiento: Se evaluará el número y diámetro de las oncoesferas en presencia o en ausencia de tratamientos, como parámetro de crecimiento. Se evaluará la capacidad de las células provenientes de esas oncoesferas (pretratadas o controles) de formar nuevas oncoesferas secundarias, como parámetro de auto-renovación.

Migración: Se evaluará utilizando cámaras Transwell con filtros de 8 μm donde se sembrarán células provenientes de las oncoesferas pretratadas.

Invasión: Se utilizarán cámaras Transwell con filtros de 8 μm recubiertas previamente con Matrigel (extracto soluble de membrana basal) donde se sembrarán células provenientes de las oncoesferas pretratadas

Capacidad clonogénica: La capacidad clonogénica se evaluará sembrando 1000 células provenientes de las oncoesferas pretratadas o controles en placas de 35 mm y se dejarán en condiciones normales de cultivo (cultivo adherente) por 7 días. Las células serán fijadas con formol neutro y se teñirán con Cristal Violeta para cuantificar el número de colonias (mayores a 20 células) bajo la lupa.

Actividad de enzimas proteolíticas solubles: La producción de proteasas se estudiará en medios condicionados proveniente de las oncoesferas pretratadas mediante zimografías en las que se medirá la actividad de metaloproteasas de matriz (MMP-2 y MMP-9).

Ensayo de metástasis experimentales in vivo: Modelo mamario 4T1 singeneico en BABL/c. Las células provenientes de las oncoesferas pretratadas o controles (1,5x10<sup>4</sup> células / 0,2 ml de medio de cultivo) serán inoculadas de forma endovenosa en ratones hembra BALB/c. Veintiún días después de la inoculación, los ratones serán sacrificados y se evaluará la incidencia de metástasis experimentales contabilizando el número de nódulos pulmonares. Se utilizarán cuatro grupos experimentales (n=10):

- células derivadas de mamoesferas control, en DMEM/DMSO (medio de cultivo y vehículo)
- células derivadas de mamoesferas tratadas en cultivo durante 48 hs con ATRA 1 $\mu$ M.
- células derivadas de mamoesferas tratadas en cultivo por 48 hs con Lapatinib 1 $\mu$ M.
- células derivadas de mamoesferas tratadas en cultivo 48 hs con la combinación de ATRA y Lapatinib (1 $\mu$ M de cada droga).

Alternativamente, se realizará el siguiente protocolo: con el objetivo de mantener un tratamiento sistémico previamente a la llegada de las células Stem tumorales al organo blanco de la metastasis, los animales recibirán un pellet de liberación lenta en forma subcutánea conteniendo o no 10 mg de ATRA, una semana antes de la inoculación endovenosa de las células provenientes de mamoesferas 4T1. Durante esta semana algunos grupos recibirán en forma oral y diaria (lunes a viernes) 2mg de Lapatinib por ratón, lográndose así, los mismos cuatro grupos experimentales detallados más arriba. Cabe aclarar que este procedimiento ya ha sido utilizado por nuestro grupo de trabajo durante el desarrollo de otros planes de investigación en años anteriores. Los pellets de ATRA liberan el retinoide durante aproximadamente durante tres semanas.

La dosis oral de lapatinib es la equivalente a la suministrada en la clínica y ajustada por peso. Cabe aclarar que los ensayos de toxicidad ya han sido realizados, tal se comentó más arriba en la sección “resultados preliminares”.

Ensayo de Progresión tumoral in vivo: una suspensión monocelular proveniente de mamosferas de 4T1 (1X103 células), será inoculada en forma ortotópica en ratones singenéticos. Al momento que el tumor se torne palpable, los animales recibirán un tratamiento con Lapatinib + Retinoide según el siguiente esquema: ATRA (10 mg/animal) administrado a través de un pellet subcutáneo durante 21 días a partir de la palpación del tumor. Nuestro grupo tiene experiencia en la administración y dosificación de estas drogas en animales y hemos establecido que el tiempo máximo de días de tratamiento que no produce síntomas de toxicidad es de 20. Lapatinib: será administrado en forma oral diariamente (2 mg por día) durante los 21 días. Alternativamente, los animales se operarán (a tumor palpable) a fin de lograr la resección del tumor y se comenzará el tratamiento una semana luego de la cirugía. Este esquema permitirá evaluar el efecto sobre la incidencia de recidivas y sobre la diseminación metastásica. Los ratones serán sacrificados 30 días después de la cirugía, para poder evidenciar las eventuales metástasis pulmonares características del tumor 4T1. En todos los casos se evaluará la tasa de crecimiento, el número y tamaño de las metástasis pulmonares y la histopatología del tumor. Contamos con la aprobación del CICUAL institucional.

