



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia**

**TESIS DOCTORAL EN BIOLOGÍA**

**La participación de p300, cofactor transcripcional  
con actividad acetiltransferasa, en la progresión del  
cáncer de mama**

**Bioquímica María Eugenia Fermento**

**Director: Dr. Alejandro Carlos Curino**

**Co-Director: Dra. María Marta Facchinetti**

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER - INIBIBB - CCT BAHÍA BLANCA

**Bahía Blanca**

**Argentina**

**2014**

# PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología del Cáncer del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), integrante del centro Científico y Tecnológico Bahía Blanca (CONICET-UNS) en el período comprendido entre el 21 de julio de 2008 al 09 de diciembre de 2014, bajo la dirección del Dr. Alejandro Carlos Curino, Investigador Adjunto del CONICET y la co-dirección de la Dra. María Marta Facchinetti, Investigadora Adjunta del CONICET.

El presente trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por el CONICET (PIP 112-201101-00556), por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-PICT 2012-1595), por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC 2013) y por la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (PGI 24/B174, 24/B172, 24/B164).



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ....../....../..... , mereciendo la calificación de .....(.....)

# DEDICATORIA

***A Bruna Cappa***

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco al INIBIBB, por el soporte institucional, a la CIC y al CONICET por financiar mis estudios de posgrado y a la UNS por brindarme la posibilidad de estudiar una carrera de posgrado.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Alejandro Carlos Curino y a mi co-directora, la Dra. María Marta Facchinetti por haberme brindado un lugar en su laboratorio, por su confianza, capacidad y experiencia científica.

A la Dra. Myriam Nuñez por brindar su tiempo y experiencia en el asesoramiento estadístico.

Al Dr. Cristian Vitale por su ayuda con el inhibidor de p300.

Al Bqco. Alejandro López Romero, por su buena predisposición para ayudarme con la citometría de flujo.

A los Médicos Patólogos del Hospital Penna, Julián Arévalo y Jorge Blasco por su ayuda con los diagnósticos y el material empleado en esta tesis.

A los Médicos Oncólogos del Hospital Italiano, Alejandro Ferro y Lucila Gonzalez Donna por su aporte de material proveniente de biopsias tumorales humanas y la información clínica e histopatológica correspondiente para el desarrollo de esta tesis.

Al equipo docente de la cátedra de Anátomo-Histología por acompañarme desde los inicios de mi docencia universitaria.

Al personal de apoyo del INIBIBB, del CERZOS y del IADO, en especial a Edgardo, Susana, Beatriz y Edgar por haberme ayudado cada vez que salí corriendo por un ensayo.

Al Médico Oncólogo Juan Eduardo Pérez por haberme estimulado y mostrado el camino de la ciencia.

A mis compañeros y ex - compañeros de laboratorio, Luciano, Maxi, Debo, Sil, Juli, Eli, Ariel, Julián, Diego y Nancy por la ayuda que me brindaron, por su buena predisposición y por la calidad humana.

A mis amigas, Emilia, Fabiana, Majo, Daniela, Caro, Yanina, Débora por acompañarme y ayudarme en las buenas y no tan buenas.

A mi cuñado Guille que me ayudó cada vez que tenía un problema técnico.

A mi cuñada Vir con quien más de una vez discutí los embrollos de la ciencia y no tan ciencia.

A mis sobrinos Lauti y Mili por aguantar a la tía científica.

A mis hermanos, Vero y Pablo por ser los mejores hermanos cómplices y confidentes.

A mis papás, Vicente y Stella, a quienes les debo todo lo que soy.

A Juan por ser mi compañero de vida incondicional.

A Bruna, la persona que más amo en el mundo, por acompañarme en cada paso que doy.

## RESUMEN

Recientemente ha comenzado a surgir evidencia que relaciona a p300 con el cáncer. Sin embargo, aún no está claro cuál es el rol de la proteína en esta patología ya que hay evidencia que indica que puede funcionar como un supresor tumoral o como una oncoproteína. La información disponible sobre la relación entre p300 y el carcinoma mamario está basada generalmente en estudios en líneas celulares siendo escasos los trabajos en modelos animales o utilizando biopsias humanas.

En este trabajo de tesis se pudo demostrar que la inhibición de la actividad acetilasa de p300 disminuye la supervivencia celular de las líneas LM3 y MDA-MB-231 e induce apoptosis en la línea celular LM3. Además se demostró que dicha inhibición disminuye la migración celular de las líneas LM3 y MDA-MB-231 y disminuye la invasión celular y la formación de lamelipodios en la línea celular LM3.

En el modelo murino de trasplante singeneico de células LM3 se demostró que la inhibición de p300 reduce la carga tumoral, la invasión a la cavidad abdominal y el número de metástasis pulmonares. La reducción del tamaño tumoral fue acompañada de una disminución del índice mitótico y de los niveles de Ki-67 y de un incremento de la expresión de Bax.

Al estudiar la expresión de p300 en el modelo murino transgénico MMTV-PymT y en el de carcinogénesis inducida con DMBA en rata se observó que p300 se encuentra altamente expresado y en una localización citoplasmática en las células del tumor comparado con las de la glándula mamaria normal. Además se observó que parte del p300 citoplasmático se encuentra en estructuras con características de agregomas en las células tumorales de un cultivo primario derivado de este último modelo animal, pero no en las células normales del mismo cultivo.

En biopsias humanas de carcinomas mamarios se ha podido demostrar una mayor expresión de p300 en tejidos tumorales que en las zonas histológicamente normales adyacentes al tumor y que en el tejido mamario no maligno. También se detectó la inusual localización citoplasmática de p300 en los tejidos malignos y se pudo demostrar que esta localización se asocia con un menor tamaño tumoral, menor tasa de recaída y mayor supervivencia global de las pacientes y en los tumores triple negativos también con menor estadio tumoral.

En conjunto, los resultados de esta tesis sugieren que la acción oncogénica de p300 se realiza en el núcleo a través de su acción sobre la regulación de la transcripción génica y que al ser trasladado al citoplasma esta acción no puede realizarse porque está fuera del núcleo, porque además en el citoplasma es degradado y/o secuestrado en agregomas y posiblemente también por que ejerce nuevas funciones específicas de su ubicación citoplasmática que pueden tener efectos antitumorales. También indican que la localización de p300 puede ser de potencial interés como factor pronóstico y señalan la necesidad de continuar investigando los mecanismos celulares y moleculares que la desregulación de esta proteína podría estar afectando, contribuyendo así al desarrollo del cáncer de mama.

## ABSTRACT

Recently, an increasing body of evidence indicates that p300 could play a role in cancer. Nonetheless, the role of the protein in this disease remains unclear, since there is evidence indicating that it can function both as a tumor suppressor and as an oncoprotein. The available information about the relationship between p300 and breast carcinoma is usually based on studies in cell lines although there have been few studies using animal models or human biopsies.

In this thesis we demonstrated that the inhibition of the p300 acetyltransferase activity decreases cellular viability in LM3 and MDA-MB-231 cell lines and induces apoptosis in LM3 cell line. Furthermore, we demonstrated that p300 inhibition reduces cellular invasion in LM3 and MDA-MB-231 cell lines and decreases the invasiveness and lamellipodium formation in LM3 cells.

In a syngeneic murine model of subcutaneous transplantation of LM3 cells, we demonstrated that inhibition of p300 reduces tumor burden, tumor invasion into the abdominal cavity and lung metastases. This reduction in tumor burden was accompanied by a decrease in the mitotic index and Ki-67 levels and an increase in Bax expression.

When we have studied the expression of p300 in the MMTV-PyMT transgenic murine model and in the DMBA-induced rat model, we observed stronger expression and a cytoplasmic localization in the tumor cells in comparison with normal mammary glands. In addition, we have observed that cytoplasmic p300 is partially localized in aggresome-like structures in tumor- but not in normal mammary gland-derived primary cell cultures from the rat animal model.

Moreover, the analysis of p300 expression in human breast cancer samples showed that p300 immunoreactivity is significantly higher in the cancerous tissues than in the non-malignant mammary tissues and in the histologically normal adjacent tissues. Interestingly, p300 was observed in the cytoplasm, and

the rate of cytoplasmic p300 was higher in breast cancer than in non-tumor tissues. Importantly, we found that cytoplasmic localization of p300 is associated with a reduced tumor size, lower recurrence rates and an increase in the overall survival time of patients. Furthermore, in triple negative breast cancer cytoplasmic p300 is also associated with lower tumor stage.

Together, the results obtained in this thesis suggest that p300 acts as an oncogene when localized in the nucleus through its action upon the regulation of gene transcription. When p300 is translocated to the cytoplasm, its oncogenic action cannot be performed because it is outside of the nucleus, because it is degraded and/or sequestered in aggresomes and probably also because it may exert cytoplasmic specific functions which might have antitumor effects. Also, the results obtained in this thesis suggest that p300 localization could be potentially interesting as a prognostic factor and indicate the necessity to continue studying the cellular and molecular mechanisms in which the p300 is involved and whose deregulation could contribute to breast cancer development.

# ABREVIATURAS

AB avidina biotina  
ADN ácido desoxirribonucleico  
AF-2 función de activación 2  
Akt Proteína quinasa B  
AV anexina V  
ANOVA análisis de la varianza  
APS amonio persulfato  
ARN ácido ribonucleico  
ARNm ácido ribonucleico mensajero  
AUC área debajo de la curva  
BME  $\beta$ -Mercaptoetanol  
BR bromodominio  
BRCA1 cáncer de mama 1  
BSA suero albúmino bovino  
 $\text{CaCl}_2$  cloruro de calcio  
CBP proteína de unión a CREB  
CCND1 ciclina D1  
CCNE ciclina E  
cDNA ácido desoxirribonucleico complementario  
CH cisteína-histidina  
CK citoqueratina  
CM carcinoma mamario  
 $\text{CO}_2$  dióxido de carbono  
COX2 ciclo-oxigenasa 2  
CREB sitio de union de respuesta al AMPc'  
CtBP1 C-terminal-binding protein 1  
DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol  
DCIS carcinoma ductal in situ  
7,12-DMBA 7,12-dimetilbenza- $\alpha$ -antraceno (7,12-DMBA)  
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMSO dimetil sulfóxido

DNase desoxiribonucleasa  
dNTP deoxinucleótido trifosfato  
DTT ditioneitol  
ECL electroquimioluminiscencia  
EDTA etilen-diamintetra-ácido acético  
E1A *adenovirus early region 1A*  
EGFR receptor del factor de crecimiento epidérmico  
FACS fluorescence-activated cell sorter analysis  
FAT factor acetil transferasa  
FW *foward*  
GH grado histológico  
GMNM glándula mamaria no maligna  
GN grado nuclear  
h horas  
H&E hematoxilina y eosina  
HAT histona acetil transferasa  
HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-piperazínetanosulfónico)  
HER-2/Neu/ErbB2 receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2  
H2O<sub>d</sub> agua destilada  
HIF-1 factor inducible por hipoxia 1  
HDAC6 histona deacetilasa 6  
HPV Virus del Papiloma Humano  
h-TERT telomerasa transcriptasa inversa  
IARC Internacional Agency for Research on Cancer  
IDC carcinoma ductal invasivo  
IF inmunofluorescencia  
ILC carcinoma lobulillar invasivo  
IgG-HRP Horseradish Peroxidase-Conjugated Antibodies  
IHQ inmunohistoquímica  
IM índice mitótico  
INC Instituto Nacional del. Cáncer  
IP ioduro de propidio  
IRS *score* inmunoreactivo  
K Lisina

KAT lisina acetil tranferasa  
LCIS carcinoma lobulillar in situ  
LOH pérdida de heterocigosidad  
M extensión de las metástasis  
MLH1 mutL homolog 1  
MMTV virus tumoral mamario murino  
N glándula mamaria normal  
N *status* de los ganglios linfáticos  
NaCl cloruro de sodio  
ND no disponible  
NF-Kappa-B factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas  
Nrf2 NFE2-related factor 2  
OMS organización mundial de la salud  
p16 inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina  
p21<sup>Cip1</sup> Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1<sup>a</sup>  
p27<sup>kip1</sup> inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina  
p300 Proteína de unión a E1A  
PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida  
PBS buffer fosfato salino  
PCR reacción en cadena polimérica  
PCNA Antígeno nuclear de proliferación celular  
PFA para formaldehído  
Rb retinoblastoma  
pRB proteína del retinoblastoma  
PGE2 prostaglandina E2  
Pynt antígeno T medio también de polioma  
PVDF polifluoruro de vinilideno  
RA receptor androgénico  
RE receptor estrógeno  
RB reactivo de Bradford  
RH receptores hormonales  
RhoA miembro A de la familia homóloga a Ras  
RP receptor de progesterona

RPMI Roswell Park Memorial Institute  
Rpm revoluciones por minuto  
RT transcriptasa reversa  
RT-qPCR reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa  
RV *reverse*  
SD desviación estándar  
SDS duodecil sulfato de sodio  
SFB suero fetal bovino  
SKP2 proteína quinasa 2 asociada a la fase S  
SIVER Sistema de Vigilancia Epidemiológica y Reporte  
Sp1 proteína específica 1  
STAT1 Transductor de señal y activador de la transcripción 1  
T tumor  
TAE tris acetato EDTA  
TEMED N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina  
TN triple negativo  
TNM (T) tumor (N) ganglios (M) metástasis  
TRIS tris (hidroximetil) amino metano  
TritonX-100 octil fenoxi polietoxietanol  
Tween-20 polioxietileno (20) sorbitan monolaurato  
UV ultra violeta  
V vehículo  
VV56 Ácido 2-(3-(3, 4-Diclorobenzoyloxi) fenoxi) pentadecanoico  
VV59 ácido 2-(3-(3,4-diclorobenzoyloxi) fenoxi) hexadecanoico  
WB Western blot  
WST-1 [2-(4-Iodofenil)-3- (4-nitrofenil)-5- (2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium]  
YB-1 Y box binding protein 1  
ZAN zona adyacente normal  
ZT zona tumoral  
ZAH zona adyacente hiperplásica  
ZEB1 Zinc finger E-box-binding homeobox 1

# ÍNDICE

<b>PREFACIO</b> .....	2
<b>DEDICATORIA</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	17
Una breve introducción al cáncer .....	17
Una introducción a la proteína p300 .....	21
La relación entre p300 y el cáncer .....	25
Breve descripción del carcinoma mamario .....	30
La relación entre el p300 y los carcinomas mamaros .....	35
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	41
Hipótesis .....	41
Objetivo General.....	41
Objetivos Específicos .....	41
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	44
Inhibidores de p300 .....	44
Inhibidor de proteosoma .....	44
Inhibidor de la formación de agresomas.....	44
Líneas celulares.....	44
Estudio de la supervivencia celular: ensayo WST-1 y conteo de células en cámara de Neubauer .....	45
Ensayo de migración celular.....	46
Ensayo de Invasión Celular .....	47
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	47
Análisis de apoptosis por microscopía y por citometría de flujo.....	48
Análisis por microscopía .....	48
Análisis por citometría de flujo .....	49
Inmunofluorescencia (IF) .....	50

Células tratadas con el inhibidor de p300 .....	50
Células tratadas con el inhibidor MG132 y tubacina. ....	51
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS – PAGE) y Western Blot.....	52
Preparación de lisados celulares .....	52
Medición de la concentración de proteínas .....	52
Preparación de las muestras.....	52
Electroforesis .....	53
Transferencia a membrana de PVDF .....	53
Inmunodetección de proteínas .....	54
Cuantificación de ARNm por PCR en tiempo real cuantitativa .....	55
Oligonucleótidos.....	55
Aislamiento del ARN .....	55
Preparación del ADN complementario (cDNA) .....	56
PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) .....	57
Cuantificación y pureza de los ácidos nucleicos .....	57
Electroforesis en gel de agarosa .....	58
Modelos animales.....	58
Modelo de carcinogénesis química de mama en ratas Sprague Dawley ..	58
Modelo murino transgénico MMTV-PymT .....	59
Modelo de implante subcutáneo de células LM3 en ratones singeneicos BALB/C .....	60
Técnicas Histológicas .....	61
Procesamiento de órganos y tumores para histología .....	61
Evaluación del índice mitótico .....	62
Inmunohistoquímica (IHQ) .....	63
Evaluación de la inmunomarcación.....	64
Biopsias de neoplasias humanas .....	64
Análisis estadístico .....	65
<b>RESULTADOS</b> .....	67
La inhibición de p300 disminuye la supervivencia celular de las líneas LM3 y MDA-MB-231 pero no afecta la de las líneas LM05e y T47D. ....	67
La inhibición de p300 induce apoptosis en la línea celular LM3. ....	69
La inhibición de p300 disminuye la migración celular de las líneas LM3 y MDA-MB2-31, pero no afecta la migración celular de las líneas LM05e y T47D.....	73
La inhibición de p300 disminuye la invasión celular y la formación de lamelipodios en la línea celular LM3.....	76

La inhibición de p300 reduce la carga tumoral, la invasión a la cavidad abdominal y el número de metástasis pulmonares en un modelo murino de carcinoma mamario. ....	79
La inhibición de p300 induce un aumento de la localización citoplasmática de p300 en las células LM3 y en el modelo de implante subcutáneo de células LM3 en ratones BALB/c. ....	84
Estudio de la expresión de p300 en el modelo murino transgénico MMTV-PymT y en el de carcinogénesis inducida con DMBA en rata. ....	86
Parte del p300 citoplasmático se encuentra en estructuras con características de agresomas en las células tumorales en cultivo. ....	90
Estudios de la expresión de p300 en biopsias de carcinomas mamarios humanos. ....	96
Estudios de correlación de la expresión de p300 en biopsias humanas de carcinomas mamarios con datos clínicos e histopatológicos. ....	101
Estudios de la expresión de p300 en biopsias de carcinomas mamarios humanos triple negativos. ....	108
Estudios de correlación de la expresión de p300 con datos clínicos e histopatológicos en biopsias humanas de carcinomas triple negativos. ....	110
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>114</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>121</b>
<b>PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS</b> .....	<b>143</b>
Publicaciones. ....	143
Premios. ....	143
Trabajos seleccionados para simposios .....	143
Presentaciones a congresos. ....	144

# INTRODUCCIÓN

## Una breve introducción al cáncer

La transformación maligna y la progresión tumoral son procesos de varias etapas sucesivas que distan de estar completamente comprendidos. La investigación en el área de la biología del cáncer está demostrando que esta enfermedad es una acumulación clonal de células que presentan una sucesión de alteraciones genéticas y epigenéticas en los circuitos que regulan su comportamiento normal. Estas alteraciones llevan a que las células adquieran una serie de capacidades necesarias para transformarse en células cancerosas y completar la progresión tumoral. Así, de acuerdo a la hipótesis de las “capacidades adquiridas” (Hanahan & Weinberg, 2011) se ha postulado que es necesario que las células malignas adquieran ocho capacidades y dos características facilitadoras para generar un tumor y completar la progresión del cáncer (figura 1).



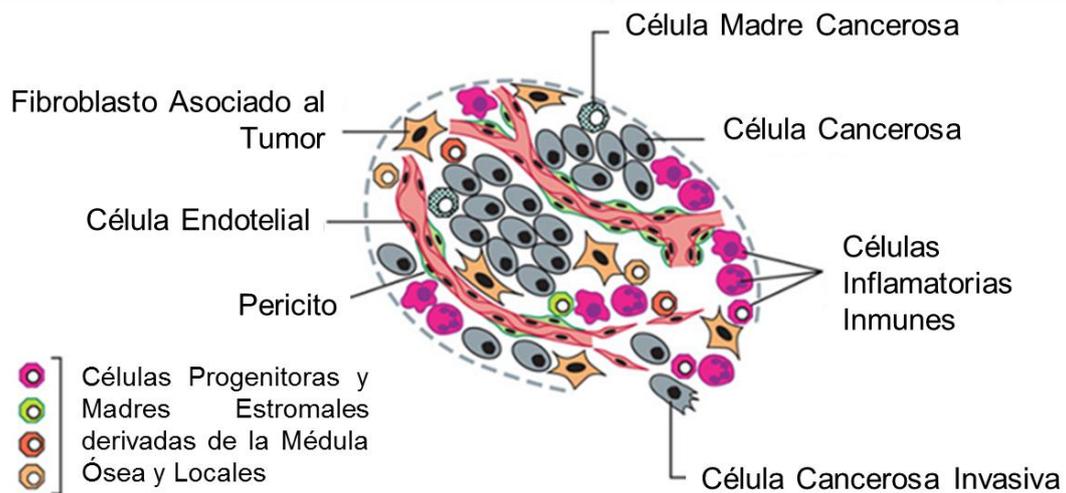
**Figura 1. Capacidades adquiridas y características facilitadoras que llevan al desarrollo completo del cáncer.** Tomado y adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Las ocho capacidades incluyen: activación anormal y sostenida de señales proliferativas, evasión de señales supresoras del crecimiento y de la proliferación celular, evasión de la apoptosis, adquisición de inmortalidad

replicativa, inducción de angiogénesis, reprogramación del metabolismo energético, evasión de la respuesta inmune y activación de los mecanismos de invasión y metástasis. Las características facilitadoras son la inestabilidad genética, la cual provee la diversidad genética que acelera la adquisición de las ocho capacidades anteriores, y la inflamación que actúa como un importante promotor que facilita la adquisición de las mismas (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011).

Se propone que la adquisición de estas capacidades es debida a la mutación de determinados genes y que los tumores progresan de ser lesiones benignas a malignas al adquirir una serie de mutaciones en el tiempo. Pero, ¿cuántos genes se encuentran mutados en un cáncer humano típico? En tumores sólidos derivados de colon, mama, cerebro o páncreas, se ha observado que un promedio de 33 a 66 genes presenta mutaciones somáticas que se supone que alteran sus productos proteicos. De estas mutaciones hay algunas que intervienen activamente en proveer una ventaja selectiva para el crecimiento (llamadas mutaciones conductoras o “driver”) y otras que no tienen efecto sobre el proceso neoplásico (llamadas mutaciones pasajeras o “passenger”) (Vogelstein et al, 2013).

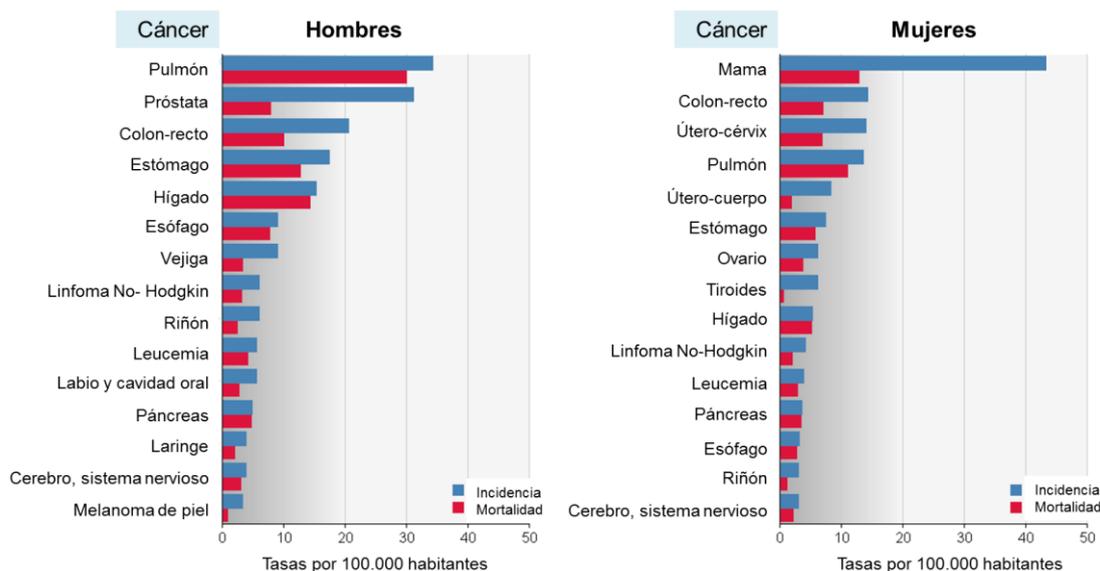
Sin embargo, los tumores están constituidos por algo más que grupos de células que proliferan descontroladamente debido a la adquisición de las capacidades anteriormente descritas. En realidad son tejidos complejos compuestos por diferentes tipos de células que participan en interacciones heterotípicas (figura 2). Durante la última década abundante evidencia experimental ha reafirmado este concepto de la importancia de la interacción de todas las células de una masa tumoral, lo que se conoce como “microambiente tumoral” y ha dado origen a reconocer a los tumores como órganos cuya complejidad puede exceder aún la de los órganos de un individuo sano (Hanahan & Weinberg, 2011).



**Figura 2. Las células del microambiente tumoral.** Tomado y adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

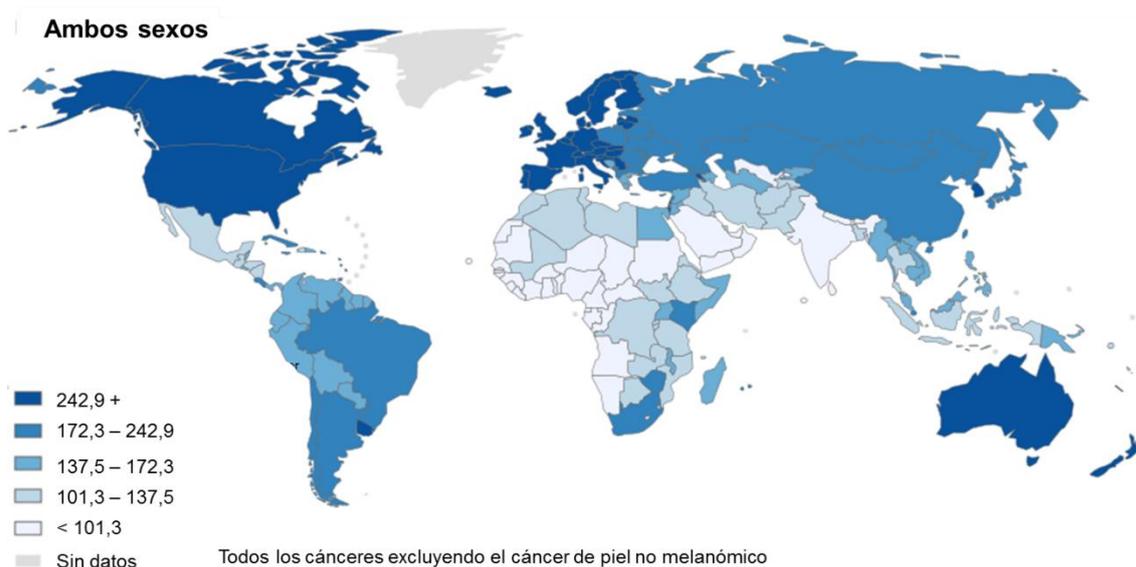
Sin embargo, el conocimiento de esta red de interacciones entre las diferentes células del microambiente tumoral sigue siendo escaso ya que la mayoría de las moléculas de señalización y las vías implicadas aún no han sido identificadas.

Se estima que a nivel mundial durante el año 2012 se han producido alrededor de 14,1 millones de casos nuevos de cáncer, 8,2 millones de muertes por cáncer y 32,6 millones de personas viven con cáncer (dentro de los 5 años del diagnóstico). Los tipos de cáncer que se diagnostican con mayor frecuencia y que además son la principal causa de muerte, tanto en países desarrollados como países en desarrollo, son el cáncer de mama en mujeres y el cáncer de pulmón en hombres (figura 3, Internacional Agency for Research on Cancer (IARC), GLOBOCAN 2012).



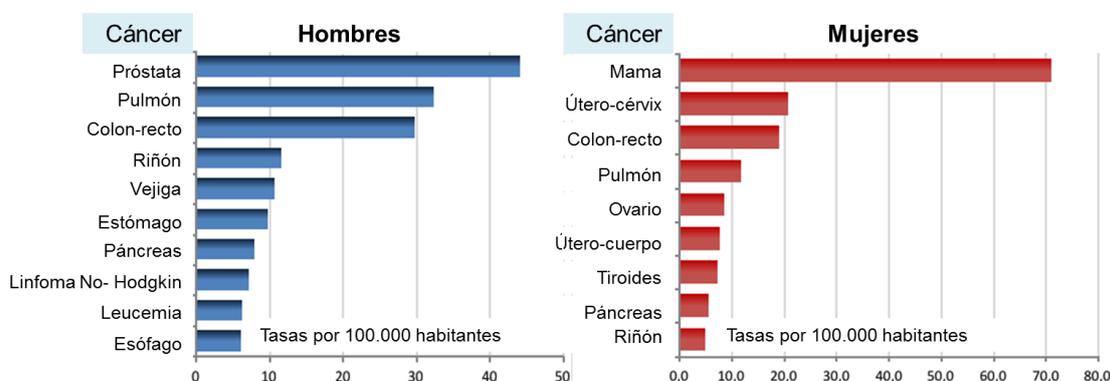
**Figura 3. Tasas de incidencia y mortalidad en el mundo para hombres (gráfico de la izquierda) y mujeres (gráfico de la derecha).** Número de casos o muertes estimadas por cada 100.000 personas por año. Proyecto GLOBOCAN 2012. Tomado y adaptado de <http://globocan.iarc.fr/>.

La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172,3-242,9 x 100.000 habitantes), de acuerdo a las estimaciones obtenidas por la IARC para el año 2012 (figura 4).



**Figura 4. Incidencia de cáncer en el mundo en 2012.** Tasas estandarizadas por 100.000 habitantes. Fuente: [Globocan \(IARC\)](http://globocan.iarc.fr/).

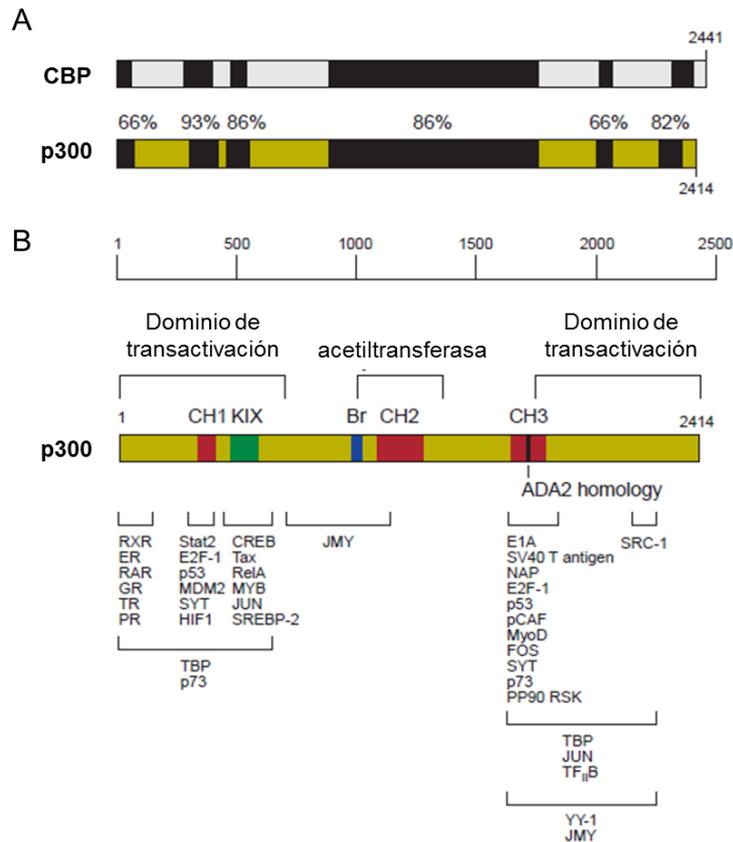
En nuestro país el cáncer de mayor incidencia es el de mama con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres, seguido por los cánceres masculinos de próstata (44 x 100.000 hombres) y pulmón (32,5 x 100.000 hombres) (figura 5).



**Figura 5. Tasas de incidencia de cáncer en Argentina para hombres (gráfico de la izquierda) y mujeres (gráfico de la derecha).** Número de casos o muertes estimadas por cada 100.000 personas por año. Elaborado por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica y Reporte (SIVER) del Instituto Nacional del Cáncer (INC) SIVER/INC en base a los datos de Globocan 2012. Tomado y adaptado de <http://www.msal.gov.ar>.

## Una introducción a la proteína p300

La proteína p300 es parte de la familia de coactivadores transcripcionales p300/CBP los cuales fueron inicialmente identificados como proteínas de unión a la proteína adenovírica E1A (p300) y a la proteína que se une al elemento de respuesta a AMPc (CBP), particularmente durante la progresión del ciclo celular y la diferenciación celular (Whyte et al, 1989; Stein et al, 1990; Chrivia et al, 1993; Eckner et al, 1994). El p300 comparte varias regiones conservadas con CBP que constituyen sus dominios funcionales. Estos dominios son: 1. el dominio bromo, que se encuentra frecuentemente en histonas acetiltransferasas de mamífero. 2. Tres dominios ricos en cisteína-histidina (CH1, CH2 y CH3). 3. Un dominio KIX y 4. Un dominio de homología con ADA2 (figura 6).



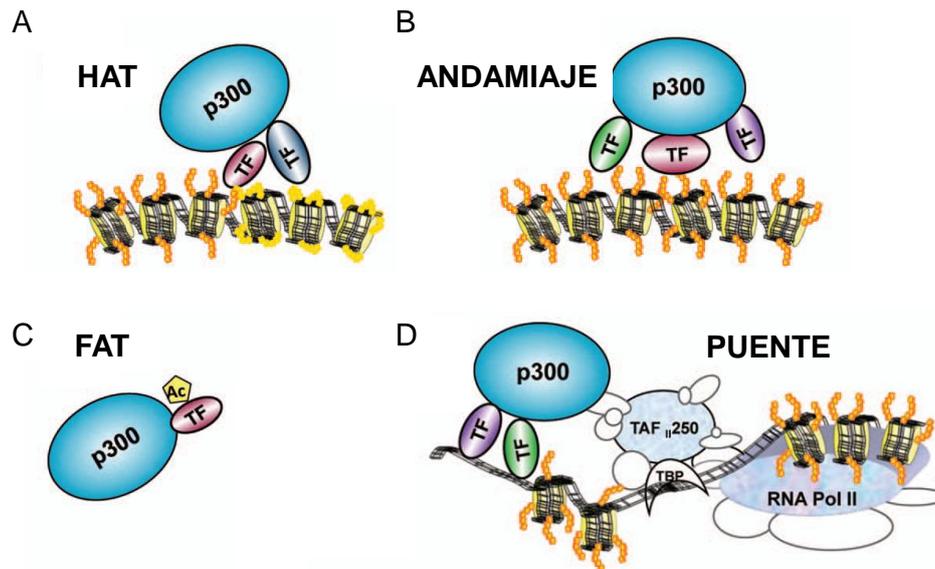
**Figura 6. A. Comparación de p300 y CBP.** Las regiones negras indican las áreas de mayor homología, con el porcentaje de aminoácidos idénticos entre las dos proteínas indicadas. Se indica el tamaño de cada proteína en números de residuos aminoácidos. **B. Dominios funcionales en p300.** Los dominios funcionales están indicados, incluidos los dominios CH: CH1, CH2 y CH3, el dominio KIX, el bromodominio (Br) y la región de homología ADA1. Los dominios N- y C- terminal de p300/CBP pueden actuar como dominios de transactivación. El dominio de acetiltransferasa está localizado en la región central de la proteína. Se observan las regiones que se unen a proteínas blancas junto con la proteína con la cual interactúa. Tomado y adaptado de Chan & La Thangue, 2001.

Aunque p300 y CBP comparten estas regiones homólogas, numerosos análisis moleculares y genéticos sugieren que llevan a cabo no sólo funciones comunes sino también individuales y específicas (Chan & La Thangue, 2001; Vo & Goodman, 2001; Iyer et al, 2004; Kalkhoven, 2004).

El p300 participa en una gran variedad de procesos biológicos tales como regulación del ciclo celular, apoptosis, diferenciación y respuestas celulares originadas por daño sobre el ADN (Giles et al, 1998; Giordano & Avantaggiati, 1999; Goodman & Smolik, 2000; Chan & La Thangue, 2001 ). Estos procesos

biológicos son afectados por el p300 al actuar, en parte, como coactivador transcripcional de varias proteínas nucleares tales como las oncoproteínas Jun, Fos, E2F y las supresoras de tumores BRCA1, Rb, Smads y p53 (Bannister et al, 1995; Avantaggiati et al, 1997; Lill et al, 1997; Pouponnot et al, 1998; Ghosh et al, 2000; Martinez-Balbas et al, 2000; Marzio et al, 2000; Pao et al, 2000; Tomita et al, 2000; Chan et al, 2001). Sin embargo, en 1996 dos grupos de investigación confirmaron de manera independiente que p300 funciona también como histona acetiltransferasa (HAT, del inglés Histone Acetyl Transferase) (Bannister & Kouzarides, 1996; Ogryzko et al, 1996). Esta acetilación neutraliza las cargas negativas y reduce la interacción entre ADN e histonas, alterando así la transcripción de los genes. De esta manera p300 acopla el reconocimiento de factores de transcripción con el remodelado de la cromatina. Por otra parte, esta proteína también puede ejercer una función regulatoria de la transcripción a través de la acetilación directa de factores de transcripción (FAT, del inglés Factor Acetyl Transferase). Así, por ejemplo, se ha documentado la acetilación de los receptores de estrógeno (Kim et al, 2010) y de progesterona (Chung et al, 2014) por parte de p300.

Además de tener un dominio acetiltransferasa, el p300 también posee varios dominios funcionales con los cuales interacciona con otras proteínas celulares y así tiene la capacidad de actuar como puente o andamiaje para los factores de transcripción y la maquinaria basal de transcripción, activando también de esta manera la transcripción de genes (Chen & Li, 2011). El gran tamaño del p300 (más de 2.400 aminoácidos) permite una superficie amplia para el reclutamiento y la interacción de varias proteínas. Un ejemplo de su función como molécula de andamiaje lo da la regulación del gen del interferón  $\beta$  durante la cual el p300 permite la formación del enhanceosoma al reclutar múltiples factores de transcripción (Kim et al, 1998; Merika et al, 1998). En la figura 7 se muestran las diferentes maneras no excluyentes mediante las cuales el p300 puede regular la transcripción génica.



**Figura 7. El coactivador transcripcional p300 regula la transcripción génica actuando como:** **A.** Acetiltransferasa para histonas (HAT). **B.** Scaffold o andamiaje para distintos factores de transcripción. **C.** Acetiltransferasa para factores de transcripción (FAT). **D.** Puente que conecta los factores de transcripción con la maquinaria basal de transcripción. Tomado y adaptado de Chen & Li, 2011.

Sumado a su importante función como regulador de la transcripción de genes, el p300 es capaz de acetilar el aminoácido lisina de varias proteínas involucradas en otras funciones además de la transcripción (actividad KAT, del inglés Lysine (K) Acetyl Transferase) como por ejemplo histona deacetilasa 6 (Han et al, 2009); cortactina (Zhang et al, 2007; Zhang et al, 2009); Atg 5, 7 ,8 (Lee & Finkel, 2009); PCNA (Naryzhny & Lee, 2004); TP53 (Kawaguchi et al, 2006) y alfa-importina (Bannister et al, 2000). En este sentido es importante tener en cuenta que la acetilación de proteínas es un proceso de modificación post-traduccional análogo a la fosforilación que puede tener importantes funciones regulatorias (Kouzarides, 2000). La acetilación del importante supresor tumoral TP53 por p300 se produce en los residuos de lisina 370, 372, 373 y 382 incrementando su capacidad de interactuar con las secuencias consenso de los promotores de los genes que regula (Gu & Roeder, 1997; Avantaggiati et al, 1997) favoreciendo así su función de supresor tumoral. Contrariamente a esta función promotora de la actividad del TP53 también se ha reportado que p300 posee actividad de E3 y E4 poliubiquitina ligasa sobre este supresor tumoral (Grossman et al, 2003; Shi et al, 2009) y es requerida

para la rápida degradación de TP53 en células no estresadas. Cabe destacar que estas dos últimas actividades de p300 pueden realizarse en el **citoplasma celular**.

## La relación entre p300 y el cáncer

En años recientes ha comenzado a surgir evidencia que relaciona a p300 con el cáncer. Sin embargo, aún no está claro cuál es el rol de la proteína en esta patología ya que hay evidencia que indica que puede funcionar como un supresor tumoral o como una oncoproteína (Goodman & Smolik, 2000). El **rol de p300 como supresor tumoral** es apoyado por el hecho que la oncoproteína viral E1A debe unirse al p300 e inhibirlo para poder transformar células de cultivos primarios de roedores (Eckner et al, 1996) y, consistente con esta hipótesis, mutaciones inactivadoras de p300 han sido identificadas en distintos tipos de cánceres humanos (Muraoka et al, 1996; Gayther et al, 2000; LeGallo et al, 2012; Kim et al, 2013; Ojesina et al, 2014). En el mismo sentido se ha reportado que p300 puede inhibir la progresión del ciclo celular regulando la transcripción de genes involucrados en el control del mismo como ocurre con p21<sup>Cip1</sup> (Missero et al, 1995; Wong et al, 2010) o pRB (Chan et al, 2001). Más aún, ratones knock out para el gen de p300 mostraron alteraciones en el ciclo y en la diferenciación celular (Yao et al, 1998). También se ha demostrado que el p300 regula la expresión y/o actividad del importante supresor tumoral BRCA1 (Pao et al, 2000; Fan, 2002; Lee et al, 2011; Ogiwara & Kohno, 2012; Shukrun et al, 2014). En estudios obtenidos en muestras de pacientes también se ha observado una correlación del p300 con menor progresión tumoral (Green et al, 2008; Huh et al, 2013).

Contrariamente a su rol antineoplásico, también se ha presentado evidencia indicando **que posee actividad pro-tumoral** ya que se ha detectado que activa la transcripción de importantes oncogenes tales como *JUN*, *E2F-1*, *NF-Kappa-B* y *MYC* (Janknecht, 2002).

Del mismo modo, y contrariamente a lo citado anteriormente, también se ha reportado en biopsias de tumores humanos que p300 se correlaciona con una mayor progresión tumoral (Debes et al, 2003; Ishihama et al, 2007; Syrjänen et al, 2010; Li M et al, 2011; Li Y et al, 2011; Gao et al, 2014).

También es importante mencionar que, como ya se comentó, p300 induce la acetilación de TP53 incrementando su actividad transcripcional (Avantaggiati et al, 1997) así como también, y en contraposición al efecto anterior, estimula la degradación del mismo por medio de su actividad ubiquitina ligasa (Grossman et al, 1998 y 2003) actuando entonces como antitumoral en el primer caso y como pro tumoral en el segundo.