Valoración de las células madre tumorales presentes en las muestras de pacientes de nuestra población en el IOAHR: Se utilizarán muestras de pacientes con cáncer de mama triple negativo (n= 20), Luminal A (n=40), Luminal B (n=40) y HER2+ (n=20) y con cáncer de pulmón no microcítico NSCLC (n= 50) y microcítico SCLC (n=20) del Biobanco de tejidos del Instituto de Oncología “A. H. Roffo” (IOAHR). El Biobanco de Tejidos conserva y provee de tejido tumoral viable libre de necrosis, con un alto grado de celulas tumorales. El material es supervisado por un médico patólogo en quirófano y además se realiza una tincion de hematoxilina/eosina en espejo para el archivo del Biobanco. El Biobanco Institucional posee en archivo los

consentimientos informados de cada uno de los pacientes. Los profesionales de este sector guardan a -80°C cubos de material quirúrgico de aprox. 0.5X0,5X0,5 cm. Para el lisado de estas muestras se procede a pasarlas por nitrógeno líquido para luego realizar una extracción con el reactivo de Trizol. El rendimiento de ARN total es de aprox. 1µg/µl. Hasta este punto las tareas son realizadas por los profesionales de este sector.

- Criterios de inclusión: muestras quirúrgicas provenientes de pacientes vírgenes de tratamiento del IOAHR que hayan sido diagnosticados por el Biobanco de Tejidos y el servicio de Patología con cáncer de mama en cualquiera de los subtipos antes mencionados o pulmón en los subtipos detallados.

- Criterios de exclusión: muestras provenientes de pacientes del IOAHR que hayan recibido algún tipo de tratamiento previo a la cirugía: quimioterapia, radioterapia o terapia dirigida.

Se procederá a la extracción de ARNm total de cada una de las muestras y a la cuantificación de la expresión de los genes: Nanog, Sox2, Oct4, Sox9, Slug, RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  a través de la técnica de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR).

Los datos obtenidos serán confrontados con los parámetros clínico-patológicos de las

historias clínicas de cada paciente: análisis multivariado. Contamos con la aprobación del Comité de Ética institucional (quien previamente obtiene la aprobación de la participación del Biobanco de Tejidos). El Comité Institucional ha aprobado en forma separada el protocolo que incluye muestras humanas de tumores mamarios del que incluye las muestras humanas de tumores de pulmón, dado que cada uno de ellos corresponde a tesis doctorales distintas.

## BIBIOGRAFIA

Instituto Nacional del Cáncer. Ministerio de Salud de la Nación.2018

Reya, T., et al., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001. 414(6859): p. 105-11

Li and Neaves. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*, 2006. 66(9): p. 4553-7 Bruttel VS, Wischhusen J. Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? *Frontiers in immunology*. 2014;5:360. PubMed PMID: 25120546. Pubmed Central PMCID: 4114188 Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010 Jan 1;16(1):45-55. PubMed PMID: 20028757. Pubmed Central PMCID: 2874875

Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell research*. 2007 Jan;17(1):3-14. PubMed PMID: 17179981

Colak S, Medema JP. Cancer stem cells--important players in tumor therapy resistance. *The FEBS journal*. 2014 Nov;281(21):4779-91. PubMed PMID: 25158828

Ono M, Kosaka N, Tominaga N, Yoshioka Y, Takeshita F, Takahashi RU, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Science signaling*. 2014 Jul 1;7(332):ra63. PubMed PMID: 24985346

Quintas-Cardama A, Grgurevic S, Rozovski U, Li P, Estrov Z, Cortes J. Detection of dormant chronic myeloid leukemia clones in the bone marrow of patients in complete molecular remission. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2013 Dec;13(6):681-5. PubMed PMID: 24060288. Pubmed Central PMCID: 4162086

Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell proliferation*. 2003 Oct;36 Suppl 1:59-72. PubMed PMID: 14521516

Mark M, Ghyselinck N, Chambon P. "Function of Retinoid Nuclear Receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006, 46:451-480.