Relacionado con lo anterior y con los mecanismos que regulan la actividad de p300 y que pueden ser pasibles de alteración en el cáncer, cabe destacar que se ha reportado que la redistribución intracelular de la proteína es importante para su actividad y que la misma es degradada por el sistema ubiquitina-proteosoma citoplasmático (Chen et al, 2007). El p300 se regula además mediante auto acetilación, fosforilación y sumoilación (Chen & Li, 2011). Una de las proteínas que fosforila a p300 es Akt, lo cual incrementa su estabilidad metabólica (Chen et al, 2004).

La expresión e influencia de p300 ha comenzado a ser investigada en varios tipos de cánceres humanos. Unos pocos trabajos han reportado mutaciones del p300 en leucemias pero no se ha estudiado su expresión en las mismas (Borrow et al, 1996; Giles et al, 1998; Karamouzis et al, 2007).

En carcinoma de colon se ha reportado que el nivel de expresión de p300 es un factor importante en el control de la expresión de genes cruciales para la transformación epitelio-mesenquimática, tales como *ZEB1*, *SNAIL*, *CDH1* y por lo tanto probablemente para la progresión tumoral (Peña et al, 2006). Otro estudio detectó que los niveles de ARNm y proteicos de p300 eran mayores en tejido tumoral que en la mucosa normal y que estos niveles se correlacionaban con un pronóstico desfavorable. También se observó que altos niveles de CBP se correlacionaban con una mayor sobrevida sugiriendo que el monitoreo de

p300 y CBP podría predecir el pronóstico de pacientes con este carcinoma (Ishihama et al, 2007). Un resultado distinto fue obtenido por Huh y colaboradores quienes también observaron sobreexpresión de p300 en tejido tumoral respecto del tejido normal observando que dicha sobreexpresión es un factor pronóstico favorable independiente para la sobrevida libre de enfermedad en pacientes con este carcinoma (Huh et al, 2013). El estudio de mutaciones en estos tumores demostró que p300 está alterado en ambos alelos sugiriendo que la inactivación de la proteína podría estar involucrada en el desarrollo de estos carcinomas (Muraoka et al, 1996).

En carcinoma celular escamoso de esófago, Li y colaboradores estudiaron la expresión de p300 en biopsias de tumores y de mucosa normal. Utilizando un microarreglo de tejidos observaron que la expresión de p300 era mayor en el tejido tumoral que en la mucosa normal. Mediante un análisis multivariado mostraron que los niveles de p300 eran un factor pronóstico desfavorable e independiente (Li et al, 2011). Por otro lado, Zhang y colaboradores determinaron que la represión de la expresión de p300 por metilación está asociada con la invasión tumoral y la metástasis en el carcinoma celular escamoso de esófago (Zhang et al, 2007).

En carcinoma hepatocelular se ha observado sobreexpresión de p300 y de su ARNm en el tejido tumoral comparado con el tejido no maligno adyacente determinando que elevados niveles se correlacionan con un pronóstico desfavorable (Li et al, 2011). En el mismo sentido Yokomizo y colaboradores reportan que en células de hepatoma el noqueo de la expresión de p300 se asoció con recuperación de la expresión cadherina-E, con una inhibición de la migración de  $\beta$  catenina al núcleo, una disminución de actividad ciclina D1, disminución de la capacidad invasiva de las células y con una disminución de la expresión de moléculas relacionadas con la transformación epitelio-mesenquimática, tales como Snail, Twist y HIF-1 sugiriendo que p300 contribuye a la progresión de estos carcinomas. En biopsias humanas observaron que la expresión de p300 se correlacionaba con una menor sobrevida global, un estadio avanzado del TNM, con mayor invasión vascular y con metástasis intrahepáticas (Yokomizo et al, 2011).

En carcinoma de cuello de útero se ha observado que una alta expresión de p300 se asocia con infecciones de HPV de alto riesgo y con las neoplasias intraepiteliales cervicales más severas (Syrjänen et al, 2010).

En carcinoma celular escamoso oral, Cho y colaboradores encontraron que una incrementada expresión de p300 se correlaciona con estadios clínicos avanzados y la cantidad de ganglios linfáticos con metástasis. No detectaron inactivación epigenética del gen (metilación del promotor) ni mutaciones inactivadoras concluyendo que p300 no es un gen supresor tumoral en estos carcinomas (Cho et al, 2014).

En carcinoma nasofaríngeo se detectó una mayor expresión de p300 en el tejido tumoral respecto al tejido normal y se observó que una mayor expresión de la proteína se asociaba con el grado tumoral, con mayor número de ganglios comprometidos y con un pronóstico desfavorable (Liao et al, 2012).

En cáncer de próstata altos niveles de p300 se correlacionaron con un mayor volumen tumoral y una mayor progresión del carcinoma de próstata luego de la cirugía (Debes et al, 2003). Un reporte posterior muestra que la expresión de p300 se correlaciona con alteraciones nucleares que a su vez eran indicadores de características agresivas en este tipo de cáncer, como una mayor expresión de marcadores de proliferación y extensiones extra prostáticas del tumor (Debes et al, 2005). En el mismo sentido otro estudio demostró que la expresión de p300 se correlaciona con alteraciones nucleares de las células tumorales y tiene un valor pronóstico para predecir la sobrevida libre de enfermedad ya que pacientes con mayor expresión de p300 y alteraciones nucleares mostraron mayor riesgo de recaída (Isharwal et al, 2008). Heemers y colaboradores encontraron una mayor expresión de p300 en los tejidos tumorales que en la zona adyacente al tumor histológicamente normal y detectaron una correlación de esta proteína con la proliferación celular y con una mayor agresividad tumoral (Heemers et al, 2008).

En carcinoma gástrico, Zhang y colaboradores utilizando un microarreglo de tejidos encontraron que p300 se asociaba con la expresión de E-cadherina y MLH1 sugiriendo que podría estar involucrada en la regulación de la expresión de sus genes (Zhang et al, 2013). Un estudio de las alteraciones genéticas de p300 en estos carcinomas concluye que se comporta como una proteína supresora tumoral en carcinomas gástricos intestinales pero no en los carcinomas gástricos tipo difusos (Koshiishi et al, 2004). Kim y colaboradores detectaron mutaciones con desplazamiento del marco de lectura de p300 y una pérdida de su expresión en cánceres gástricos y colorectales con alta inestabilidad de los microsatélites. Los autores indican que esta alteraciones podrían contribuir a la patogénesis del cáncer por desregulación de las funciones mediadas por p300 (Kim et al, 2013).

En melanomas se ha detectado **expresión citoplasmática de p300** además de la típica localización nuclear demostrando que la pérdida de expresión nuclear está asociada con la progresión de la enfermedad y con un pronóstico desfavorable (Rotte et al, 2013). Bhandaru y colaboradores también detectaron **p300 citoplasmático** y encontraron que la proteína en esta localización se asociaba con la progresión, el tamaño tumoral y el status de la ulceración. Por otro lado, el p300 en localización nuclear se asociaba con mayor sobrevida (Bhandaru et al, 2014).

En carcinoma de pulmón, Lu y colaboradores encontraron que la expresión de p300 y p21 se correlacionaba con la diferenciación celular, con metástasis a ganglios linfáticos, y mayores valores de pTNM (Lu et al, 2007). Hou y colaboradores detectaron que alta expresión de p300 se asociaba con menor sobrevida libre de enfermedad y menor sobrevida global determinando que p300 es un marcador pronóstico independiente de una menor sobrevida de estos pacientes y que la combinación de la clasificación clínico patológica del TNM con la expresión de p300 podría ser una herramienta para identificar pacientes con alto riesgo de una recaída (Hou et al, 2012). En otro estudio se detectó una mayor expresión de p300 en los tejidos tumorales en comparación con el tejido epitelial bronquial normal. Además, la sobreexpresión de p300 incrementó significativamente la invasión de las células tumorales (Liu et al,

2013). Gao y colaboradores estudiaron la expresión de p300 en carcinoma de pulmón de células pequeñas y encontraron que alta expresión de p300 y CBP es un factor pronóstico independiente de una pobre supervivencia global (Gao et al, 2014).

En base a esta evidencia surge la necesidad de explicar este rol dual del p300 en el cáncer. ¿de qué depende que actúe como supresor o promotor tumoral? ¿Depende del tipo celular y por lo tanto de la clase de tumor? ¿Depende del tipo de alteraciones patológicas en la estructura y/o en la regulación que sufra esta proteína? ¿Depende de que estas alteraciones influyan su localización subcelular? ¿Depende de las cantidades relativas de p53 o BRCA1 en relación a las de FOS, JUN o MYC con las que p300 interactúe? Como parte de este trabajo de tesis se ha intentado comenzar a responder algunas de estas preguntas estudiando la relación de esta proteína con el **cáncer de mama** en el cual esta influencia ha sido poco investigada.

## **Breve descripción del carcinoma mamario**

Tal como se describió anteriormente el cáncer de mama es el de mayor incidencia, mortalidad y prevalencia entre las mujeres a nivel mundial (IARC GLOBOCAN, 2012). Anualmente en nuestro país se producen 5.400 muertes por esta enfermedad y se estima que se producirán 18.000 nuevos casos por año, lo cual representa el 17,8% del total de incidencia de cáncer en Argentina. Estos datos indican la importancia de continuar investigando la biología de esta patología.

La clasificación histopatológica de los tumores es la forma estándar de establecer el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, además de ser la principal guía para la elección del tratamiento (Liefers & Tollenaar, 2002). Sin embargo, está probado que tumores histopatológicamente similares pueden presentar importantes diferencias en la progresión y respuesta al tratamiento debido a la participación de mecanismos moleculares subyacentes diferentes que conducen a similares características histopatológicas. Es en este contexto

que los marcadores moleculares se han propuesto como una herramienta útil ya que permiten reconocer subgrupos con distintos comportamientos dentro de los diversos tipos histopatológicos de tumores (Opar, 2008). Por esta razón, el estudio de las alteraciones de determinadas moléculas y su influencia en la carcinogénesis y progresión tumoral puede brindar información que ayude al diagnóstico, al pronóstico y/o al tratamiento.

Esto también se aplica en el cáncer de mama que como es sabido no se trata de una única enfermedad sino que es una patología heterogénea, compleja y multifacética que incluye una gran variedad de lesiones con distinto origen celular, alteraciones moleculares, etiologías y atributos clínicos (Lanari et al, 2012). Esto se refleja en la evolución de la clasificación de los distintos tipos de cáncer de mama.

Las clasificaciones tradicionales incluyen la evaluación histopatológica y la estadificación clínica. De acuerdo al tipo histológico los carcinomas mamarios se clasifican en carcinomas in situ e invasivos. Los carcinomas in situ se pueden clasificar en ductales (DCIS) o lobulillares (LCIS) siendo los primeros los más frecuentes. Los carcinomas invasivos o infiltrantes son aquellos en los que las células tumorales han adquirido la capacidad de atravesar la capa de células mioepiteliales y la membrana basal que separa al epitelio del estroma mamario. Hay más de 21 subtipos de carcinomas invasivos definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la cuarta edición sobre la clasificación de los tumores de mama (Lakhani et al, 2012). Según el subtipo histológico los carcinomas invasivos también se pueden clasificar en carcinomas ductales invasivos (IDC) y lobulillares invasivos (ILC). El IDC comprende el 45-75% de las lesiones invasivas diagnosticadas. Los tipos de tumores restantes tienen características morfológicas especiales y son los carcinomas mucinoso, medular, papilar, tubular, adenoideo quístico, secretor, apócrino cribiforme y metaplásico.

Los carcinomas mamarios también se clasifican de acuerdo al grado histológico. El sistema más utilizado es el denominado score de Nottingham (Bloom y Richardson modificado). Este score tiene en cuenta el grado

histológico, nuclear y mitótico de los tejidos. El grado histológico cuantifica la proporción de estructuras glandulares tubulares. El grado nuclear tiene en cuenta la atipia nuclear. Finalmente el grado mitótico tiene en cuenta la cantidad de mitosis. Estos tres scores son combinados para dar el Grado I (bien diferenciado); Grado II (moderadamente diferenciado) y Grado III (pobremente diferenciado).

En relación al estadio, para los carcinomas mamarios se utiliza el sistema TNM (Lakhani et al, 2012). Esta información incluye el tamaño del tumor (T), el *status* de los ganglios linfáticos (N) y la extensión de las metástasis (M) (Edge et al, 2010).

En años recientes ha habido un importante progreso en el análisis molecular del cáncer de mama con profundas implicancias en la comprensión de la biología de esta enfermedad y, por lo tanto, de su clasificación. Además, en la actualidad hay una tendencia a la aplicación de conocimientos genómicos en la categorización molecular del carcinoma mamario. Por lo tanto, además de la clasificación según la histología, grado y estadio, las clasificaciones actuales se valen de la utilización de marcadores moleculares con valor pronóstico y diagnóstico (Allred et al, 1998; Malhotra et al, 2010).

Un biomarcador es una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, de uno patogénico o de una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. En la actualidad hay varios marcadores siendo investigados para los carcinomas mamarios pero solamente tres han llegado a ser usados comúnmente en la práctica clínica, a saber: receptores hormonales de estrógeno (RE) y de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2/Neu/ErbB2) (Rakha et al, 2010). El RE predice la respuesta del tumor a la terapia endócrina y es un factor pronóstico para la recaída temprana y la respuesta a largo plazo. En 1996 se identificó un segundo receptor de estrógeno (Mosselman et al, 1996). El *status* del RE de la práctica clínica se refiere a los RE- $\alpha$  mientras que al nuevo receptor se le designó RE- $\beta$ . El gen del RP es regulado por el estrógeno y su expresión indica el funcionamiento correcto de la vía del RE

(Horwitz et al, 1975 y 1978; Lanari et al, 2009). La sobreexpresión de HER-2 es indicador de un pronóstico desfavorable y predictor de la respuesta al tratamiento sistémico con el anticuerpo monoclonal humano anti-HER-2 (Trastuzumab o Herceptin).

El carcinoma mamario se puede clasificar en 3 categorías basándose en la presencia o ausencia de estos receptores (Carlson et al, 2009). El 70% expresa RE y RP, aproximadamente el 20 % sobre expresa HER-2 y el 10% no expresa ninguno de estos 3 receptores y son conocidos como triple negativos (TN). Cabe destacar que estos últimos tienen un comportamiento clínico más agresivo y un peor pronóstico. Además, por la ausencia de estos mismos receptores carecen de una terapia dirigida.

En los últimos años, los estudios de los perfiles de expresión génica de estos tumores continuaron demostrando que tumores morfológicamente similares encierran varios subtipos moleculares. En este sentido dos estudios importantes (Perou et al, 2000; Sorlie et al, 2001) demostraron que diversos patrones de expresión génica conducen a variaciones en la actividad de distintas vías de señalización, en las tasas de crecimiento, y en la composición celular de estos carcinomas. Todos estos conocimientos se han reflejado en una nueva clasificación del carcinoma mamario en los siguientes subtipos:

El subtipo luminal incluye tumores con presencia de receptores hormonales (RH, estrógeno y progesterona), expresan determinadas citoqueratinas luminales (5-8-18). Representa el 67 % de los carcinomas mamarios. Suelen incluirse en este grupo los carcinomas ductales y lobulillares. Se subdividen en Luminal A: RH positivos, HER2 negativo, Ki-67<14%.

Luminal B: RH positivos, HER2 negativo, Ki-67>14%.

Luminal HER2 positivo: RH positivos, HER2 positivo y cualquier valor de Ki-67.

Los tumores luminal B tienen mayor proliferación y un peor pronóstico de las pacientes que los tumores luminal A.

El subtipo basal (basal-like) se llama así debido a que su expresión génica es similar a la de las células basales de los conductos mamarios normales. Son

tumores negativos para RH y HER2 (incluye a la mayoría de los tumores triple negativos). Expresan citoqueratinas 5-6-17 junto con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), c-Kit, FOXC1, frecuentes mutaciones de TP53 y un alto índice de proliferación. Ellos son mayormente de alto grado histológico (grado 3) y muestran un comportamiento clínico agresivo (Badve et al, 2011).

El subtipo HER2 se caracteriza por tener una alta expresión de HER-2 y ausencia de expresión de RH. Son de pronóstico pobre, asociándose a menor sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global.

El subtipo normal-like se caracteriza por la expresión de genes asociados al tejido adiposo y a otros tipos celulares estromales. Es un grupo controvertido y muchos autores piensan que son muestras contaminadas con células normales en lugar de un verdadero subtipo intrínseco.

Dentro del grupo de triple negativos existe un grupo denominado “bajo en claudinas” (proteínas de adhesión intercelular). También son denominados “triple negativos no basal-like”, ya que no expresan ni citoqueratina 5 ni EGFR. Hasta hace poco se los incluía dentro del grupo de los basales, pero tienen un comportamiento diferente en la respuesta a la quimioterapia y son de mejor pronóstico. (Prat et al, 2010)

Demostrando que el estudio de la biología de estos carcinomas y de sus marcadores continúa, recientemente se han identificado dos nuevos subtipos que son el subtipo molecular apócrino y el grupo relacionado con el interferón. Los primeros son RE negativos pero expresan receptores androgénicos (RA positivos) y tienen características histológicas apócrinas como abundante citoplasma eosinófilo y prominentes nucléolos (Farmer et al, 2005). Estos tumores pueden mostrar sobreexpresión o amplificación de HER2. Mientras estos tumores son asociados con recaída temprana, clínicamente muestran una buena respuesta a las terapias neoadyuvantes (Guedj et al, 2012). El segundo subtipo presenta alta expresión de genes regulados por el interferón, incluido el STAT1 (Hu et al, 2006).

## La relación entre el p300 y los carcinomas mamarios

Como se desprende de la sección anterior la investigación en el área de la biología del cáncer de mama se encuentra plenamente activa y en evolución. Se están descubriendo nuevos marcadores biológicos y esto se refleja en un mejoramiento cada vez mayor de la clasificación de estos tumores permitiendo a su vez un mejor manejo clínico de estas enfermedades (Parker et al, 2009). Este hecho aconseja y estimula la búsqueda de nuevas moléculas cuyas alteraciones o desregulaciones afectan la evolución de este complejo grupo de carcinomas. En este contexto, las evidencias anteriormente presentadas acerca de la relación del p300 con el cáncer en general lo postulan como un buen candidato. Por lo tanto es importante conocer cuál es la evidencia previa que relaciona al p300 con el cáncer de mama. En este sentido cabe destacar que la enorme mayoría de las investigaciones han sido realizadas en líneas celulares derivadas de cáncer de mama. A continuación se describen brevemente los trabajos considerados más importantes y que indican una posible relación del p300 con el carcinoma mamario.

En la línea celular MCF-7 la sobreexpresión inducida de p300 aumenta la transcripción de los genes blanco del receptor de estrógeno actuando por lo tanto como cofactor transcripcional (Hanstein et al, 1996). En esta misma línea celular se ha reportado que una forma dominante negativa de p300 previene la activación transcripcional de p53 contrarrestando así el arresto en G<sub>1</sub> y la apoptosis mediado por p53. Estos datos implican a p300 como un componente importante de la señalización de p53 (Avantaggiati et al, 1997). En el mismo sentido, se ha demostrado también en estas células que CBP/p300 interactúa físicamente con el dominio de transactivación de p53 y que dicha interacción incrementa la capacidad de p53 de activar a p21 endógeno (Scolnick et al, 1997). Experimentos con células MCF-7 deficientes en p300 o CBP permitieron demostrar que p300, pero no CBP, contribuye a la sensibilidad de las células a la radiación ionizante indicando que p300 funciona en la respuesta apoptótica al daño al ADN (Yuan et al, 1999). Además se encontró que los receptores de ácido retinoico regulan el arresto celular y la apoptosis de las células MCF-7

modulando la expresión de CBP/p300 (Dietze et al, 2002). Por otro lado, se observó que los RE $\alpha$  actuando conjuntamente con p300 y CtBP1 intervienen en la represión transcripcional de genes tempranos en células MCF-7 (Stossi et al, 2009). También se ha reportado que en células MCF-7 el oncogén *SKP2*, una ubiquitina ligasa implicada en la carcinogénesis mamaria que produce la degradación del inhibidor del ciclo celular p27<sup>kip1</sup>, es acetilado por p300 aumentando su estabilidad y función oncogénica (Inuzuka et al, 2012). El p300 también forma parte de un complejo transcripcional que tiene como blanco el gen de la enzima catecol-O-metil transferasa. Un incremento de esta enzima aumenta la conversión metabólica de los estrógenos lo que a su vez reduce la proliferación de las células MCF-7 (Liu et al, 2013).

En células MCF-7 y HCC38 se demostró que p300 forma un complejo transcripcional con Nrf2 que se une a sitios ARE sobre el promotor de BRCA1 activando su transcripción (Wang et al, 2013).

En células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con resveratrol se observó que COX2 colocaliza en núcleo con p53 fosforilado en Ser15 y con p300 facilitando de esta manera la apoptosis (Tang et al, 2006). También en estas células se ha demostrado que p300 es parte del complejo de transcripción de RhoA, proteína que como es sabido está asociada al proceso de metástasis. Mooney y colaboradores mostraron que p300 acetila ARN helicasas aumentando su estabilidad y estimulando su habilidad de coactivar el receptor de estrógeno contribuyendo potencialmente a su aberrante activación en cáncer de mama (Mooney et al, 2010). Además se demostró que sobreexpresando p300 en estas mismas células se reduce la inhibición de BRCA1 mediada por la oncoproteína TAX (Shukrun et al, 2014).

En la línea celular MDA-MB-453 se descubrió que p300 está involucrado en la regulación transcripcional del importante oncogén HER-2/neu (Chen & Hung, 1997).