Altucci L and Gronemeyer H. "The promise of retinoids to fight against cancer". *Nature Rev.* 2001, 1:181-193. Tighe AP, Talmage DA. "Retinoids arrest breast cancer cell proliferation: retinoic acid selectively reduces the duration of receptor tyrosine kinase signaling". *Exp Cell Res.* 2004, 301:147-157.

Wayne Szeto, Wen Jiang, David A. Tice, BonneeRubinfeld, Philip G. Hollingshead, Sharon E. Fong,

Debra L. Dugger, Thinh Pham, Daniel G. Yansura, Terence A. Wong, J. Christopher Grimaldi, Racquel T. Corpuz, Jennifer S. Singh, Gretchen D. Frantz, Brigitte Devaux, Craig W. Crowley, Ralph H. Schwall, David A. Eberhard, Luca Rastelli, Paul Polakis, and Diane Pennica. Overexpression of the Retinoic Acid-responsive Gene Stra6 in Human Cancers and Its Synergistic Induction by Wnt-1 and Retinoic Acid. *Cancer Research* 61, 4197-4205, May 15, 2001.

Prud'homme GJ. Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(19):2838-49. PubMed PMID: 22390767.

Genestier C., Wicinski J., Cervera N., et al. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle* 2009, 8 (20): 3297-3302.

OncoTargets and Therapy 2016:9 731-740

Guo, W., et al., Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell*, 2012. 148(5): p. 1015-28 Klein, C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer* 2009 9, 302-312.

Hosseini, Hedayatollah et al. "Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer." *Nature* (2016): 10.1038/nature20785. PMC. Web. 7 Sept. 2018.

Berardi, Flumian, Díaz Bessone, Cirigliano, Bal de Kier Joffe, Urtreger, and B. Todaro. Pharmacological inhibition of protein kinase C alpha (PKC $\alpha$ ) and all trans retinoic acid (ATRA) synergize to inhibit the proliferation, migration and cancer stem-like properties of a triple-negative mammary cancer model. *Proceedings: AACR Annual Meeting 2014*. 2014 6 April

Tang P, Tse GM. Immulohistochemical surrogates for molecular classification of breast carcinoma: a 2015 update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2016; 140:806-814.

Saha P., Nanda R. Concepts and targets in triple-negative breast cancer: resent results and clinical implications. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2016; 8 (5): 351-359.

Valachis A, Mauri D, Polyzos NP, Chlouverakis G, Mavroudis D, Georgoulias V. Trastuzumab combined to neoadjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast*. 2011 Dec;20(6):485-90. PubMed PMID: 21784637

Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary

stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*. 2008 Oct 16;27(47):6120-30. PubMed PMID: 18591932. Pubmed Central PMCID: 2602947

Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, et al. Real-world performance of HER2 testing-- National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002 Jun 5;94(11):852-4. PubMed PMID: 12048273

Ithimakin S, Day KC, Malik F, Zen Q, Dawsey SJ, Bersano-Begey TF, et al. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. *Cancer research*. 2013 Mar 1;73(5):1635-46. PubMed PMID: 23442322. Pubmed Central PMCID: 3600586.

Ignatiadis, M. et al. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PLoS One* 2011, 6, e15624. Hedayatollah Hosseini, Milan M. S. Obradović, Martin Hoffmann, et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cáncer. *Nature* 2017, doi:10.1038/nature20785

O. Arrieta, C.H. González-De La, E. Rosa, G. Aréchaga-Ocampo, T.L. Villanueva-Rodríguez, L. Cerón-Lizárraga,

M.E. Martínez-Barrera, M.Á. Vázquez-Manríquez, M.Á. Ríos-Trejo, N. Álvarez-Avitia, C. Rojas-Marín Hernández- Pedro, J. De La Garza, "Randomized phase II trial of all-trans-retinoic acid with chemotherapy basedon paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer", *J. Clin. Oncol.* 28 (21) (2010) 3463-3471