En células de la línea T47D se observó que la inducción de p21 por la progesterona requiere de CBP/p300 y que Sp1 y CBP/p300 co-

inmunoprecipitan con los receptores de progesterona (Owen et al, 1998). En esta línea celular se ha estudiado la relación entre p300 y BRCA1. Un trabajo demuestra que existe asociación física entre p300, CBP y BRCA1 y que la transactivación mediada por BRCA1 está incrementada por p300 y CBP. Este efecto fue suprimido por la oncoproteína adenovírica E1A (Pao et al, 2000). Otro estudio ha reportado que la capacidad de BRCA1 de reprimir la actividad del receptor de estrógeno se correlaciona con su capacidad de inducir una regulación negativa de p300 observándose que esta última interactúa directamente con el dominio AF-2 del RE $\alpha$  (Fan et al, 2002).

En células SKBR3 se observó que la PGE2 a través de sus receptores incrementa la interacción P-CREB y p300 con el promotor de la citocromo P450 aromatasa, la cual cataliza la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos contribuyendo así a la carcinogénesis mamaria dependiente de hormonas (Subbaramaiah et al, 2008). También se ha demostrado que p300 influencia la migración celular a través de la acetilación de cortactina quien esta sobreexpresada en tumores de mama en relación al tejido mamario normal (Zhang et al, 2009).

En las células MDA-MB-361 se demostró que la melatonina inhibe a COX-2 y la consecuente producción de la prostaglandina E2 (PGE2) por medio de la inhibición de la actividad de p300 sobre NF- $\kappa$ B (Wang et al, 2012).

En las líneas de carcinoma mamario humano MDA-MB-231, HS578T y HBL100, Chang y colaboradores demostraron que la unión de la proteína adenovírica E1A a p300 bloquea la acetilación de la proteína de shock térmico HSPA5 promoviendo su degradación proteosómica. Es de destacar que HSPA5 promueve quimio resistencia y metástasis y que ha sido sugerido como marcador de mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Chang et al, 2014).

Como puede observarse los estudios en líneas celulares derivadas de carcinomas mamaros sugieren que p300 puede intervenir en el cáncer mamario a través de diversos mecanismos. Además muestran que, como ya se

indicó anteriormente para la relación del p300 con el cáncer en general, también en cáncer de mama hay evidencia indicando que puede actuar como oncogén o como gen supresor tumoral.

A pesar de la evidencia que se acaba de presentar, obtenida en células en cultivo e indicando que p300 tiene un rol en el cáncer de mama existen, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, solo dos trabajos que investiguen este mismo tema en modelos animales. En uno de ellos, en los que se utilizó tanto células en cultivo como modelos animales se observó que el factor de transcripción YB-1 expresado en cultivos tridimensionales de acinos de células epiteliales mamarias normales promovió el fenotipo maligno de estas estructuras incrementando la expresión y actividad de p300 lo cual condujo a una remodelación epigenética de la cromatina. Esta última a su vez permitió que YB-1 se uniera a promotores de genes que tuvieron como efecto último reprimir el gen del supresor tumoral p16, lo cual condujo a un fuerte incremento de la proliferación. Sin embargo la transformación maligna completa no se logró hasta que las células fueron cotransfectadas con RSK2 y hTERT adquiriendo la capacidad de desarrollar tumores en ratones que fueron clasificados como cáncer de mama de tipo basal (Davies et al, 2014). El segundo trabajo reporta la inhibición farmacológica de p300/CBP, aunque en forma no totalmente específica, con el inhibidor L002. Esta inhibición suprimió el crecimiento tumoral en un modelo de xenotrasplante con células de la línea celular de cáncer mamario triple negativo MDA-MB-468 en ratones NU/NU (Yang et al, 2013).

Al momento de escribir esta tesis existen pocos trabajos que estudian p300 en biopsias humanas de cáncer de mama, ya sea en busca de mutaciones, variantes genéticas o para establecer correlaciones entre su expresión y datos clínicos e histopatológicos. En relación al estudio del estado mutacional de p300 en carcinomas humanos se han reportado mutaciones que predicen una proteína truncada postulando entonces que se trataría de un gen supresor tumoral en cáncer de mama y otros tumores epiteliales (Gayther et al, 2000). Otro estudio que investigó la presencia de variantes genéticas de coactivadores del receptor de estrógeno detectó que la distribución de los genotipos de p300 Ile997Val y Gln2223Pro fue similar entre los tejidos tumorales y los controles

(Wirtenberger et al, 2006). Bryan y colaboradores han reportado pérdida de heterocigidad (LOH) en la región cromosómica en que se encuentra p300 (22q13) en el 36 % de los tumores analizados pero sin detectar ninguna mutación somática en el gen. Los autores sugieren que la ausencia de mutaciones en p300 en las muestras tumorales que al mismo tiempo muestran una alta frecuencia de LOH en 22q13 puede indicar que un gen vecino es el blanco de esta LOH (Bryan et al, 2002).

Con respecto a los estudios de expresión, la mayoría de los mismos demuestran elevada expresión de p300 en estos tumores (Xiao et al, 2011; Green et al, 2008; Vleugel et al, 2006 y Hudelist et al, 2003). Cabe destacar que solo dos de estos trabajos comparan la expresión proteica de p300 en el tumor respecto al tejido adyacente de aspecto histológico normal encontrando una sobreexpresión de la proteína en la zona tumoral. (Xiao et al, 2011; Hudelist et al, 2003). Con respecto a los estudios de correlación de p300 con parámetros clínicos e histopatológicos, en forma similar a lo detectado para otros tipos de cáncer, los resultados han sido contrapuestos. Por un lado se ha asociado mayores niveles proteicos de p300 con un menor grado del tumor (Green et al, 2008) y por otro se ha encontrado que mayor expresión de la proteína se correlaciona con un pronóstico desfavorable de las pacientes (Xiao et al, 2011). También se ha reportado que los niveles proteicos de p300 no se correlacionan con el grado tumoral (Vleugel et al, 2006) o con la presencia de nódulos linfáticos con células metastásicas (nódulos positivos) (Hudelist et al, 2003).

Si bien hay trabajos que han reportado **localización citoplasmática de p300** en cáncer de mama (Hudelist et al, 2003; Xiao et al, 2011), en ninguno de ellos se investigó si existía correlación entre la localización subcelular de p300 y los parámetros clínico patológicos de las pacientes. Cabe destacar que dicha correlación ha sido detectada en otros tipos de cáncer tales como melanoma (Rotte et al, 2013; Bhandaru et al, 2014) y cáncer de pulmón (Gao et al, 2014). ¿Podría la localización subcelular de p300 estar relacionada con la regulación de su función? ¿La alteración de esta localización podría tener alguna

influencia en el desarrollo del cáncer? Como se describirá, en este trabajo de tesis se ha aportado evidencia en este sentido.

Los datos expuestos en esta introducción sugieren la hipótesis que la desregulación de la función normal de p300 podría tener influencia en la transformación maligna y progresión tumoral de varios tipos de cáncer. Para el carcinoma mamario en particular la información disponible es menos concluyente.

Los estudios realizados en varias líneas celulares derivadas de carcinoma mamaros humanos sugieren múltiples mecanismos a través de los cuales el p300 podría influenciar el desarrollo de este carcinoma sin llegar a un consenso sobre si todos ellos son importantes o si algunas vías de acción son predominantes. Además, al igual que para los cánceres en general, surge aquí evidencia indicando que la proteína puede actuar como supresora tumoral o teniendo un rol oncogénico.

Los dos estudios que hemos podido encontrar en la bibliografía, uno directo y otro indirecto, utilizando modelos animales de carcinoma mamario coinciden en atribuir un rol oncogénico para p300.

Por otro lado, y al igual que en los estudios en líneas celulares, los pocos estudios realizados en biopsias humanas han arrojado resultados dispares.

En conclusión, la información disponible está fuertemente basada en estudios en líneas celulares con muy pocos trabajo en modelos animales o utilizando biopsias humanas. Los resultados muchas veces son confusos y hasta contradictorios. No obstante la información disponible acerca de la relación del p300 con otros tipos de tumores hace suponer que también en cáncer de mama la desregulación de esta importante proteína multifuncional puede estar teniendo un rol. En este trabajo de tesis hemos intentado contrastar esta hipótesis.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## Hipótesis

La hipótesis principal de este trabajo de tesis es que alteraciones en el funcionamiento normal del p300 promueven el desarrollo y/o la progresión tumoral en carcinomas mamarios, incluyendo dentro de estas alteraciones la perturbación de su actividad acetilasa y una localización subcelular anormal. Obviamente una hipótesis derivada de la anterior es que la inhibición farmacológica de la proteína podría ejercer efectos antineoplásicos.

## Objetivo General

El objetivo general de este trabajo de tesis es la contrastación de esta hipótesis para lo cual realizaremos ensayos de modulación de la actividad de p300 en líneas celulares y en un modelo murino de cáncer mamario. Como no siempre los resultados obtenidos con estos modelos experimentales son completamente trasladables al cáncer humano, estos estudios se completarán utilizando biopsias de pacientes en las que se estudiará la expresión y localización intracelular de p300 y su asociación con parámetros clínicos e histopatológicos.

## Objetivos Específicos

*Con el fin de comprobar si la modulación de la actividad acetilasa del p300 tiene efecto en la progresión del carcinoma mamario se estudiarán las consecuencias de la inhibición farmacológica de dicha actividad sobre los procesos celulares habitualmente desregulados en el cáncer. Por esta razón se establecieron los siguientes objetivos específicos:*

1. Estudiar el efecto de la inhibición farmacológica de la actividad acetilasa de p300 sobre la supervivencia celular en distintas líneas de carcinoma mamario.

*Aclaración:* se entiende como supervivencia celular las alteraciones en el número de células de una población celular que pueden ser producidas por una variación de los procesos de proliferación y/o apoptosis.

2. Estudiar los mecanismos celulares (proliferación y apoptosis) y moleculares a través de los cuales la inhibición de la actividad acetilasa del p300 influencia la supervivencia celular.

3. Estudiar el efecto de la inhibición farmacológica de la actividad acetilasa en la migración e invasión celular.

*Abundante evidencia indica que determinados aspectos del comportamiento de las células en cultivo son diferentes a los de las células cuando se encuentran formando parte integral de los tejidos en el organismo. Por esta razón, es conveniente corroborar los resultados de los estudios realizados en células en cultivo con ensayos realizados en modelos animales. Por lo cual el siguiente objetivo fue:*

4. Estudiar el efecto de la inhibición farmacológica de la actividad acetilasa sobre la progresión tumoral en un modelo murino de trasplante singeneico de células de carcinoma mamario.

*Cuando comenzamos a inhibir p300 en las células LM3, tanto en cultivo como en los tumores del modelo animal, se pudo detectar una inusual localización citoplasmática de esta proteína. Por lo tanto otro objetivo específico de esta tesis fue:*

5. Estudiar las características subcelulares de la expresión de p300 en tumores y tejidos mamaros normales en modelos animales de carcinoma mamaros con los que se cuenta en el laboratorio.

*Como se comentó anteriormente es sabido que no siempre los resultados obtenidos en estudios utilizando células en cultivo o modelos animales son*

*completamente trasladables al cáncer humano. Debido a esto el siguiente objetivo fue:*

6. Estudiar las características de la expresión de p300 en biopsias obtenidas de pacientes con diagnóstico de carcinoma mamario y correlacionarla con parámetros clínicos e histopatológicos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Inhibidores de p300

**Curcumina** (C.I.75300, Biopack), inhibidor específico de p300 (Balasubramanyam et al, 2004; Marcu et al, 2006; Chen Y et al, 2007; Morimoto et al, 2008; Sunagawa et al, 2014) fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) para preparar 200 mM de solución stock. Ácido 2-(3-(3, 4-Diclorobenzyloxi) fenoxi) pentadecanoico (**VV56**) y ácido 2-(3-(3,4-diclorobenzyloxi) fenoxi) hexadecanoico (**VV59**), inhibidores específicos de la actividad acetiltransferasa de p300 (Eliseeva et al, 2007) fueron disueltos en DMSO para preparar una solución stock 100 mM. Estos dos últimos inhibidores fueron obtenidos como parte de una colaboración con el Dr. Manfred Jung investigador del Institute of Pharmacological Sciences, Albert Ludwig University, Freiburg, Germany.

## Inhibidor de proteosoma

MG132 (pubchem 462382, Calbiochem), es un inhibidor específico de la actividad del proteosoma. Fue disuelto en DMSO para preparar una solución stock de 100 mM.

## Inhibidor de la formación de agresomas

Tubacina (SIGMA), inhibidor selectivo de la histona deacetilasa 6 (HDAC6) y por lo tanto bloquea la formación de agresomas (Hideshima et al, 2005). Fue disuelto en DMSO para preparar una solución stock de 100 mM.

## Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

La línea **LM3** establecida a partir de pasajes sucesivos *in vitro* de un cultivo primario del adenocarcinoma mamario murino M3 (Urtreger, et al 1997). No expresan receptores de estrógeno (RE) ni de progesterona (RP).

La línea **LM05e** fue establecida a partir de un tumor espontáneo de mama en ratones BALB/c y responden a estrógeno. Estas dos líneas fueron gentilmente cedidas por el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.

La línea **T47D** derivada de un tumor ductal de mama humano. Expresan los receptores de estrógeno y progesterona.

La línea **MDA-MB-231** derivada de un tumor ductal humano triple negativo.

Las células fueron mantenidas en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) excepto en el caso de las células de la línea MDA-MB-231 que fueron cultivadas en RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium, Sigma). Ambos medios fueron suplementados con 5 % v/v (LM3) y 10 % v/v (LM05e, T47D y MDA-MB-231) de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) respectivamente, L-glutamina (5 mM, Gibco), penicilina (Gibco, 100 U/ml), y estreptomycin (Gibco, 100 µg/ml) a 37 °C, bajo atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

## **Estudio de la supervivencia celular: ensayo WST-1 y conteo de células en cámara de Neubauer**

Para repicar las células se retiró el medio de cultivo, se lavó con 5 ml de PBS y se agregó 500 µl de tripsina. Las células se resuspendieron por el agregado de 2 ml de medio estéril. Se extrajo una alícuota para contar el número de células en cámara de Neubauer. Las células se sembraron con una densidad de 1.500 células por pocillo en placas de 96 pocillos con 100 µl de medio de cultivo completo. Luego de 24 h las células fueron tratadas con 25, 50, 75 y 100 µM de VV56, VV59 o vehículo (DMSO) durante 12, 24, 48, 72 h hasta realizarse el ensayo de WST-1 y posterior conteo en cámara de Neubauer. El reactivo WST-1 es metabolizado por las enzimas mitocondriales de las células viables (con

metabolismo activo), generando formazán que es un compuesto que presenta un color rojizo. El color del formazán producido por las células viables es cuantificado mediante valoración de la absorbancia del color de la solución en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 440 nm. Una vez finalizados los tiempos de tratamiento, se añadió a todos los pocillos el reactivo WST-1 diluido en medio de cultivo (1:10) incubando durante 1 h. Transcurrido este tiempo se agitó levemente la placa para que el color resultante de la reacción del WST-1 aparezca homogéneo. Se extrajeron los 100  $\mu$ l de cada pocillo y se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro (Jasco V-630). Posteriormente se lavaron las células con PBS, se agregó tripsina y se resuspendieron en 70  $\mu$ l de medio de cultivo completo. Se extrajo una alícuota (10  $\mu$ l) y se contó el número de células en cámara de Neubauer por triplicado. Cada tratamiento se realizó por triplicado para cada línea celular. Se graficó el número de células utilizando el software Graph Pad Prism 5 y se comparó la cantidad de células obtenidas luego del tratamiento con el inhibidor respecto al control tratado con vehículo.

## Ensayo de migración celular

Se realizó el ensayo de “wound healing” (Petit & Thiery, 2000). Este método imita la migración celular durante la cicatrización *in vivo*. Se sembraron las células en placas de Petri de 35 mm de diámetro y se cultivaron por 24 h hasta que formaron una monocapa. Luego se hizo una herida con un tip de una micropipeta de 200  $\mu$ l dejando al descubierto una sección de la monocapa celular. Se retiró el medio de cultivo y se añadió nuevo medio conteniendo los inhibidores VV59 (12,5  $\mu$ M), VV56 (12,5  $\mu$ M) o el vehículo (DMSO). Las células fueron fotografiadas con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000S con cámara digital Sony Coolpix cada 4 h durante 24 h. Utilizando el programa ImageJ se midió el área descubierta para cada tratamiento a los distintos tiempos comparando los distintos tratamientos. Se realizaron gráficos representando el porcentaje de herida descubierta en los distintos intervalos de tiempo, tomando un valor de 100 % de herida descubierta a 0 h. Los resultados

representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  SD, con 4 réplicas cada uno.

## **Ensayo de Invasión Celular**

El ensayo de invasión consiste en colocar insertos de membrana de policarbonato (12  $\mu$ m de tamaño de poro) en los pocillos de una placa de cultivo celular. Estos insertos delimitan una cámara superior y una inferior. La superficie superior de los insertos se recubre con una capa uniforme de Matrigel<sup>®</sup>. Las células invasivas son capaces de degradar las proteínas de la matriz del Matrigel<sup>®</sup> y atravesar los poros de la membrana de policarbonato. Finalmente las células que lograron atravesar la membrana son teñidas y cuantificadas. Se colocaron 200  $\mu$ l de Matrigel (Becton Dickinson, dilución 1/10 en DMEM) por inserto de policarbonato y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Se sembraron células tratadas con VV59 o vehículo (12.500 células/well en 0,5 ml de medio DMEM) en las cámaras superiores de los insertos de policarbonato. Se agregó 500  $\mu$ l de medio de cultivo DMEM conteniendo 5 % (v/v) SFB (Gibco) a las cámaras inferiores de los pocillos. Luego de 16 h de incubación a 37°C se retiraron los insertos, se lavaron suavemente con 1 ml de PBS, se fijaron en metanol 100 % (v/v) por 10 minutos (500  $\mu$ l/pocillo) y finalmente se tiñeron con cristal violeta 0,1 % (p/v) (Sigma) por 5 min. Luego se lavaron los pocillos para remover el exceso del colorante y las células que habían quedado en la parte superior de los insertos se removieron con un hisopo. Las células que habían atravesado los insertos hacia la cara inferior de los mismos fueron contadas en 4 campos distintos por microscopía óptica. Se utilizó el test de Student con  $p < 0,05$  como criterio para la significancia estadística.

## **Análisis del ciclo celular por citometría de flujo**

El análisis del ciclo celular fue realizado por FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter Analysis). Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células tratadas con VV59 (50  $\mu$ M) o vehículo durante 24 h fueron tripsinizadas, lavadas con 1 ml de PBS y

centrifugadas a 3.000 rpm por 3 min. Luego las células fueron resuspendidas en PBS y centrifugadas nuevamente a 3.000 rpm por 3 min. Las células fueron fijadas resuspendiéndolas mediante el agregado gota a gota de 1 ml de etanol 70 % (v/v) a -20 °C y conservadas hasta el momento de la tinción. Para realizar dicha tinción las células fueron centrifugadas a 3.000 rpm por 4 min, lavadas 2 veces con PBS frío y resuspendidas en 0,5 ml de PBS conteniendo 10 µg/ml de ioduro de propidio (IP, Roche) y 250 µg/ml RNasa A. El IP se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del DNA y produce un aducto altamente fluorescente que puede ser excitado a 488 nm con un ancho de emisión centrado en alrededor de 600 nm. Dado que el IP también puede unirse al ARN, es necesario tratar a las células con ARNasa para una óptima resolución del DNA. Para el análisis se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur Becton Dickinson usando una longitud de onda de excitación de 488 nm y de 585 nm de emisión. Cien mil células fueron analizadas por cada muestra. Se empleó un programa para histogramas de deconvolución de la frecuencia del contenido de DNA (ModFit LT cell cycle analysis software) y se graficó el % de células en las distintas fases del ciclo celular. Además, los datos fueron analizados con el software Cell Quest (Becton Dickinson).

## **Análisis de apoptosis por microscopía y por citometría de flujo**

Las células apoptóticas fueron analizadas utilizando el “Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit” (AV, 556420) siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen). Se observaron y cuantificaron mediante microscopio de luz y por citometría de flujo.

### **Análisis por microscopía**

Las células fueron tratadas con 50 µM de VV59 o su vehículo (DMSO) durante 24 h. Luego de los tratamientos correspondientes las células fueron tripsinizadas, colectadas y centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 min. Luego fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en buffer de binding (10

mmol/l HEPES (pH 7,4), 150 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se tomaron 100  $\mu$ l de las células resuspendidas y se les agregó 5  $\mu$ l de anexina V-FITC, luego se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) por 15 min. Finalmente se agregó 400  $\mu$ l de buffer de binding a cada tubo. Por último una alícuota fue colocada en un portaobjeto y observada dentro de los 5 min. Se contó el número de células con marcación y sin marcación de anexina V que había en 10 campos al azar. Se utilizó el test Chi-cuadrado con  $p < 0,05$  como criterio para la significancia estadística.

### **Análisis por citometría de flujo**

Las células fueron tratadas con 50  $\mu$ M de VV59 o su vehículo (DMSO) durante 24 h. Luego de los tratamientos correspondientes las células fueron tripsinizadas, colectadas y centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 min. Luego fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en buffer de binding anteriormente mencionado a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se tomaron 100  $\mu$ l de las células resuspendidas y se les agregó 5  $\mu$ l de anexina V-FITC y 10  $\mu$ l de IP, luego se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) por 15 min. Finalmente se agregó 400  $\mu$ l de buffer de binding a cada tubo. Por último, 100.000 células fueron analizadas por cada muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur becton Dickinson durante el transcurso de la hora siguiente. Se realizaron los siguientes controles para establecer las compensaciones y los cuadrantes: 1) células sin teñir, 2) células teñidas solamente con AnexinaV-FITC (sin IP) y 3) células teñidas solamente con IP (sin AnexinaV-FITC). Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado. Los datos fueron analizados con el software Cell Quest (Becton Dickinson). Se graficó y cuantificó el % de células con marcación AV y IP positiva (apoptosis tardía), AV positiva y IP negativa (apoptosis temprana), AV negativa y IP positiva (necrosis) y AV y IP negativa (células viables).

## Inmunofluorescencia (IF)

### Células tratadas con el inhibidor de p300

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 35 mm de diámetro conteniendo cubreobjetos, se incubaron hasta llegar al 50 % de confluencia y se trataron con VV59 (12,5  $\mu$ M) durante 12 h. Luego del tratamiento las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) en PBS (4 %) durante 10 min, se lavaron tres veces con PBS, se permeabilizaron en una solución de 0,2 % Tritón (Sigma) en PBS durante 15 min, se bloquearon con BSA en PBS (1 %) por 60 min y se incubaron en cámara húmeda con 150  $\mu$ l de una dilución 1/100 del anticuerpo primario p300 (sc-584 y sc-585, Santa Cruz Biotechnology) en solución de bloqueo durante 1 h. A continuación se lavaron las células tres veces con PBS durante 5 min y se incubaron en oscuridad en cámara húmeda con una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa 566 (Molecular Probes, Invitrogen) en solución de bloqueo durante 1 h. Finalmente se realizó un lavado con PBS por 5 min para luego teñir los núcleos con una solución de DAPI en PBS.

Para observar la formación de lamelipodios luego de que las células fueron bloqueadas se incubaron 30 min con faloidina-rodamina 1/100, luego se realizó un lavado con PBS por 5 min para luego teñir los núcleos con una solución de DAPI en PBS.

Los preparados fueron observados en un microscopio de fluorescencia Nikon I80 con adquisición de fotografía Nikon ACT-1 Versión 2.63 (Copyright © 2000, Nikon Corporation). Los parámetros de adquisición de la imagen fueron optimizados para cada foto individual, a fin de que la ganancia de la señal no se encuentre saturada y la señal de fondo/ruido sea casi nula. La evaluación de las IF se llevó a cabo observando la marcación en un total de 500 células en 10 campos elegidos al azar. Las fotografías de las IF realizadas para observar los filamentos de actina fueron tomadas con un microscopio confocal (Leica TSP2) y analizadas con ImageJ 1.37v (NIH). Se contaron las células del borde de las

colonias que contenían o no lamelipodios analizando 10 campos de 400 X al azar (Filigheddu et al, 2011).

### **Células tratadas con el inhibidor MG132 y tubacina.**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 35 mm de diámetro conteniendo cubreobjetos, se incubaron hasta llegar al 50 % de confluencia y se trataron con MG132 (5  $\mu$ M), vehículo (DMSO) o tubacina (10  $\mu$ M) durante 12 h. Luego del tratamiento las células se fijaron en PFA en PBS (4 %) durante 10 min, se lavaron tres veces con PBS, se permeabilizaron en una solución de 0,2 % Tritón en PBS durante 15 min, se bloquearon con BSA en PBS (1 %) por 60 min y se incubaron en cámara húmeda con 150  $\mu$ l de una dilución 1/100 del anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 1 h. A continuación se lavaron las células tres veces con PBS durante 5 min y se incubaron en oscuridad en cámara húmeda con una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 1 h. Finalmente se realizó un lavado con PBS por 5 min para luego teñir los núcleos con una solución de DAPI en PBS. Los anticuerpos primarios usados fueron p300 (sc-584 y sc-585), ubiquitina (mezcla monoclonal de P4D1 and 13-1600, Santa Cruz Biotechnology y Zymed, respectivamente). Los anticuerpos secundarios fueron anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa 566 (Molecular Probes, Invitrogen) y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa 488.

Las imágenes fueron observadas y adquiridas como se describió previamente en las células tratadas con VV59. La presencia de una única acumulación perinuclear fue considerada indicativo de formación de agresoma. Se observó ausencia/presencia de acumulaciones perinucleares marcadas con ubiquitina (agresomas) en 200 células de campos al azar. Se determinaron valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar (SD).

# **Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS – PAGE) y Western Blot**

## **Preparación de lisados celulares**

Las células fueron sembradas en placas y tratadas con 50  $\mu$ M de VV59 o vehículo (DMSO) durante 4, 12, 18 y 24 h, luego se les retiró el medio, se lavaron con PBS y se les adicionó 75-150  $\mu$ l de buffer de lisis (2 % TRIS 1M, 1 % Tritón-X 100, 0,5 M EDTA 0.5 M, 2 % NaCl 1M) al cual se le agregó previamente 1  $\mu$ l de cocktail de inhibidores de proteasas, se levantaron las células con espátula y se las colocó en tubos eppendorf. La mezcla se dejó reposar durante 30 min en hielo.

## **Medición de la concentración de proteínas**

Para la determinación de la concentración proteica se confeccionó una curva de calibrado constituida por cantidades crecientes de un estándar de BSA 1 mg/ml en un volumen final de 1 ml de reactivo de Bradford (RB) (BioRad). Se leyeron las absorbancias de los estándares a 595 nm. Paralelamente se prepararon y trataron las muestras incógnitas de igual manera por duplicado.

## **Preparación de las muestras**

Se realizaron los cálculos necesarios para llevar el volumen del lisado a la concentración de proteínas deseada con buffer de lisis y buffer muestra 4 X (Tris 1 M 2,4 ml pH 6,8, SDS 0,8 g, glicerol 4 ml, 0,01 g azul de bromofenol, 1 ml BME, H<sub>2</sub>O destilada 2,8 ml). Finalmente se calentó la mezcla por 5 min a 90 °C. Los lisados se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

## Electroforesis

Para la separación de proteínas por peso molecular se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 5 %, 12 % o 15 % según la proteína de interés. Para ello se prepararon geles de stacking y de separación en las proporciones detalladas en los cuadros que se muestran a continuación. Se sembraron en una calle 10 µl de marcador de peso molecular (See Blue Plus, Invitrogen) y en las restantes 30, 50 o 100 µg de proteínas según los casos. Se realizó la separación en buffer de electroforesis a 0,04 A para proteínas migrando sobre el gel de stacking y a 0,06 A cuando penetran al gel de separación, hasta terminar la corrida.

---

### Buffer Electroforesis 1 X

---

Tris Base 3 g

Glicina 14,4 g

SDS 10 % 10 mL

H<sub>2</sub>O Milli Q hasta completar 1 L

---

Gel Stacking 5 % (10 ml)	Gel Separación 12 % (25 ml)	Gel Separación 15 % (25 ml)
H <sub>2</sub> O 6,8 ml	H <sub>2</sub> O 8,2 ml	H <sub>2</sub> O 5,7 ml
Tris 1 M pH 6,8 1,25 ml	Tris 1,5M pH 8,8 6,3 ml	Tris 1,5M pH 8,8 6,3 ml
Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 1,7 ml	Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 10 ml	Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 12,5 ml
SDS 10 % 0,1 ml	SDS 10 % 0,25 ml	SDS 10 % 0,25 ml
TEMED 0,01 ml	TEMED 0,01 ml	TEMED 0,01 ml
APS 10 % 0,1 ml	APS 10 % 0,25 ml	APS 10 % 0,25 µl

---

## Transferencia a membrana de PVDF

Una vez concluida la separación electroforética una de las caras del gel fue apoyada sobre una membrana de PDVF (Millipore), previamente activada con metanol por 1 min, ambos fueron colocados entre papeles de filtro previamente humedecidos en buffer de transferencia (ver tabla a continuación) y a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en la cámara electroforética con buffer de

transferencia 1 X con la membrana de PVDF del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 0,3 A durante 1,30 o 2 h dependiendo de la proteína de interés. En el caso de p300 la transferencia se hizo a voltaje constante (45 v) durante 4 h con un buffer particular (ver tabla a continuación). Las membranas fueron lavadas con PBS, secadas y guardadas a 4 °C hasta su utilización.

---

<b>Buffer Transferencia 1 X</b>
Tris Base 3,03 g
Glicina 14,4 g
Metanol 200 mL
H <sub>2</sub> O Milli Q hasta completar 1 L

---

<b>Buffer Transferencia 1 X para p300</b>
Tris Base 3,03 g
Glicina 57,6 g
SDS 10% 2 mL
H <sub>2</sub> O Milli Q hasta completar 1 L

---

### **Inmunodetección de proteínas**

Las membranas fueron activadas en metanol por 1 min y colocadas en PBS, luego fueron bloqueadas con leche descremada al 5 % en PBS en agitación continua durante 30 min. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS y se procedió a incubarlas durante toda la noche en cámara fría con una dilución adecuada de anticuerpo primario preparada en una solución de BSA 0,4 % en PBS. Luego se realizaron 3 lavados con Tween-20 0,01 % en PBS e inmediatamente se incubó la membrana con una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante específico preparado en leche descremada al 5 % disuelta en PBS a temperatura ambiente durante 1 h en agitación. Finalmente se realizaron 3 lavados por 5 min con Tween-20 0,01 % en PBS y se procedió a revelar las membranas. Se empleó para ello el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus (GE Healthcare) procediendo a efectuar la reacción según las especificaciones indicadas por el proveedor. Para su uso posterior, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS, secadas y guardadas a 4 °C. Los anticuerpos primarios usados fueron

policlonal de conejo anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, sc-493), policlonal de conejo anti-p300 (Santa Cruz Biotechnology, sc-584 y 585), policlonal de conejo anti-p53 (Santa Cruz Biotechnologies, sc-6243), purificado de ratón anti-p21 (BD Biosciences, cat: 556430), purificado de ratón anti-p27(Kip1) (BD Biosciences, cat: 610241), anti-pBad, conejo anti-ciclina D (Thermo Scientific, RM-9104-S1), conejo policlonal anti-ciclina E (Santa Cruz Biotechnologies, sc-481). El anticuerpo policlonal de cabra anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnologies, sc-1615) fue usado como control de carga.

## **Cuantificación de ARNm por PCR en tiempo real cuantitativa**

### **Oligonucleótidos**

A continuación se detallan los oligonucleótidos utilizados para p300 que fueron diseñados con el programa Primer-BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHom](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHom)) y sintetizados por Sigma Integrated DNA Technologies.

Foward: 5´- ACCCTTCCCAGCCTCAAACACTAC -3´

Reverse: 5´- AACAGCCATCACAGACGAATCC -3´

### **Aislamiento del ARN**

Células confluentes cultivadas en placas de 100 mm de diámetro se lisaron con 1 ml de reactivo Trizol (Invitrogen, EEUU). Se removió el material insoluble por centrifugación a 12.000 x g a 4 °C por 10 min. Posteriormente se agregaron 0,2 ml de cloroformo a cada tubo, se mezclaron vigorosamente por 15 seg, se incubaron a temperatura ambiente por 2 min, se centrifugaron a 12.000 x g a 4 °C por 15 min y se transfirieron las fases acuosas con el material ribonucleico a viales estériles para ser tratados con un kit comercial (SV Total RNA Isolation System; Promega, EEUU) con el objeto de obtener muestras de ARN de alta pureza. A cada preparación se adicionaron 175  $\mu$ l de buffer de lisis con el

agregado de beta-mercaptoetanol y 350 µl de buffer de dilución mezclándose por inversión 3 a 4 veces. Luego se centrifugaron por 10 min y se transfirieron los sobrenadantes a las columnas de afinidad. Se agregaron 200 µl de etanol 95 % y se centrifugaron por 1 min. Se adicionaron 600 µl de solución de lavado de ARN, se centrifugaron por 1 min, se descartó el eluido y se incubaron las muestras con DNasa I a temperatura ambiente por 15 min. Se agregaron 200 µl de solución de stop de la DNasa, se centrifugó por 1 min y se realizaron 2 tratamientos con 600 µl y 250 µl de solución de lavado. Finalmente, se eluyó el ARN con 40 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas y se conservó a -70 °C hasta su posterior utilización.

### **Preparación del ADN complementario (cDNA)**

El ARN extraído fue utilizado para sintetizar fragmentos de cDNA de simple hebra. Para ello se comenzó utilizando la siguiente mezcla:

ARN (10-100 ng/µl)	10 µl
Oligo dT 500 ng/µl	1 µl
DTT 0.1 M	1 µl
H <sub>2</sub> O-DEPC	- µl

Esta mezcla fue incubada a 65 °C durante 5 min y enfriada en hielo para eliminar las estructuras secundarias del ARN y posteriormente se le agregó lo siguiente:

5 x Solución tampón MMLV	4 µl
RNAsin, 40U/ µl (Promega, EEUU)	1 µl
DTT 0,1 M	1 µl
dNTPs mix 10 mM	1 µl
MMLV RT 200U/ µl (Promega, EEUU)	1 µl

La reacción fue incubada a 37 °C durante 1,5 h y el producto fue conservado a -20 °C.

## PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para llevar a cabo la PCR en tiempo real se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

Mezcla Real 2 x (Biodynamics)	12,5 µl
Primer Fw 10 µM	0,5 µl
Primer Rv 10 µM	0,5 µl
cDNA (obtenido en la reacción de retrotranscripción)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O	9,0 µl

Las amplificaciones en tiempo real fueron realizadas en el equipo Rotor-Gene<sup>TM</sup> 6000, Corbett-Research (Corbett Robotics Inc., EEUU). El análisis de la expresión relativa de los genes en estudio fue realizada utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Para que la aplicación de tal método sea válida se requiere que las eficiencias de amplificación de los genes a analizar y del control bajo las mismas condiciones térmicas sean similares y cercanas a 1 (0,85-1,15). Para ello, se realizaron diluciones seriadas de un cDNA patrón abarcando un rango de 0,2; 0,1; 0,01; 0,005 de la preparación original. Si los valores de las eficiencias experimentales se encuentran dentro de los límites del margen indicado es aceptado el método seleccionado.

## Cuantificación y pureza de los ácidos nucleicos

Las concentraciones y pureza de los ácidos nucleicos fueron determinadas espectrofotométricamente (Sambrook et al, 1989). Para determinar la concentración de ADNc y ARN se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una unidad de absorbancia a 260 nm y con un camino óptico de 1cm, corresponde a 50 µg/ml para ADN de doble hebra y 40 µg/ml para ácidos nucleicos monocatenarios. La relación de las lecturas a 260/280 debe de ser alrededor de 1,65-1,85 para las muestras que contienen ADN y alrededor de 2 para las que contienen ARN (Sambrook et al, 1989).

## **Electroforesis en gel de agarosa**

Las muestras fueron separadas por electroforesis en un gel de agarosa 1,5 % (p/v) en buffer TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8) conteniendo 0,3 µg/ml bromuro de etidio (Sambrook et al, 1989). Los productos de amplificación se sembraron en una proporción 5:1 de muestra de ADN en la solución de siembra. Los tamaños de las moléculas se calcularon usando como marcador de peso molecular 1 Kb Ladder (Invitrogen, EEUU). Las corridas electroforéticas se realizaron a 70 V en buffer TAE. Los geles fueron observados en un transiluminador con fuente UV (300 nm) y fotografiados utilizando una cámara digital.

## **Modelos animales**

### **Modelo de carcinogénesis química de mama en ratas Sprague Dawley**

A los 40 días de edad los animales fueron sedados con Acedan (250 µl/kg de peso) y se les administró por vía endogástrica una única dosis de 7,12-dimetilbenza- $\alpha$ -antraceno (7,12-DMBA), 80 mg/kg de peso en aceite de maíz, con la ayuda de una sonda. Los animales fueron controlados posteriormente a su tratamiento con el carcinógeno realizándoles palpación de las glándulas mamarias dos veces por semana. Al momento de la aparición de los tumores (5 meses en promedio desde el momento de la inducción química) los animales se sacrificaron bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> según recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas con Animales de Experimentación, se disecaron los tumores y glándula mamaria normal, se fijaron en formol y se procesaron histológicamente como se detalla en procesamientos histológicos para evaluar por inmunohistoquímica la expresión de p300 en tejido tumoral y mama normal.

### *Cultivos primarios*

Se tomaron 10 mm de tejido para realizar cultivos primarios de células derivadas de explantos tumorales y de glándulas mamarias normales con el fin

de estudiar la formación de agresomas en los mismos. Estos cultivos fueron realizados como se describió previamente (Curino et al, 2005), con algunas modificaciones. Brevemente, se disecó en forma estéril el tumor mamario o la mama normal y se llevó a placa de petri conteniendo medio DMEM/F12 sin suero. Se disgregó en trozos muy pequeños y se llevó a incubación con solución enzimática (2,5 mg/ml tripsina, 5 mg/ml albúmina y 850 U/ml de colagenasa tipo II en PBS) durante 20 minutos con agitación continua a 37 °C. La fase líquida de la suspensión se removió y el tejido aún sin digerir se volvió a incubar durante 20 min con solución enzimática. Se frenó la reacción añadiendo medio DMEM/F12 con 10 % de suero. Se centrifugó a 1.000 rpm por 10 min y se removió el sobrenadante. Las células epiteliales y fibroblastos fueron separados por una modificación de la técnica de sedimentación como se describió previamente (Dran et al, 1995). Brevemente, las células fueron resuspendidas en 20 ml de medio DMEM/F12 con 10 % de suero y se dejó precipitar durante 20 min, las células del sobrenadante fueron descartadas y las células sedimentadas fueron resuspendidas en 20 ml de medio DMEM/F12 con 10 % de suero y se dejaron sedimentar durante 20 min, el procedimiento fue repetido 10 veces. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio de cultivo, se sembraron en placas de 35 mm sobre cubreobjetos cubiertos de poly-D-lisina y se incubaron durante 24 h hasta que las células se adhirieron. Las células fueron mantenidas en medio DMEM/F12 con 10 % de suero en incubador con 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 2-3 días hasta llegar a confluencia, momento en el cual se realizan los tratamientos.

### **Modelo murino transgénico MMTV-PymT**

El transgen utilizado para el desarrollo de este modelo consta de una construcción que contiene al promotor del virus tumoral mamario murino (MMTV) y el antígeno T medio también de origen vírico (Guy *et al*, 1992). Este promotor responde a los receptores estrogénicos de las células mamarias cuando estos son activados por sus ligandos hormonales de manera que dirige la expresión del oncogén vírico T medio limitándolo al tejido mamario iniciando allí las etapas de la carcinogénesis. Los animales se sacrificaron en diferentes etapas de la progresión del carcinoma mamario bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> y

se resecaron los tejidos. El modelo consta de las siguientes etapas: normal, hiperplasia, adenoma/MIN (adenoma-neoplasia intraepitelial mamaria), carcinomas tempranos y tardíos. El material obtenido se destinó para su posterior procesamiento por las técnicas histológicas y evaluación por inmunohistoquímica de la expresión de p300. Se contó para su utilización en esta tesis con numerosos tacos de parafina conteniendo tejidos en todas las etapas de la progresión tumoral que presenta el modelo y glándulas mamarias normales, obtenidos por el director de esta tesis durante su formación posdoctoral en la Rama de Cáncer Oral y Faríngeo (OPCB) del Instituto Nacional de Investigaciones Dentales y Cráneo-faciales (NIDCR, NIH, USA).

### **Modelo de implante subcutáneo de células LM3 en ratones singeneicos BALB/C**

Para la obtención de este modelo se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/C. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de luz/oscuridad de 12 h cada uno y con acceso a alimento y agua *ad libitum*. En este estudio se emplearon 36 ratones hembras vírgenes de 3 meses de edad con 20 g de peso (adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina). A los 70 días de edad se les inyectó en forma subcutánea  $4 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ l de medio DMEM libre de suero en el flanco derecho utilizando una jeringa tipo insulina con aguja 30G X 1/2. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50 a 70  $\text{mm}^3$  los ratones fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos y fueron inyectados de la siguiente manera: 6 ratones con curcumina (50 mg/kg en DMSO/DMEM sin suero), 6 ratones con vehículo de curcumina, 12 ratones con VV59 (45 mg/kg en DMSO/DMEM sin suero), 12 ratones con vehículo de VV59. Cada ratón recibió 3 aplicaciones semanales durante 3 semanas. Luego de las 9 aplicaciones, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical según recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas con Animales de Experimentación. Los tumores disecados se midieron, se pesaron, se fotografiaron y se fijaron con formol al 10 % en PBS durante 24 h para su posterior procesamiento por técnicas histológicas. Para analizar el volumen de los tumores disecados en ambos grupos se empleó la fórmula  $\pi/6 \times a \times b \times c$ , donde a, b y c son las 3

dimensiones del tumor (se asume una forma elipsoidal; Geran et al, 1972). También se removieron las glándulas mamarias y se fijaron en formol al 10 % en PBS durante 24 h para su posterior procesamiento por técnicas histológicas. Se examinó la invasión tumoral a la cavidad abdominal tal como ha sido descrito previamente (Bruzzone et al, 2009). Brevemente, se observó en el momento de la disección si el tumor atravesó la pared muscular abdominal e invadió la cavidad abdominal o si el tumor permaneció en el tejido subcutáneo sin atravesar la pared muscular para ingresar a la cavidad abdominal. Se realizó un test Chi- cuadrado para analizar si las diferencias en invasión entre los grupos eran significativas. Se examinaron todos los órganos macroscópicamente en busca de metástasis. Para cuantificar las metástasis pulmonares estos órganos fueron disecados y fijados en Bouin (ver tabla a continuación) durante 24 h (Kim et al, 2011). Luego se procedió a contar y fotografiar las metástasis en la superficie de los lóbulos pulmonares de cada ratón utilizando una lupa Nikon I80 con adquisición de fotografía Nikon ACT-1 Versión 2.63 (Copyright © 2000, Nikon Corporation). Una vez realizado el conteo, los pulmones se destinaron para su posterior procesamiento por técnicas histológicas.