O. Arrieta, N. Hernandez-Pedro, M.C. Fernandez-Gonzalez-Aragon, D. Saavedra-Perez, A.D. Campos-Parra, M.A. Rios-Trejo, T. Cerón-Lizárraga, L. Martinez-Barrera, B. Pineda, G. Ordonez, A. Ortiz-Plata, V. Granados-Soto, J. Sotelo, Retinoic acid reduces chemotherapy-induced neuropathy in an animal model and patients withlung cancer,

*Neurology* 77 (10) (2011) 987-995

("Retinoic acid downregulates thiol antioxidant defences and homologous recombination while promotes A549 cells sensitization to cisplatin" Miranda Ramosaf Juciano Gasparottoaf Fabrício Figueiróab Amandade Fraga Diasab Diana Carolina Rostirollaaf Nauana Somensiaf Helen Taisda RosaafLucas KichGrunac Florencia MaríaBarbé- TuanacdDaniel PensGelainafJosé Cláudio FonsecaMoreiraaf Cellular Signalling 62 (2019) 109356

Duncan JS., et al. Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim. Biophys.* (2008). doi:10.1016/j.bbapap.2007.08.017.

The synthetic peptide CIGB-300 modulates CK2-dependent signaling pathways affecting the survival and

chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines". Stéfano M. Cirigliano, María I. Díaz Bessone, Damián E. Berardi, Carolina Flumian, Elisa D. Bal de Kier Joffé, Silvio E. Perea, Hernán G. Farina, Laura B. Todaro and Alejandro J. Urtreger. *Cancer Cell Int* 17:42 (2017)

Todaro et al, *Breast Cancer* 20, 4: P342 - 356 2013, Berardi et al, *Cellular Oncology* vol 38, issue 4, pp 289-305 2015).

Berardi, Díaz Bessone, Motter, Bal de Kier Joffé, Urtreger, Todaro. Involvement of Protein Kinase C  $\alpha$  and  $\delta$  activities on the induction of the Retinoic Acid System in mammary cancer cells". *Molecular Carcinogenesis* 2014 DOI: 10.1002/mc.2218.

## **Plan de trabajo**

**DOCENTE A CARGO: Dra. Catalina Lodillinsky**

**TÍTULO: Optimización de las condiciones de cultivo de células madre tumorales derivadas de pacientes con cáncer de mama: hacia su caracterización funcional y abordaje terapéutico**

### **RESUMEN**

El cáncer de mama es la principal causa de mortalidad oncológica en mujeres a nivel mundial (1,2). Su alta heterogeneidad se relaciona con la presencia de células madre tumorales (CMT), una subpoblación con capacidad de iniciar tumores, resistir tratamientos y favorecer recurrencia y metástasis. La eliminación o diferenciación de estas células constituye una estrategia terapéutica prometedora. Para evaluar nuevos compuestos dirigidos contra CMT, resulta fundamental trabajar no solo con líneas celulares, sino también con muestras derivadas de pacientes. En nuestro grupo, en el marco de un proyecto PIDAE del cual la Dra. Callero forma parte y que cuenta con aprobación del CEI, se propone estudiar la acción de dos fármacos con potencial efecto citotóxico sobre CMT aisladas de tumores mamarios humanos. No obstante, el cultivo de estas células a partir de muestras clínicas es técnicamente complejo debido a su baja frecuencia y la necesidad de condiciones específicas que conserven su fenotipo. Por ello, este plan de trabajo tiene como objetivo optimizar protocolos de cultivo tridimensional y/o en monocapa a partir de muestras de pacientes que favorezcan la expansión y caracterización funcional de CMT, permitiendo generar modelos experimentales más representativos para el estudio de nuevos tratamientos dirigidos a esta población celular.