---

#### **Fijador Bouin pH 2,2**

Solución acuosa sobresaturada de ácido pícrico 2 g/100 ml	700 ml
Formol 40 %	250 ml
Ácido acético glacial (al momento de su utilización)	50 ml

## **Técnicas Histológicas**

### **Procesamiento de órganos y tumores para histología**

Los órganos y tumores de los ratones fueron disecados y colocados en moldes individuales, enjuagados bajo agua corriente durante 15 min, escurridos y colocados en concentraciones crecientes de alcohol (70, 80, 96 y 100 %) durante 1 h cada una, posteriormente se colocaron en xilol por 2 h, se secaron y pasaron a recipientes con parafina a 56 °C. Transcurridas 3 h se procedió a armar los tacos y rotularlos. Se realizaron cortes de 0,5 µm de espesor con un

micrótomo Leica RM 2145 y se colocaron en portaobjetos. Posteriormente se sumergieron en xilol y se colocaron en estufa a 60 °C por 30 min para fundir la parafina. Posteriormente los tejidos fueron rehidratados por medio de inmersión en una secuencia de soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100, 96, 80 y 70 %, 5 min en c/u). Luego se colocaron en agua destilada por 5 min, se tiñeron con hematoxilina (ver tabla a continuación) por 15 seg y se sumergieron en alcohol 70 % 2 min. Posteriormente se tiñeron con eosina (ver tabla a continuación) por 30 seg y se deshidrataron en soluciones alcohólicas de concentración creciente (70, 96, 100 %, 30 seg en c/u). Finalmente se colocaron en xilol y se realizó el montaje en medio Permount (Fisher Scientific). Los preparados fueron observados con un microscopio Olympus CX31 equipado con una cámara Lumera Infinity Microscopy USB 2.0.

<b>Hematoxilina según Harrys</b>		<b>Eosina</b>	
Hematoxilina	5 g	Eosina	1 g
Alcohol 100	50 ml	Agua destilada	100 ml
Alumbre de K	100 g	Alcohol 96	780 ml
Agua destilada	920 ml	Floxilina B (1g/100ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> )	10 ml
Óxido rojo de Hg	2,5 g	Ácido acético	4 ml
Ácido acético	30 ml		

### **Evaluación del índice mitótico**

La evaluación del índice mitótico se llevó a cabo utilizando preparados teñidos con H&E. Para evaluarlo se contaron las figuras mitóticas típicas y atípicas en 10 campos de 400 X al azar. El índice mitótico fue calculado como la media de todas las figuras mitóticas observadas. Con el fin de que estas cuantificaciones fueran analizadas por un investigador con experiencia en las mismas y que desconociera el tratamiento al que fue sometido cada preparado, este análisis fue realizado por el médico patólogo Julián Arévalo.

## Inmunohistoquímica (IHQ)

Se realizó IHQ para analizar la expresión de p300 en las biopsias humanas y en biopsias de tumores y glándula mamaria normal de los distintos modelos animales. Además, en el modelo singeneico de inoculación de células LM3 se analizó la expresión de Bax y Ki-67 como indicadores de apoptosis y proliferación respectivamente. Inicialmente se colocaron los preparados en estufa a 55 °C por 30 min para fundir la parafina. Posteriormente los tejidos fueron desparafinados con xilol 100 % a 55 °C por 20 min y a temperatura ambiente por 10 min y rehidratados sumergiéndolos sucesivamente en etanol 100 % por 10 min, etanol 96 % por 10 min a temperatura ambiente y en un baño final de peróxido de hidrógeno 3 % en alcohol al 96 % con el fin de eliminar la actividad peroxidasa endógena. Los preparados fueron lavados 2 veces con PBS por 5 min y fueron bloqueados con una solución de BSA 2 % en PBS durante 30 min en una cámara húmeda. Luego fueron incluidos en una solución de anticuerpo primario diluido en BSA 2 % disuelta en PBS a 4 °C durante la noche. En todos los casos el mismo proceso fue aplicado sobre un preparado control en ausencia del anticuerpo primario. Posteriormente fueron lavados 3 veces con PBS durante 5 min y fueron incubados con una dilución 1/400 del anticuerpo secundario (anti conejo o anti cabra biotinilado según corresponda) preparado en BSA 2 % disuelta en PBS a temperatura ambiente por 30 min en cámara húmeda. Al mismo tiempo se preparó el reactivo ABC Vectastain (Vector Laboratories) en PBS, dilución 1/50, dejándolo reaccionar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min antes de su utilización. Los preparados fueron lavados 3 veces con PBS durante 5 min, fueron incubados con el reactivo AB a temperatura ambiente durante 30 min en cámara húmeda en oscuridad y posteriormente se realizaron 3 lavados finales con PBS por 5 min. Se preparó el reactivo de diaminobencidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) y posteriormente se agregaron bajo el microscopio óptico 200 µl del mismo sobre el tejido, controlando el desarrollo de la reacción. Como coloración de contraste fue realizada una tinción con hematoxilina de Meyer (Zymed) por 1 min 30 seg. Finalmente los tejidos fueron deshidratados efectuando inmersiones consecutivas de los mismos en baños de etanol 70 %, 96 % y 100 % respectivamente durante 4 min y fueron aclarados con xilol 100 %. Se

montaron en medio Permunt (Fisher Scientific) y se dejaron secar hasta el día siguiente para ser analizadas con microscopio de campo claro. Se examinaron con un microscopio Olympus (CX31). Los anticuerpos primarios usados fueron: policlonal de conejo anti-p300 (sc-584 and 585), policlonal de cabra anti-Ki-67 (sc-7846) y policlonal de conejo anti- Bax (sc-493), de Santa Cruz Biotechnology.

### **Evaluación de la inmunomarcación**

Con el fin de que estas cuantificaciones fueran analizadas por un investigador con experiencia en las mismas y que desconociera el tratamiento al que fue sometido cada preparado, las muestras fueron evaluadas y semicuantificadas por el médico patólogo Julián Arévalo. Para semicuantificar la expresión de p300 se tuvo en cuenta el número de células teñidas y la intensidad de la tinción, usando el *score* inmunoreactivo (IRS) sugerido por Remmele y Stegner (Remmele & Stegner, 1987). El IRS es el producto de la intensidad de tinción por el porcentaje de las células teñidas. Se utilizó el siguiente criterio para la intensidad de la tinción: 0 (negativo); 1 (tinción débil); 2 (tinción moderada) y 3 (tinción fuerte). Se graduó entre 1 y 4 el porcentaje de células teñidas, siendo 1  $\leq$  25 %; 2 entre 26 % y 50 %; 3 entre 51 % y 75 % y 4  $\geq$  76 %. La semicuantificación de la IHQ para Bax y Ki-67 fue realizada utilizando el mismo IRS pero con un intervalo menos en los porcentajes de células (0  $\leq$  10 %; 1 entre 11 y 50 %; 2 entre 51 y 75 % y 3  $\geq$  76 %). En todos los casos se semicuantificó el IRS en 10 campos al azar de 400 X y luego se realizó el promedio.

Para semicuantificar la localización subcelular de p300, se contó el número de células con localización nuclear, con localización citoplasmática y con localización nuclear y citoplasmática al mismo tiempo en 10 campos al azar de 400 X y luego se promediaron los porcentajes.

### **Biopsias de neoplasias humanas**

Se utilizaron 101 muestras de biopsias de carcinoma mamario para analizar la expresión de p300 y su asociación con parámetros clínicopatológicos. Las muestras pertenecen al banco de tumores del laboratorio de Biología del Cáncer y provienen de varios hospitales de la ciudad de Bahía Blanca cuyos comités de ética y de investigación y docencia han aprobado los protocolos correspondientes. Parte del material de este banco de tumores consiste de cortes histológicos (5  $\mu\text{m}$ ) realizados a partir de los tacos de parafina conteniendo los tejidos provenientes de las biopsias que son usualmente conservados en los servicios de patología de estos hospitales. Una sección de cada muestra fue teñida con hematoxilina y eosina y el diagnóstico inicial fue confirmado por el médico patólogo Julián Arévalo. Además, se evaluó la calidad de los cortes, prestándose atención tanto a la adecuada fijación del material como a la presencia de zonas con lesión representativa. Los pacientes a los que se les realizaron las biopsias de las cuales se obtuvieron estas muestras no recibieron tratamiento previo a la realización de las mismas. Se disponía de los siguientes datos clínicos e histopatológicos: edad al momento de la cirugía, *status* fumador, compromiso ganglionar, recaída de la paciente; estadio, TNM, grado histológico (GH), grado nuclear (GN), índice mitótico (IM), RE, RP, Her2 del tumor.

Para los estudios de la expresión de p300 en biopsias de carcinoma mamario triple negativo (TN) se utilizaron 40 muestras, 12 de las cuales provienen de las 101 muestras de biopsias de CM humano anteriormente mencionadas, y las 28 restantes fueron obtenidas del Servicio de Oncología del Hospital Italiano regional del Sur. Se disponía de los siguientes datos clínicos e histopatológicos: edad, estado hormonal, recaída, compromiso ganglionar, tamaño tumoral, estadio, GN, GH, IM, RE, RP, Her2.

## **Análisis estadístico**

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estándar (SD) de “n” experimentos independientes. Para los ensayos de viabilidad celular, migración celular, y cambios en el volumen

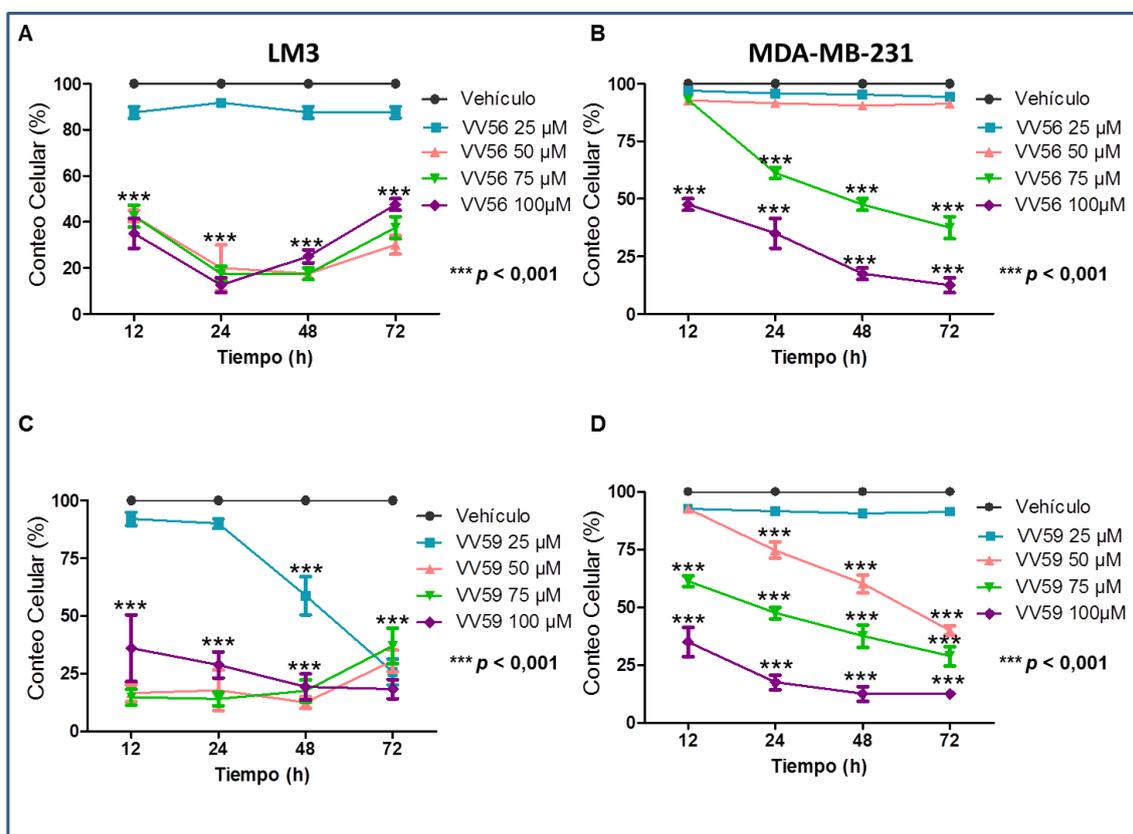
tumoral en el tiempo se realizó un ANOVA de dos vías con posterior test de Bonferroni para la comparación de los grupos. Para los ensayos con modelos animales en los que se midió peso y volumen tumoral, y el número de metástasis se utilizó el test no paramétrico de Mann Whitney. En biopsias humanas se utilizaron los test de Mann Whitney y Chi-cuadrado. Además, para evaluar las diferencias en las curvas de sobrevida global de las pacientes en relación a la expresión de p300 se utilizó el test Log-rank (Mantel-Cox). El análisis multivariado se basó en el modelo de riesgo proporcional (Cox). En los estudios realizados en carcinomas mamarios TN también se utilizó el test de correlación no paramétrico de Spearman. Los valores  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

## RESULTADOS

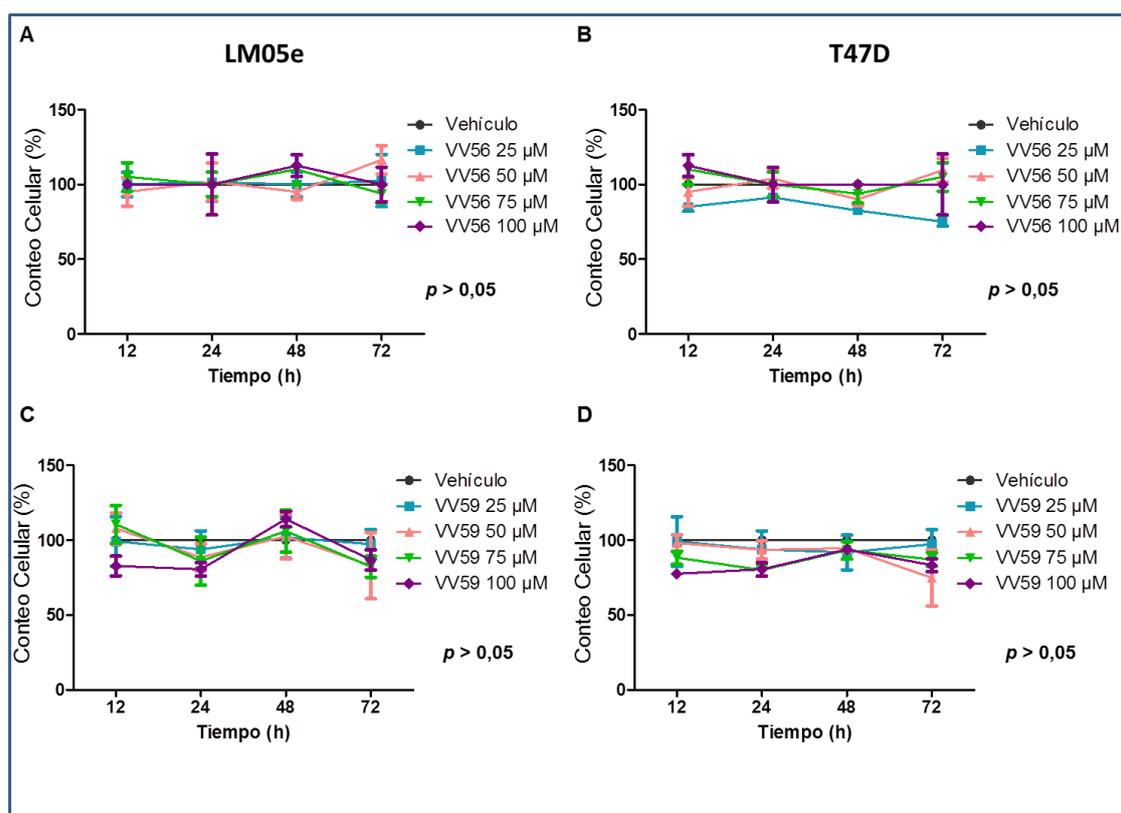
### **La inhibición de p300 disminuye la supervivencia celular de las líneas LM3 y MDA-MB-231 pero no afecta la de las líneas LM05e y T47D.**

Uno de los primeros estudios que se llevan a cabo normalmente con el fin de comenzar a evaluar si una molécula presenta un rol en la progresión tumoral es determinar su efecto sobre la “supervivencia celular” en células en cultivo. A falta de un término mejor al de supervivencia celular y teniendo en cuenta la variación que hay en la bibliografía en la utilización de este concepto aquí se aclara que se entiende como tal a las alteraciones en el número de células de una población celular que pueden ser producidas por variaciones de los procesos de proliferación celular (regulación del ciclo celular) y/o apoptosis. Para evaluar este parámetro utilizamos el ensayo colorimétrico de WST-1 con posterior conteo manual empleando una cámara de Neubauer. Se realizaron ensayos tiempo y dosis respuesta en las líneas hormono independiente LM3 (murina) y MDA-MB-231 (humana) y en las líneas hormono dependientes LM05e (murina) y T47D (humana). Las líneas fueron tratadas con 2 inhibidores específicos de p300, a saber: VV56 y VV59. Los tiempos de incubación fueron 12, 24, 48, 72 h y las concentraciones 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$ . Estas concentraciones fueron elegidas en base a los resultados presentados en la publicación que describe la síntesis de estos inhibidores y sus efectos en la línea MCF7 (Eliseeva et al, 2007). En las células LM3 tratadas con VV56 se observó una disminución en la absorbancia con el ensayo colorimétrico WST-1 y en el número de células a partir del primer tiempo estudiado que fue a las 12 h y con concentraciones mayores o iguales a 50  $\mu\text{M}$  respecto a su vehículo (figura 8 A). En las células MDA-MB-231 tratadas con VV56 también se observó una disminución de la supervivencia celular tanto con el ensayo WST-1 como con el conteo manual. El efecto se observó a partir de las 24 h con una concentración de 75  $\mu\text{M}$  y a partir del primer tiempo estudiado que fue a las 12 h y con concentraciones mayores o iguales a 100  $\mu\text{M}$  (figura 8 B). Cuando las

células fueron tratadas con el otro inhibidor VV59 el efecto fue aún mayor, observándose una disminución del número de células LM3 a partir de una concentración de 25  $\mu\text{M}$  y 48 h post-tratamiento respecto al vehículo (figura 8 C). También el efecto fue mayor en las MDA-MB-231 observándose una disminución del número de células a partir de una concentración de 50  $\mu\text{M}$  y 24 h post-tratamiento respecto al vehículo (figura 8 D). Por otro lado, en las LM05e y en las T47D no se observó efecto sobre la supervivencia celular ni con el ensayo WST-1 ni con el conteo celular cuando fueron tratadas con VV56 o VV59 (figura 9 A - D). Como se observó un mayor efecto inhibitorio con VV59 en las células LM3, decidimos utilizar este inhibidor y línea celular para continuar y profundizar los estudios.



**Figura 8. Análisis de la supervivencia celular luego del tratamiento de las células LM3 y MDA-MB-231 con los inhibidores VV56 y VV59.** Ensayo de supervivencia celular sobre las líneas LM3 (A y C) y MDA-MB-231 (B y D) tratadas con VV56 o VV59. Las concentraciones y tiempos usados fueron 25, 50, 75, 100  $\mu\text{M}$  y 12, 24, 48 y 72 h, respectivamente. El número de células fue obtenido en cámara de Neubauer como fue descrito en la sección de métodos. Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  SD. El ensayo fue repetido 2 veces. Se realizó ANOVA con posterior test de Bonferroni, \*\*\*  $p < 0,001$ .



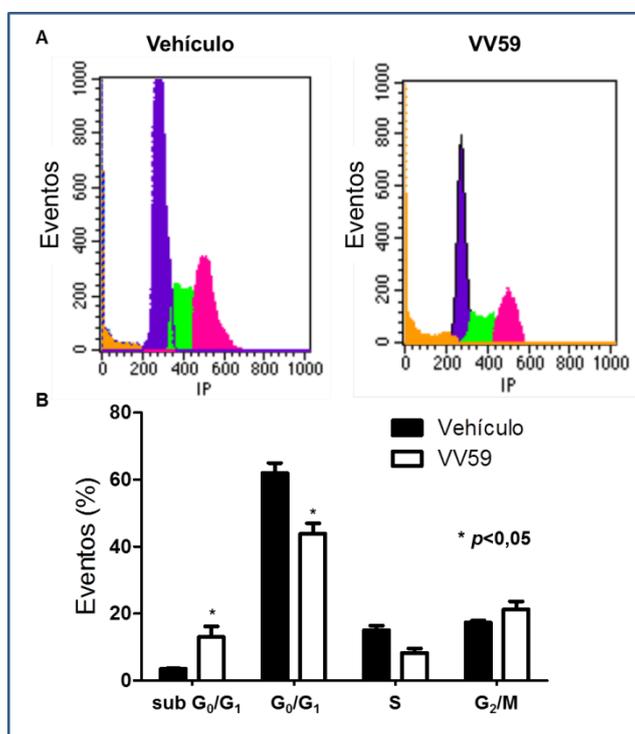
**Figura 9. Análisis de la supervivencia celular luego del tratamiento de las células LM05e y T47D con los inhibidores VV56 y VV59.** Ensayo de supervivencia celular sobre las líneas LM05e (A y C) y T47D (B y D) tratadas con VV56 o VV59. Las concentraciones y tiempos usados fueron 25, 50, 75, 100 μM y 12, 24, 48 y 72 h, respectivamente. El número de células fue obtenido en cámara de Neubauer como fue descrito en la sección de métodos. Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones ± SD. El ensayo fue repetido 2 veces. Se realizó ANOVA con posterior test de Bonferroni,  $p > 0,05$ .