### **ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE EL TEMA.**

El cáncer de mama (CM) continúa siendo el tumor más frecuente en mujeres a nivel mundial y una de las principales causas de mortalidad por cáncer. A pesar de los avances terapéuticos, un subgrupo de pacientes desarrolla enfermedad recurrente o metastásica, atribuida en parte a la presencia de células madre tumorales (CMTs). Estas subpoblaciones celulares se caracterizan por su capacidad de autorrenovación, resistencia a tratamientos y plasticidad fenotípica, lo que las convierte en un blanco clave para comprender la progresión tumoral y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (3-5). En las últimas décadas, se ha consolidado la noción de que las CMTs no solo están involucradas en la iniciación tumoral, sino también en procesos de invasión, metástasis y recaída. Sin embargo, una limitación recurrente en los estudios funcionales sobre estas células es la dificultad para establecer modelos *in vitro* representativos, robustos y clínicamente relevantes. Las CMTs derivadas de pacientes (Patient-Derived Cancer Stem Cells, P-CSCs) ofrecen un sistema más fiel para el estudio del comportamiento tumoral y la respuesta a drogas, pero su cultivo y expansión siguen siendo desafiantes (6-8). En este contexto, el presente proyecto propone abordar estos desafíos a través de un enfoque sistemático para optimizar las condiciones de cultivo de CMTs a partir de muestras clínicas. El trabajo del becario se centrará en identificar los medios, factores de crecimiento y condiciones fisicoquímicas que favorezcan el crecimiento, la viabilidad y el mantenimiento del fenotipo madre-tumoral, validando su identidad mediante ensayos fenotípicos y

moleculares.

Este enfoque se encuentra sólidamente alineado con el proyecto “**Identificación y caracterización de biomarcadores de células madre tumorales útiles para el diagnóstico de la patología oncológica**”, cuyo eje central es la investigación traslacional orientada a mejorar la estratificación y el tratamiento de pacientes con cáncer de mama. Uno de los objetivos estratégicos de este proyecto PIDAE es avanzar hacia modelos preclínicos más representativos que permitan explorar nuevas combinaciones terapéuticas dirigidas a subpoblaciones celulares específicas, como las CMTs.

La publicación internacional recientemente publicada por Piwocka et al. (9) aporta evidencia relevante sobre los factores que afectan el cultivo y la caracterización de CMTs en líneas celulares de cáncer de mama y tumores primarios. En dicho estudio, los autores comparan medios de cultivo y condiciones de cultivo tridimensional para evaluar la expresión de marcadores de CMTs, su capacidad de formación de esferas, y su respuesta a fármacos. Este trabajo destaca la necesidad de estandarizar y optimizar los protocolos experimentales, subrayando las limitaciones de los modelos tradicionales y validando la importancia de modelos derivados de pacientes. La propuesta del presente plan de trabajo se encuentra directamente alineada con estas conclusiones, incorporando dichos conocimientos para adaptar y validar protocolos propios en un contexto clínico local.

En resumen, el estado actual del conocimiento destaca la necesidad urgente de modelos preclínicos más representativos de las CMTs. El presente proyecto se inscribe plenamente en esta línea de investigación, abordando una problemática central del cáncer de mama desde un enfoque innovador, traslacional y con fuerte anclaje institucional en el marco del PIDAE. Su ejecución permitirá no solo consolidar capacidades técnicas locales, sino también abrir nuevas líneas de investigación en terapias dirigidas a CMTs y modelos personalizados, lo que fortalece la coherencia científica, metodológica y estratégica del conjunto del programa.

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR**

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea cuya progresión, recaída y resistencia a los tratamientos se encuentran estrechamente ligadas a la presencia de células madre tumorales (CMTs), una subpoblación con propiedades de autorrenovación, diferenciación multipotente y alta plasticidad fenotípica. Estas células contribuyen a la agresividad del tumor, a la evasión terapéutica y a la recurrencia pos tratamiento. En consecuencia, su estudio se ha convertido en un eje estratégico dentro de la oncología traslacional.

Sin embargo, la obtención y el mantenimiento *in vitro* de CMTs derivadas de pacientes sigue siendo un desafío, debido a su baja frecuencia, su fragilidad y a la ausencia de condiciones de cultivo estandarizadas que preserven su identidad funcional. En este marco, la optimización de protocolos para su aislamiento, expansión y caracterización representa una herramienta clave para avanzar en modelos celulares más representativos del comportamiento tumoral humano. Estos modelos son fundamentales no solo para estudios mecanísticos, sino también para evaluar la eficacia de compuestos terapéuticos dirigidos al compartimento CMT.