## La inhibición de p300 induce apoptosis en la línea celular LM3.

Como es sabido, la variación en el número de células de una población tumoral puede deberse a modificaciones en la regulación del ciclo celular (que conducen a una modificación correspondiente de la proliferación celular) o a variaciones en el número de células sufriendo muerte celular. Teniendo esto en cuenta y el hecho que la inhibición de p300 produjo una disminución de la supervivencia celular en la línea celular LM3, los siguientes experimentos tuvieron como objetivo dilucidar los mecanismos celulares subyacentes a este

efecto. Es decir, a investigar si la inhibición de esta proteína estaba afectando al control del ciclo celular (y por lo tanto a la proliferación), a la apoptosis o a ambos.

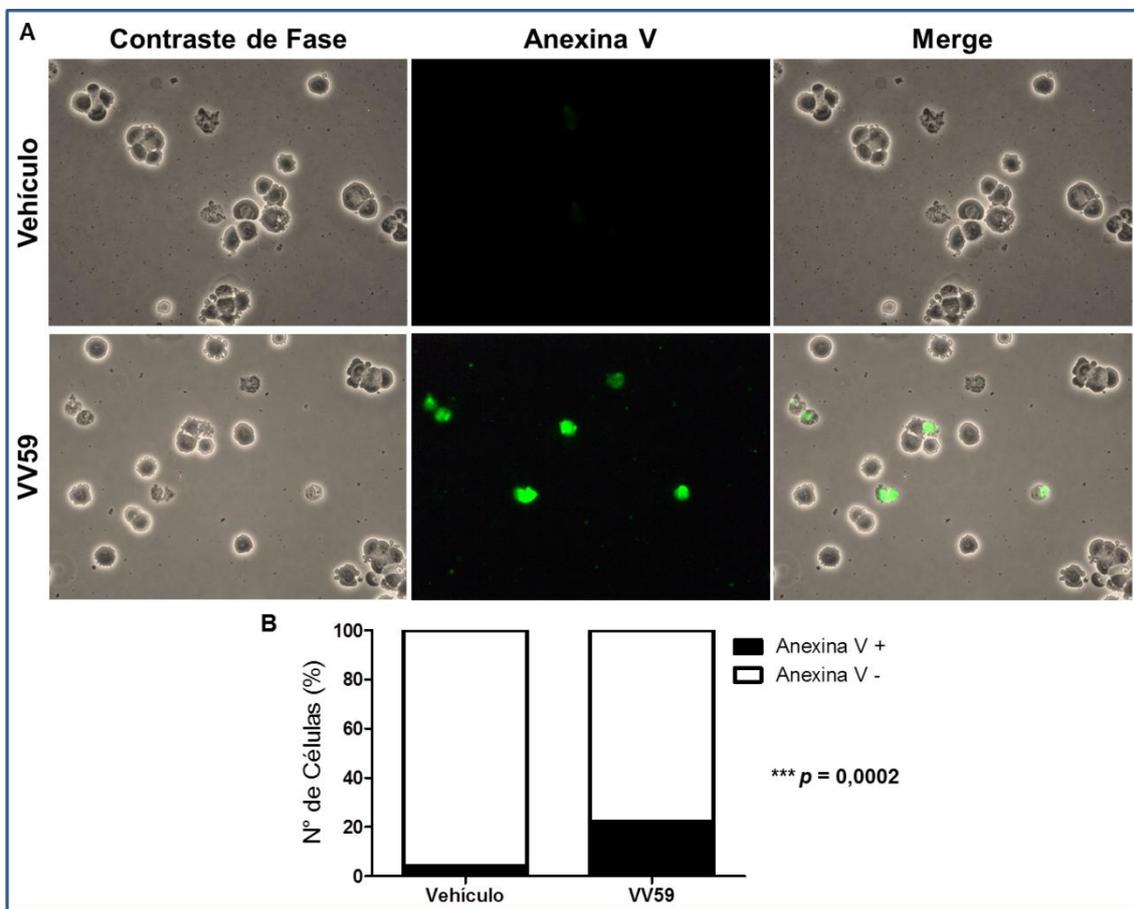
Se analizó en primera instancia el efecto de la inhibición de p300 sobre la progresión del ciclo celular. Para ello las células LM3 pre-tratadas con el inhibidor VV59 se sometieron al análisis de la distribución de las poblaciones celulares en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo usando la tinción con IP. En primer lugar se realizaron controles positivos y negativos para poner a punto la técnica con esta línea celular. Coincidiendo con los efectos observados sobre la supervivencia celular, el tratamiento con VV59 (50  $\mu$ M) indujo un aumento de la población de células en sub  $G_0/G_1$  respecto al vehículo (13,1 % vs 3,57 %;  $p < 0,05$ ) (figura 10) sugiriendo que la disminución en la supervivencia celular originalmente observada puede deberse a un aumento de la muerte celular por apoptosis. Esto sumado a la ausencia de un incremento de células en fase  $G_0/G_1$  indicaría que la inhibición de p300 no induce un arresto del ciclo celular (disminución de la proliferación).



**Figura 10. Análisis de la distribución de células LM3 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo.** Las células fueron expuestas al inhibidor VV59 (50  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) por 24 h. A. Distribución de la población celular analizada por citometría de

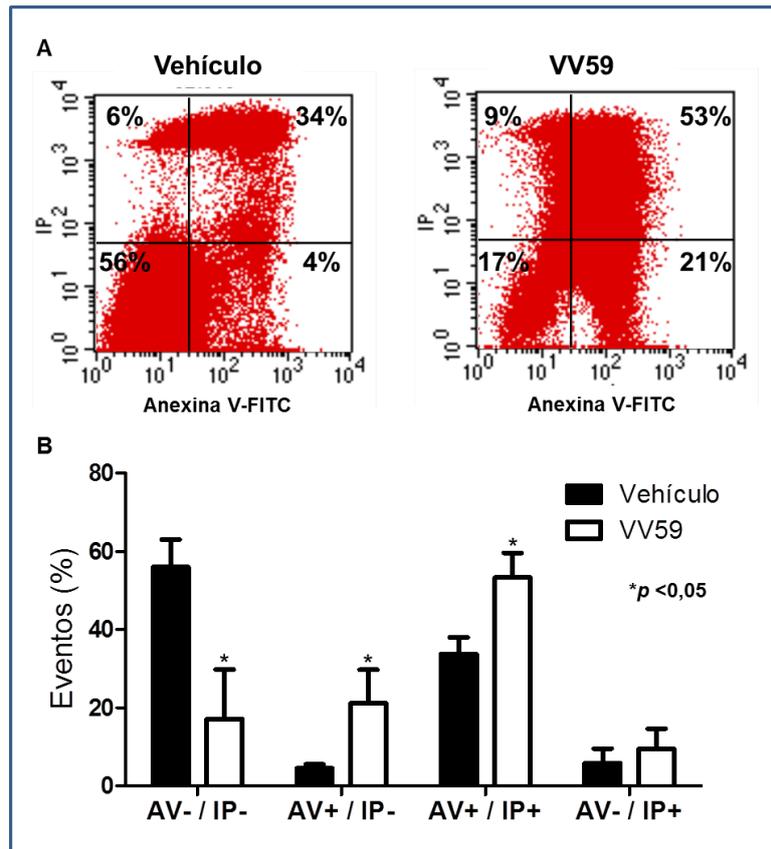
flujo luego de la tinción con IP. B. El gráfico representa el porcentaje de células en las fases indicadas. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones  $\pm$  SD. El ensayo fue repetido 3 veces. Se realizó ANOVA con posterior test de Bonferroni, \*  $p < 0,05$ .

Con el objeto de corroborar si el incremento en la población celular en sub  $G_0/G_1$  producido por el tratamiento con el inhibidor VV59 se debía a un aumento de la muerte celular por apoptosis se marcaron las células con anexina V (AV) luego del tratamiento con el mismo inhibidor y se cuantificaron por medio de microscopía. Al realizar la cuantificación por microscopía se observó que el inhibidor VV59 indujo un aumento en el número de células con marcación positiva para anexina V respecto del control ( $p = 0,0002$ , figura 11).



**Figura 11. Cuantificación por microscopía de fluorescencia de las células LM3 marcadas con anexina V.** Las células LM3 fueron expuestas al inhibidor VV59 (50  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) por 24 h. A. fotos representativas del ensayo mostrando aumento de marcación con anexina V en las células tratadas con VV59 respecto el vehículo, aumento de 400 X.B. El gráfico muestra el porcentaje de células con marcación positiva y negativa para anexina V en las células tratadas con VV59 y en el control; \*\*\* $p < 0,001$ , test Chi- cuadrado.

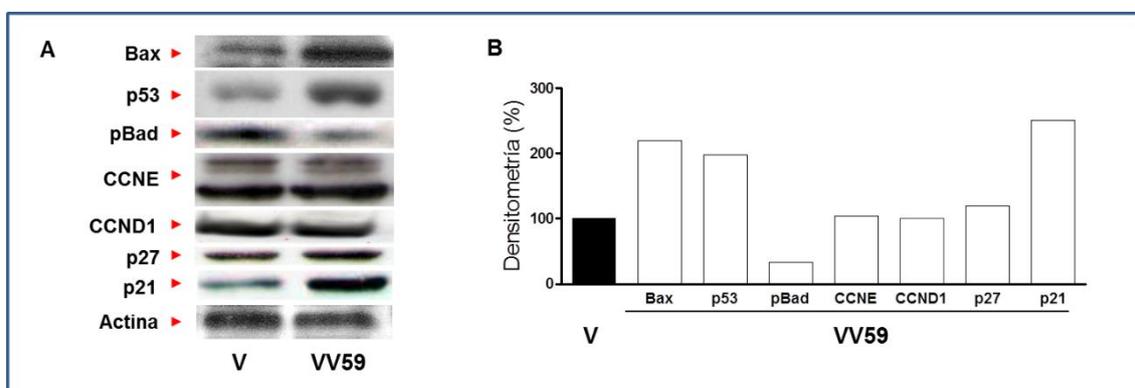
Para confirmar este último resultado se realizó el mismo tratamiento, se marcaron las células con anexina V e ioduro de propidio y se cuantificaron por citometría de flujo. La población apoptótica (AV+ / IP-) se incrementó de 4,57 % en las células tratadas con vehículo a 21,15 % en las células tratadas con VV59 (figura 12 A y B).



**Figura 12. Cuantificación de las células marcadas con anexina V e ioduro de propidio por citometría de flujo.** Las células fueron tratadas con 50  $\mu$ M de VV59 o vehículo (DMSO) por 24 h. A. Distribución de las células marcadas con AV e IP por citometría de flujo. B. El gráfico representa el porcentaje de células con las marcaciones indicadas. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones  $\pm$  SD. El ensayo fue repetido 3 veces. Se realizó ANOVA con posterior test de Bonferroni, \*  $p < 0,05$ .

Todos estos resultados demuestran que la inhibición de p300 disminuye la supervivencia celular mediante inducción de la apoptosis. Cabe destacar que además se detectó un aumento de la cantidad de células marcadas con anexina V e ioduro de propidio que puede estar indicando un incremento de apoptosis tardía o necrosis inducida por el tratamiento con el inhibidor (figura

12 B). A continuación se decidió investigar si la inhibición de p300 alteraba los niveles de algunas de las proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis. Para ello se estudió la expresión de p21, p53, pBad y Bax. Para descartar totalmente un efecto de la inhibición de p300 sobre la proliferación celular también se analizaron los niveles de p27 y ciclinas. Se observó que la inhibición de p300 provoca un aumento de los niveles proteicos de p21, p53 y Bax y una disminución de los niveles de pBad. Por el contrario, los niveles de p27 y ciclinas E y D1 no se vieron afectados (figura 13). Estos resultados junto con los anteriormente mencionados demuestran que la inhibición de p300 produce una inducción del proceso apoptótico y sugieren que no tiene efectos sobre la proliferación celular.

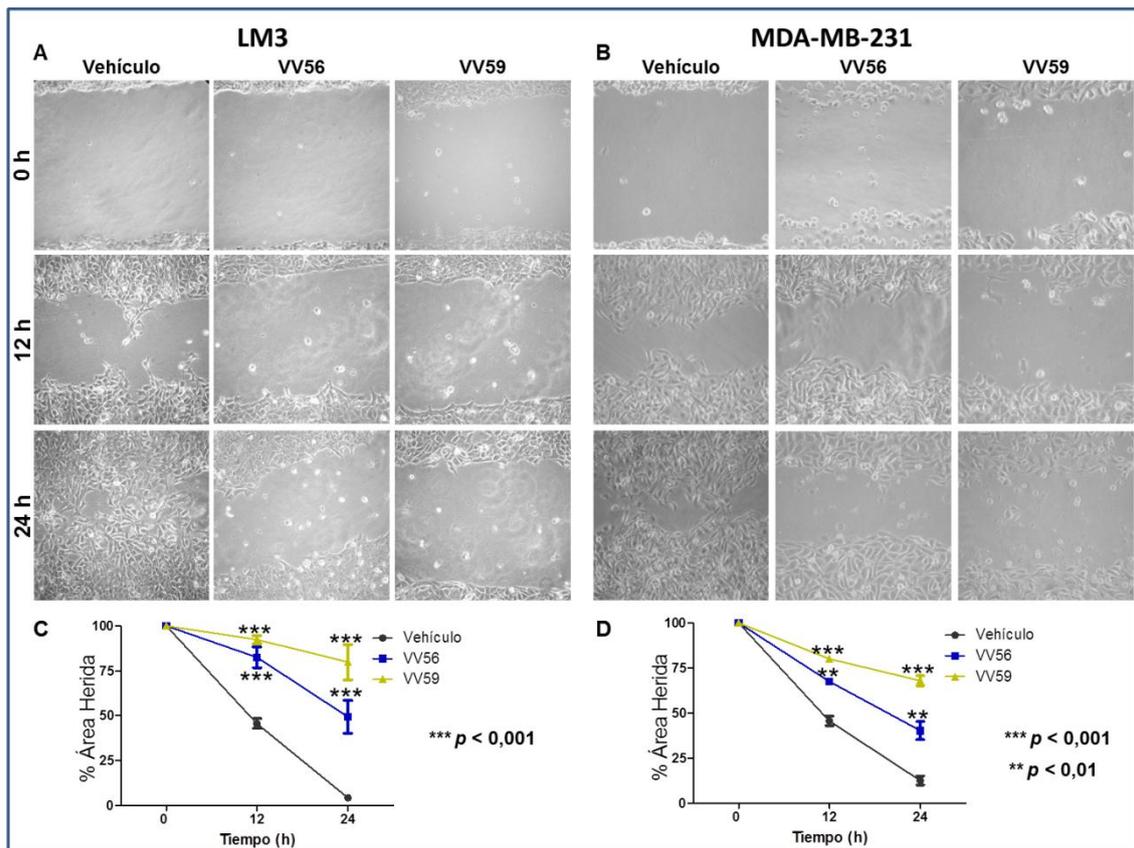


**Figura 13. Estudio de la expresión de proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular y la apoptosis.** A. Análisis de los niveles de Bax, p53, pBad, ciclina E (CCNE), ciclina D1 (CCND1), p27 y p21 por WB. Las células LM3 fueron tratadas por 24 h con VV59 (50  $\mu$ M) o vehículo (DMSO). B. El gráfico de barras muestra la correspondiente densitometría de bandas. Los resultados fueron normalizados con actina. Los ensayos fueron repetidos 3 veces en cada caso.

## **La inhibición de p300 disminuye la migración celular de las líneas LM3 y MDA-MB2-31, pero no afecta la migración celular de las líneas LM05e y T47D.**

Dado que una de las capacidades adquiridas por las células cancerosas es la capacidad de invasión y sabiendo que hay evidencia que sugiere que p300 es importante en el proceso de migración celular en varios tipos celulares

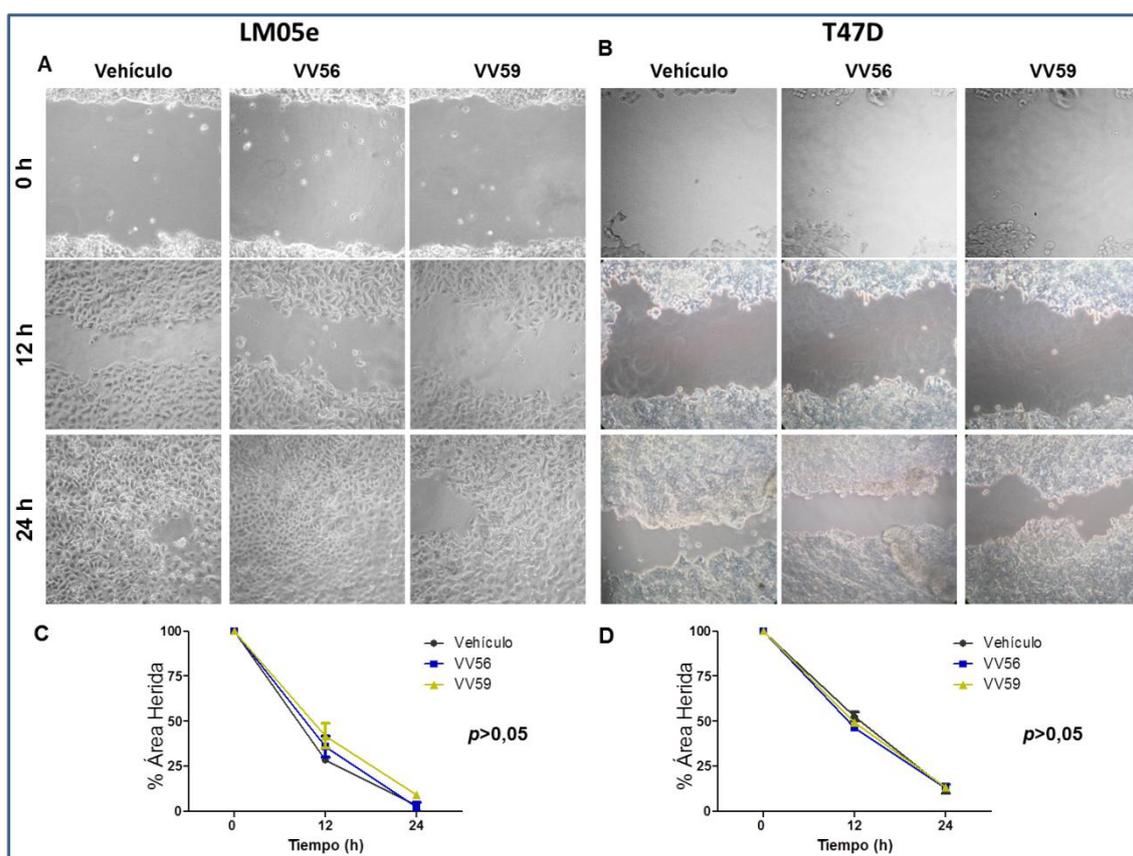
tumorales (Zhou et al, 2014), nos propusimos evaluar el efecto de p300 sobre la migración celular en las células LM3, MDA-MB-231, LM05e y T47D a través del ensayo de cierre de la herida (*wound healing*). Se utilizaron los inhibidores VV56 y VV59 a una concentración menor (12,5  $\mu$ M) que la concentración más baja a la que se observó efecto sobre la supervivencia celular (50  $\mu$ M). Las células LM3 tratadas con vehículo cerraron la herida dentro de las 24 h (área no cubierta 5,18 %) mientras que las células tratadas con VV56 o VV59 presentaron un área no cubierta significativamente mayor en el mismo tiempo transcurrido (50,6 % y 75 % respectivamente,  $p < 0,001$ ; figura 14 A y C). Un resultado similar se obtuvo con las células MDA-MB-231 siendo el área no cubierta a las 24 h de 12,5 % para las células tratadas con vehículo comparado con 40,28 % y 67,97 % para las células tratadas con VV56 y VV59 respectivamente (VV56:  $p < 0,01$  y VV 59:  $p < 0,001$ ; figura. 14 B y D).



**Figura 14. Ensayo de migración celular en las líneas LM3 y MDA-MB-231 tratadas con los inhibidores de p300.** Se evaluó la migración celular luego de la inhibición de p300 con VV59 o VV56 (12,5  $\mu$ M) sobre las líneas celulares LM3 y MDA-MB-231 durante 24 h utilizando el ensayo de la herida. A y B. Se muestran fotos representativas a los distintos tiempos analizados. C y D. Gráficos mostrando el porcentaje descubierto del área de la herida. Se

representa el promedio de cuatro heridas para cada ensayo  $\pm$  SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se realizó ANOVA con posterior test de Bonferroni, \*\*\*  $p < 0,001$  y \*\*  $p < 0,01$ .

Contrariamente, las células de las líneas LM05e y T47D tratadas con los inhibidores VV56 o VV59 no evidenciaron alteración de la migración celular, mostrando la misma velocidad de migración que las células tratadas con vehículo ( $p > 0,05$ ; figura 15).