En este contexto, el presente proyecto busca avanzar en la consolidación de un

modelo experimental robusto basado en CMTs derivadas de pacientes, como plataforma para estudios funcionales y terapéuticos.

**Hipótesis:** Las condiciones de cultivo optimizadas permiten mantener la viabilidad, el fenotipo madre tumoral y la capacidad autorreplicativa de las células madre tumorales (CMTs) derivadas de pacientes con cáncer de mama, lo que posibilita su caracterización funcional y el análisis de la acción terapéutica de compuestos con probada capacidad citotóxica sobre esta subpoblación celular en modelos de líneas celulares.

## **OBJETIVO GENERAL**

Optimizar las condiciones de aislamiento y cultivo de células madre tumorales derivadas de pacientes con cáncer de mama con el fin de establecer modelos celulares funcionales para su caracterización biológica y la evaluación de compuestos terapéuticos dirigidos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Consolidar la formación del becario en técnicas iniciales y avanzadas de cultivo celular, incluyendo el manejo de cultivos de líneas celulares, cultivos primarios y cultivo en 3D (mamosferas).
2. Establecer cultivos primarios de CMTs a partir de muestras tumorales humanas, evaluando diferentes condiciones de cultivo (tipos de medio, factores de crecimiento y condiciones de cultivo tridimensional) para maximizar su viabilidad, mantenimiento del fenotipo y capacidad autorrenovativa.
3. Evaluar la presencia de CMTs en las muestras mediante análisis de dilución límite extrema y análisis morfológico de mamosferas.

## **METODOLOGÍA**

Recolección de muestras: Como parte del presente proyecto, se trabajará con muestras tumorales primarias obtenidas de pacientes con cáncer de mama operados en nuestra institución. La recolección del material biológico se realizará en el contexto

de una intervención quirúrgica programada y con consentimiento informado previamente firmado. La coordinación se llevará a cabo junto con el equipo del Departamento de Mastología, y el material será entregado por el patólogo interviniente, siempre que se disponga de tejido excedente al requerido para diagnóstico y conservación en biobanco. Las muestras se recolectarán en condiciones asépticas, en medio DMEM-F12 frío complementado con un cóctel antibiótico-antimicótico, y serán trasladadas de inmediato al Área de Investigación para su procesamiento. Se incluirán pacientes con tumores de mama resecables o biopsiables, independientemente de si recibieron tratamiento previo, excluyéndose a quienes no otorguen consentimiento para donar la muestra y a mujeres embarazadas. El manejo de los datos personales se realizará bajo estricta confidencialidad y codificación, en cumplimiento con la Ley Nacional 25.326. El protocolo ha sido presentado al Comité de Ética Institucional para su evaluación.

Establecimiento de cultivo primario: A partir de las muestras recolectadas, se procederá al establecimiento de cultivos primarios mediante la disgregación mecánica del tejido tumoral y posterior digestión enzimática utilizando pronasa.

Las suspensiones celulares obtenidas se emplearán para el desarrollo de cultivos en monocapa, así como para la formación de estructuras tridimensionales tipo esferas (mamosferas) y esferoides.

Determinación de la frecuencia de CMTs por ELDA: Se realizará un análisis mediante dilución limitante extrema, sembrando entre 5 y 200 células viables por pocillo en placas de 96 pocillos, bajo condiciones específicas que favorezcan la formación de esferas. Cada punto experimental se llevará a cabo por sextuplicado. Se registrará cuántos pocillos generan esferas en cada concentración celular, y los datos serán procesados utilizando el software ELDA (10), que permite estimar la frecuencia de células madre tumorales, definida como la proporción de células madre respecto del total de células presentes en la muestra analizada.

Optimización de las condiciones de cultivo en monocapa y para formar mamosferas: Inicialmente, para el cultivo en monocapa, las células se sembrarán en medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino (20%), EGF, insulina e hidrocortisona, siguiendo el protocolo propuesto como más efectivo por Piwocka et al. (9), quienes demostraron que estas condiciones favorecen la viabilidad celular y permiten mayor número de pasajes en cultivos primarios de cáncer de mama. Como parte esencial del proyecto, se aplicará una estrategia sistemática de **optimización de condiciones de cultivo**, basada en los resultados del trabajo de Piwocka et al. (9). Se evaluarán distintas combinaciones de condiciones, incluyendo tipos de medio (DMEM/F12, IMDM, RPMI), concentración de suero, adición de factores tróficos (EGF, FGF, L-glutamina, insulina, hidrocortisona, anfotericina). Además, en caso de bajo eficiencia de cultivo primario, se incorporará una evaluación comparativa de protocolos de disagregación tisular con diferentes combinaciones de colagenasa y pronasa, con tiempos de digestión ajustables. La eficiencia de cada método se evaluará mediante el monitoreo de la morfología, la velocidad de adherencia, la viabilidad celular y la capacidad de pasaje. Para enriquecer y evaluar la capacidad autorreplicativa de la población CMT, se establecerán cultivos de mamosferas. Para ello se optimizará el número de células sembradas (entre 1000 y 10000 células por pocillo) en placas de 12 pocillos bajo condiciones estándar para este tipo de estructura que incluyen la presencia de B27 y EGF. Posteriormente, se realizará un seguimiento detallado de la morfología, el número y el tamaño de las mamosferas generadas mediante microscopía.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
2. Instituto Nacional del Cáncer. (2024). Mortalidad por cáncer de mama en mujeres.
3. Pascussi JM. Mécanismes de résistance des cellules souches cancéreuses aux chimiothérapies [Mechanisms of resistance of cancer stem cells to chemotherapy]. *Bull Cancer*. 2017 Dec;104(12):1080-1084. French. doi: 10.1016/j.bulcan.2017.10.013. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29173972.
4. Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330),

314-322. <https://doi.org/10.1038/nature09781>

5. Clarke, M. F., Dick, J. E., & Dirks, P. B. (2006). Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, 66(19), 9339–9344. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126>

6. Sueoka S, Kai A, Kobayashi Y, Ito M, Sasada S, Emi A, Gotoh N, Arihiro K, Nakayama K, Okada M, Kadoya T. Diversity of ER-positive and HER2-negative breast cancer stem cells attained using selective culture techniques. *Sci Rep*. 2025 Mar 10;15(1):8257. doi: 10.1038/s41598-025-90689-7. PMID: 40064935; PMCID: PMC11894160.

7. Uysal O, Sevimli T, Sevimli M, Gunes S, Sariboyaci AE. Cell and tissue culture: the base of biotechnology. In: Omics technologies and bio-engineering: towards improving quality of life. Vol. 1. Elsevier Inc.; 2018. p. 391–429. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00017-8>. 15.

8. Mitra A, Mishra L, Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol*. 2013;31(6):347–54.

9. Piwocka O, Musielak M, Ampuła K, Piotrowski I, Adamczyk B, Fundowicz M, Suchorska VM and Malicki J. Navigating challenges: optimising methods for primary cell culture isolation. *Cancer Cell International*, 2024. p.24-28. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03190-4>.

10. Hu Y, Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods*. 2009 Aug 15;347(1-2):70-8. doi: 10.1016/j.jim.2009.06.008. Epub 2009 Jun 28. PMID: 19567251.

## Plan de trabajo

**DOCENTE A CARGO: Dra. Catalina Lodillinsky**

**TÍTULO: Evaluación de la implicancia de blancos moleculares en la transición de tumores de mama de un estadio *in situ* a un estadio invasor.**

## OBJETIVO GENERAL

En proyecto se propone dilucidar mecanismos moleculares implicados en la progresión temprana del cáncer de mama con el objetivo de identificar nuevos marcadores que puedan ser blancos terapéuticos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Basado en la expresión diferencial de la metaloproteasa de membrana de tipo I (MT1-MMP) en tumores después de la inoculación intraductal de la línea celular humana MCF10DCIS.com en ratones inmunosuprimidos se aislaron

2 poblaciones celulares para luego realizar un análisis del transcriptoma mediante ARNseq de manera comparativa. Los datos se compararon con el transcriptoma de un conjunto de carcinomas ductales *in situ* (DCIS) humanos de alto grado descrito anteriormente, donde encontramos 3 genes en común: la proteína SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine, también denominada osteonectina), la enzima COX-2 (ciclooxygenasa 2 ó PTGS2) y CLCA2 (Chloride Channel Accessory 2) aumentados al mismo tiempo en los DCIS humanos y en la población MT1-MMPhigh. El hecho de que estos genes estén asociados con un fenotipo más agresivo de carcinoma ductal *in situ* los coloca en un lugar relevante a ser

considerados como blancos a evaluar en la antesala al estadio invasor del carcinoma mamario. El presente proyecto se basa en tres objetivos específicos que abarcan la utilización de herramientas *in vitro* e *in vivo* para el estudio de la funcionalidad de estos genes y enfocados en dilucidar el mecanismo molecular que los nuclea y el estudio de los mismos en muestras de pacientes de nuestro Instituto:

**Hipótesis:** A nivel de mecanismo molecular, hipotetizamos que SPARC actúa como mediador de TGF-B1 y que, a través de un sistema de regulación recíproca, el receptor del TGF-B1 (TGFBR1) es activado por SPARC. Ambos eventos impactarían en mecanismos de invasión promoviendo la transición de tumores de un estadio *in situ* hacia tumores invasores.

**Objetivo:** Evaluar el estado de activación de la vía del TGF-B, la expresión de SPARC, MT1-MMP, CLCA2, en células tumorales humanas y murinas tanto en presencia de SPARC recombinante como luego del silenciamiento de SPARC endógeno, inhibiendo o no al TGFBR.

## ACTIVIDADES Y METODOLOGIA

**Demostrar que SPARC actúa como mediador de TGF-B1 y que, a través de un sistema de regulación recíproca, el receptor del TGF-B1 (TGFBR1) es activado por SPARC. Ambos eventos impactan en mecanismos de invasión promoviendo la transición de tumores de un estadio *in situ* hacia tumores invasores**

Nos proponemos evaluar la activación de la vía del TGF-B1 midiendo el estado de fosforilación de SMAD 2/3 y la actividad luciférica usando un sistema de gen reportero CAGA-LUC que responde a SMAD 2, la expresión de SPARC, MT1-MMP, CLCA2, en presencia o ausencia de un inhibidor farmacológico del TGFRI como el SB431542. Por otro lado, también mediremos los niveles de expresión de MT1-MMP, COX-2 y CLCA2 nivel de ARNm y proteína en estas células silenciadas o no para SPARC. Para este objetivo utilizaremos tanto la línea de cáncer de mama humano MCF10DCIS.com como la murina LM38-LP.

## METODOLOGÍA: TÉCNICAS ESPECÍFICAS A UTILIZAR.

**Líneas celulares:** Se utilizará la línea celular murina LM38-LP, la cual se cultivará en medio DMEM/F12 suplementado con glutamina 2 mM y 10% de SFB, mantenidas en estufa gaseada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y la línea celular MCF10DCIS.com que crece en medio DMEM:Nutrient Mix F-12 y suero de caballo.

**Ensayos de silenciamiento:** Para llevar a cabo el silenciamiento transiente usaremos MISSION® esiRNA targeting human SPARC (EHU002941-20UG) y MISSION® esiRNA targeting mouse Sparc (EMU088951-20UG) y como control negative SIC001-1NMOL 1 nmoL -MISSION(R-) SIRNA UNIVERSAL NEGATIVE usando - MISSION® siRNA Transfection Reagent. De la misma manera con la secuencia correspondiente se procederá para el silenciamiento de los otros genes.

Para generar las líneas estables silenciadas para los genes propuestos en el objetivo 1, se trabajará con vectores obtenidos a partir de *Mission shRNA de Sigma*. En el caso del silenciamiento transitorio, se trabajará con los RNAi provistos también por *Sigma*. El procedimiento de silenciamiento se llevará a cabo según.

**Western Blot:** Se llevará a cabo el procedimiento convencional a partir de lisados totales. Las proteínas obtenidas serán cuantificadas mediante el método de

Bradford, posteriormente sembradas en geles de poliacrilamida y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Los distintos marcadores serán revelados con anticuerpos específicos, usando un control de carga como B-actina o Tubulina.