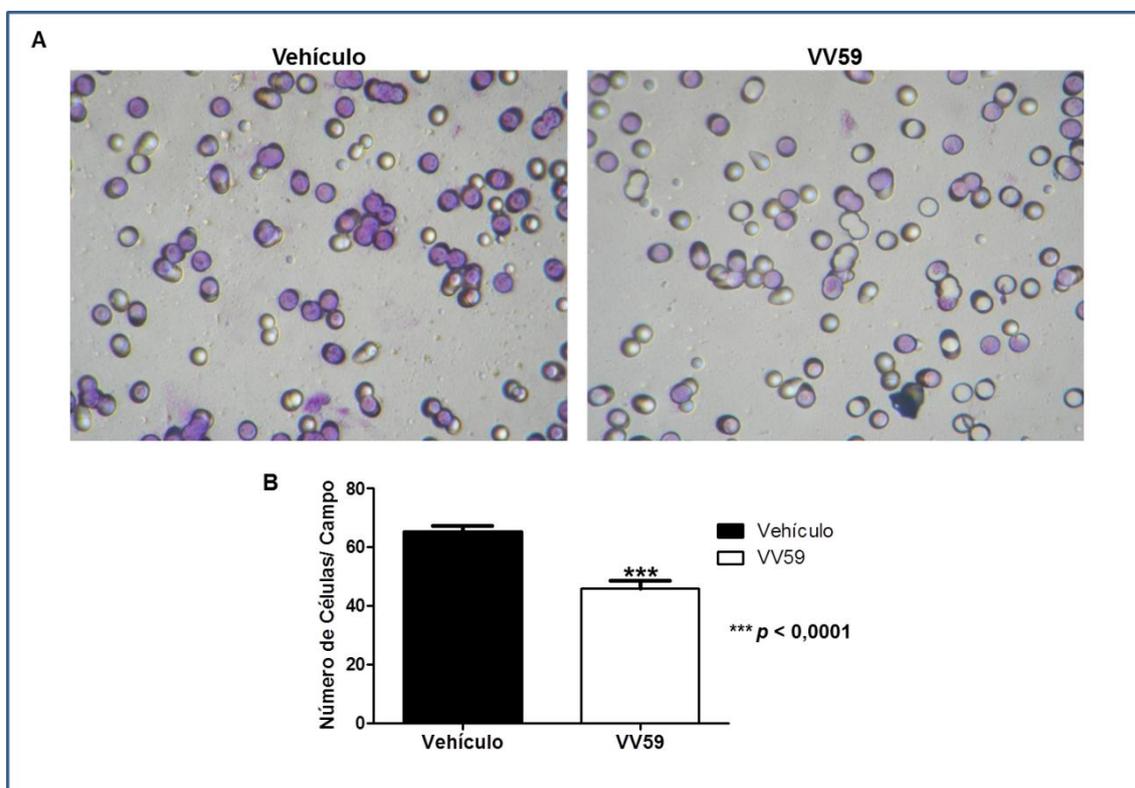
**Figura 15. Ensayo de migración celular en las líneas LM3 y MDA-MB-231 tratadas con los inhibidores de p300.** Se evaluó la migración celular luego de la inhibición con los inhibidores VV59 o VV56 (12,5  $\mu$ M) sobre las líneas celulares LM05e y T47D durante 24 h mediante el ensayo de la herida. A y B. Se muestran fotos representativas a los distintos tiempos analizados. C y D. Gráficos mostrando el porcentaje descubierto del área de la herida. Se representa el promedio de cuatro heridas para cada ensayo  $\pm$  SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se realizó ANOVA con posterior test de Bonferroni,  $p > 0,05$ .

Al igual que lo observado en el estudio de la supervivencia celular el mayor efecto inhibitorio fue observado con el inhibidor VV59 por lo que se decidió

continuar con los ensayos de invasión celular utilizando este inhibidor en la línea LM3.

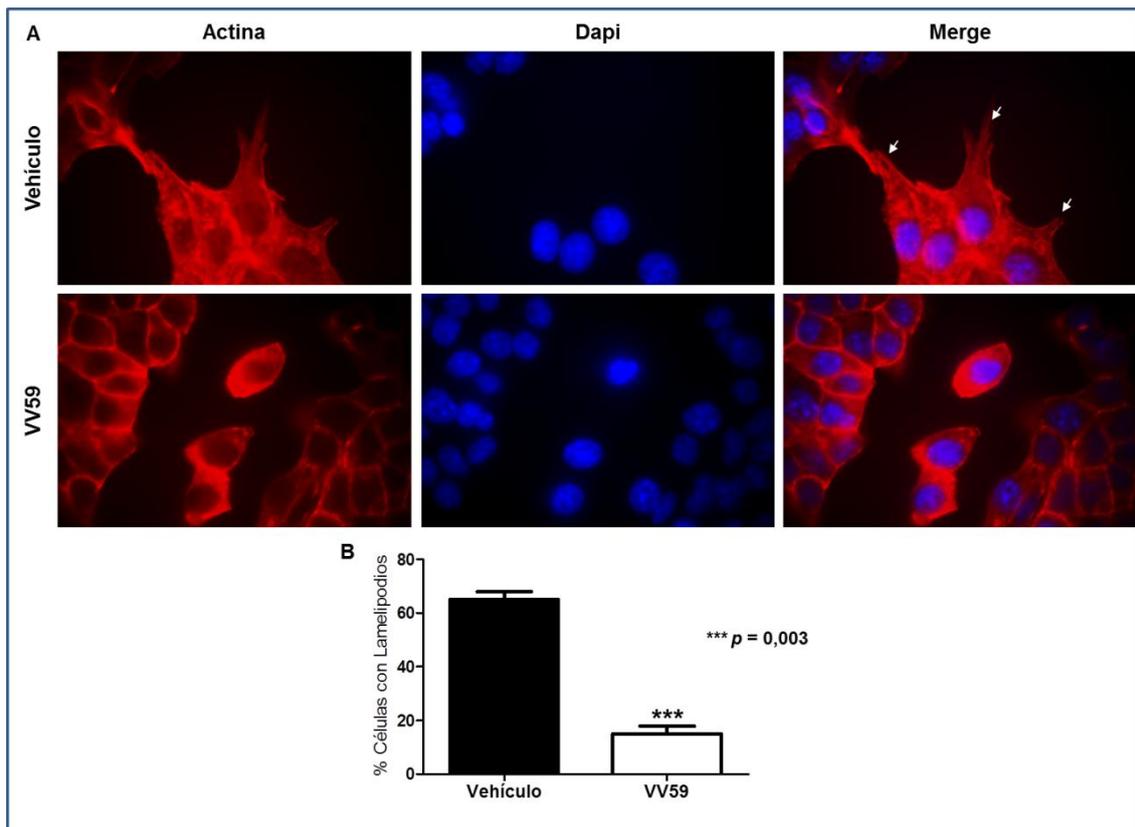
## La inhibición de p300 disminuye la invasión celular y la formación de lamelipodios en la línea celular LM3.

Teniendo en cuenta que la inhibición de p300 reduce la migración en la línea celular LM3 y sabiendo que el proceso de metástasis requiere tanto de un incremento en la capacidad migratoria de las células tumorales como de su capacidad invasión, se realizaron ensayos de invasión celular para estudiar los efectos de la inhibición de p300 sobre este proceso. Con este objetivo se utilizó un ensayo que detecta la capacidad de las células para atravesar una membrana cubierta con Matrigel® tal como se describió en materiales y métodos. El tratamiento con el inhibidor VV59 redujo significativamente la capacidad invasiva de las células de la línea LM3 en comparación con su control (figura 16) (media  $\pm$  SD del control =  $65,36 \pm 1,90$ , media  $\pm$  SD del VV59 =  $45,85 \pm 2,55$ ;  $p < 0,0001$ ).



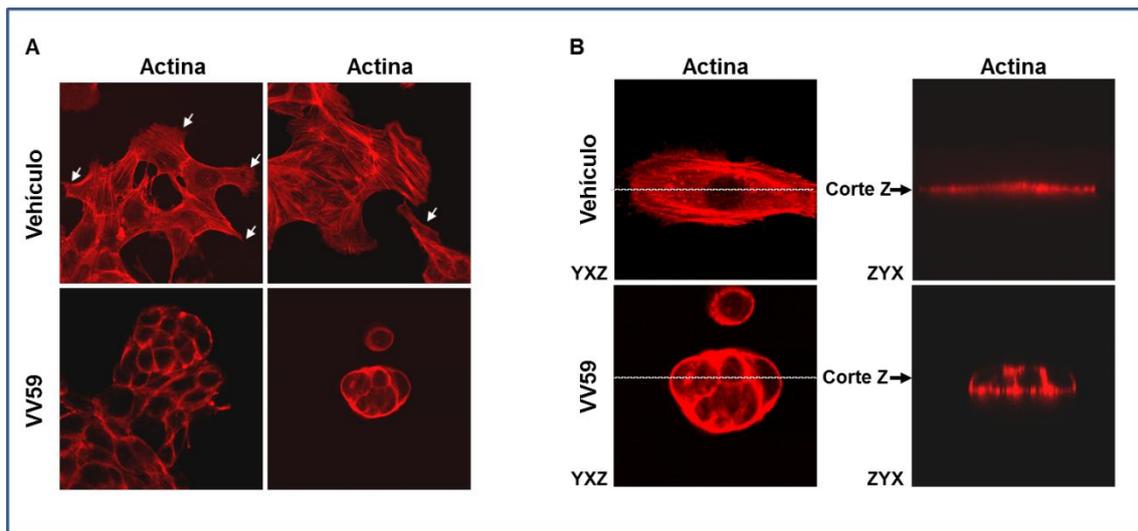
**Figura 16. Ensayo de invasión celular en células LM3 tratadas con el inhibidor VV59.** La invasión de las células fue cuantificada usando insertos recubiertos con Matrigel en las cámaras de cultivo. Las células se sembraron en las cámaras superiores de los insertos en presencia del vehículo (control) o del inhibidor VV59 (12,5  $\mu$ M, 24 h) y aquellas que habían atravesado el Matrigel y migrado a la cara inferior de los insertos se contaron por microscopía óptica. A. fotos representativas del ensayo mostrando las células que atravesaron el Matrigel. B. cuantificación de las células en la cara inferior del inserto de Matrigel. Los resultados representan la media de ocho campos  $\pm$  SD. Se utilizó el test de Student,\*\*\*  $p < 0,0001$ .

La migración de las células epiteliales se caracteriza por la rápida reorganización de la actina del citoesqueleto en los bordes de las células, resultando en la protrusión de lamelipodios en el frente de avance. Por lo tanto, y habiendo observado el efecto de la inhibición de p300 sobre la migración e invasión de las células de la línea celular LM3, se decidió analizar si el tratamiento con el inhibidor VV59 afectaba la formación de lamelipodios marcando los filamentos de actina con faloidina. Se observó una disminución significativa del número de lamelipodios cuando las células LM3 fueron tratadas con VV59 (12,5  $\mu$ M, 12 h) (figura 17).



**Figura 17. Análisis de la formación de lamelipodios mediante la marcación del citoesqueleto de actina con faloidina.** Las células fueron tratadas con DMSO (vehículo) o el inhibidor VV59 (12,5  $\mu$ M). Después de 12 h, las células fueron fijadas, marcadas con faloidina y las imágenes adquiridas con microscopio de fluorescencia. A. fotos representativas del ensayo, las flechas blancas indican lamelipodios en las células de los bordes de las acumulaciones celulares. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y la actina con faloidina (rojo), aumento de 600 X. B. cuantificación de las células con presencia y ausencia de lamelipodios. Se tomaron diez imágenes al azar con 7-8 células por campo y por cada tratamiento. Los valores graficados son la medias  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Test de Student, \*\*\*  $p = 0,003$ .

Para poder observar la estructura del citoesqueleto con mayor detalle se estudiaron las células tratadas con el inhibidor VV59 y marcadas con faloidina con el microscopio confocal (figura 18). Además de la diferencia ya citada en la cantidad de lamelipodios, se pudo observar que las células tratadas con el inhibidor tenían un cambio en su morfología siendo de menor tamaño y más redondeadas que las células control (figura 18).



**Figura 18. Análisis de la morfología celular mediante la marcación del citoesqueleto de actina con faloidina.** Las células fueron tratadas como se describe en la leyenda de la figura 17 y observadas al microscopio confocal. A: Las flechas blancas indican lamelipodios. Nótese el aspecto diferente del citoesqueleto y la diferencia en la morfología celular producida por el tratamiento con el inhibidor VV59. B: fotografiadas en un corte en el plano Z. objetivo 63X, zoom electrónico 1.90.

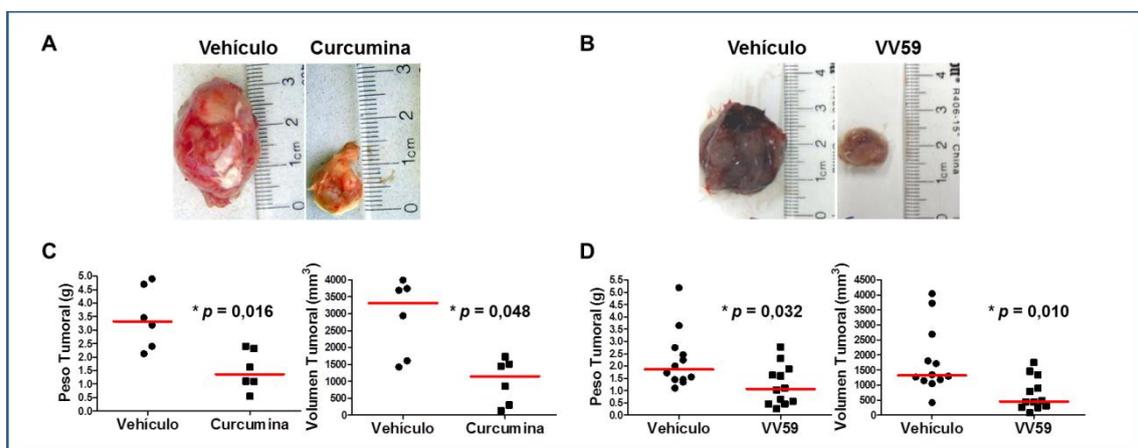
En conclusión, se ha podido observar que la inhibición de p300 induce una disminución de la migración, de la invasión celular y del número de lamelipodios acompañada de un cambio en la morfología celular. Por lo tanto, es de suponer que la actividad de p300 en células de carcinoma mamario estimularía el proceso de metástasis. Como se verá a continuación, esta hipótesis ha sido corroborada utilizando un modelo animal.

## **La inhibición de p300 reduce la carga tumoral, la invasión a la cavidad abdominal y el número de metástasis pulmonares en un modelo murino de carcinoma mamario.**

A continuación se investigó el efecto de p300 *in vivo*. Para ello se utilizó el modelo singeneico animal de implante subcutáneo de células LM3 en ratones hembra BALB/c (Urtreger et al, 1997). El objetivo de este estudio es contrastar la hipótesis de que el p300 tiene influencia en el desarrollo del carcinoma

mamario. Es obvio que el uso de dos inhibidores distintos aumenta la certeza de dicha contrastación ya que es improbable que dos inhibidores diferentes tengan efectos inespecíficos que conduzcan al mismo resultado. Como el inhibidor VV56 tiene ciertas similitudes estructurales con el VV59 se decidió utilizar un inhibidor radicalmente diferente tal como la curcumina, ampliamente citada por su actividad inhibidora del p300 (Balasubramanyam et al, 2004; Marcu et al, 2006; Chen Y et al, 2007; Morimoto et al, 2008; Sunagawa et al, 2014).

En primer término se evaluó el efecto de la inhibición de p300 sobre la carga tumoral para lo cual se realizó el tratamiento de los animales con los inhibidores ya citados tal como se describió en materiales y métodos. Luego del tratamiento los tumores fueron removidos, pesados y medidos. La carga tumoral disminuyó significativamente en los animales tratados con curcumina comparado con los ratones tratados con vehículo (mediana = 1,370 g versus mediana = 3,327 g,  $p = 0,016$  y mediana = 1.149 mm<sup>3</sup> versus mediana = 3.315 mm<sup>3</sup>,  $p = 0,048$ ; figura 19 A y C). Es importante el hecho que los mismos resultados fueron obtenidos cuando los animales fueron tratados con VV59. En este caso también se obtuvo una disminución significativa en el peso y en el volumen tumoral en los ratones tratados con el inhibidor (mediana = 1,065 g versus mediana = 1,860 g, respectivamente;  $p = 0,032$  y mediana = 456,4 mm<sup>3</sup> versus mediana = 1.321mm<sup>3</sup>,  $p = 0,010$ ; figura 19 B y D).



**Figura 19. Efecto de la inhibición del p300 sobre el crecimiento tumoral en el modelo de implante subcutáneo de células LM3 en ratones BALB/c.** Evaluación del efecto de la inhibición de p300 sobre la carga tumoral (peso y volumen). A y C. Los animales (N=12) fueron

tratados con 9 dosis (50 µg/kg) de curcumina o vehículo (DMSO) tal como se describió en materiales y métodos. A. Las fotos muestran tumores representativos de cada tratamiento luego de su disección. C. En los gráficos se representa la mediana del peso (gráfico de la izquierda) o volumen tumoral (gráfico de la derecha) de cada grupo. Se realizó el test de Mann Whitney. B y D. Los animales (N=24) fueron tratados con 9 dosis de 45 µg/Kg de VV59 o vehículo (DMSO). B. Las fotos muestran tumores representativos de cada tratamiento luego de su disección. D. En los gráficos se representa la mediana del peso (gráfico de la izquierda) o del volumen tumoral (gráfico de la derecha) de cada grupo. Se realizó el test de Mann Whitney, \*  $p < 0,05$ .

Como se describió previamente, la inhibición de p300 en las células de la línea celular LM3 produjo un incremento de la apoptosis sin afectar la proliferación celular. Se decidió entonces verificar si estos resultados se repetían *in vivo* conduciendo a la diferencia detectada en la carga tumoral. Con este objetivo se obtuvo el índice mitótico en cortes teñidos con H&E y se analizó la expresión de Bax y Ki-67 mediante inmunohistoquímica solamente de los tumores de los animales tratados con VV59. A diferencia de lo observado en los experimentos realizados con las células LM3 en cultivo, se pudo detectar una disminución significativa en el número de figuras mitóticas comparando los tumores de los ratones tratados con VV59 versus los tumores de los animales controles (mediana = 37,50 versus mediana = 50,00 figuras mitóticas por 10 campos, respectivamente, Mann Whitney,  $p = 0,045$ , figura 20 A y B).

Confirmando este último resultado también se observó una disminución de la expresión de Ki-67 en los tumores de los ratones tratados con el inhibidor respecto a los controles (mediana = 0,045 versus mediana = 3,375, respectivamente, Mann Whitney,  $p = 0,001$ , figura 20 C y D). Coincidiendo con los resultados obtenidos al inhibir las células de la línea LM3 en cultivo se observó un aumento de la expresión de Bax en los tumores de los ratones tratados con VV59 comparado con los tumores de los ratones tratados con su vehículo (mediana = 8,550 versus mediana = 4,400, respectivamente, Mann Whitney,  $p = 0,014$ , figura 20 E y F).

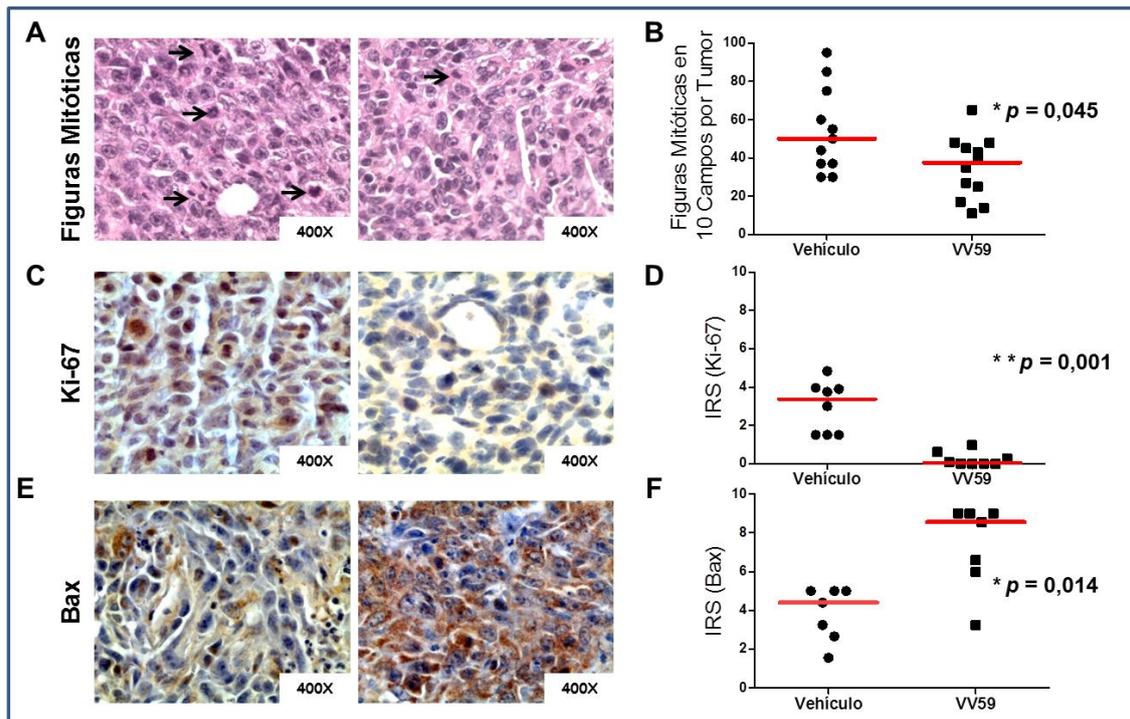
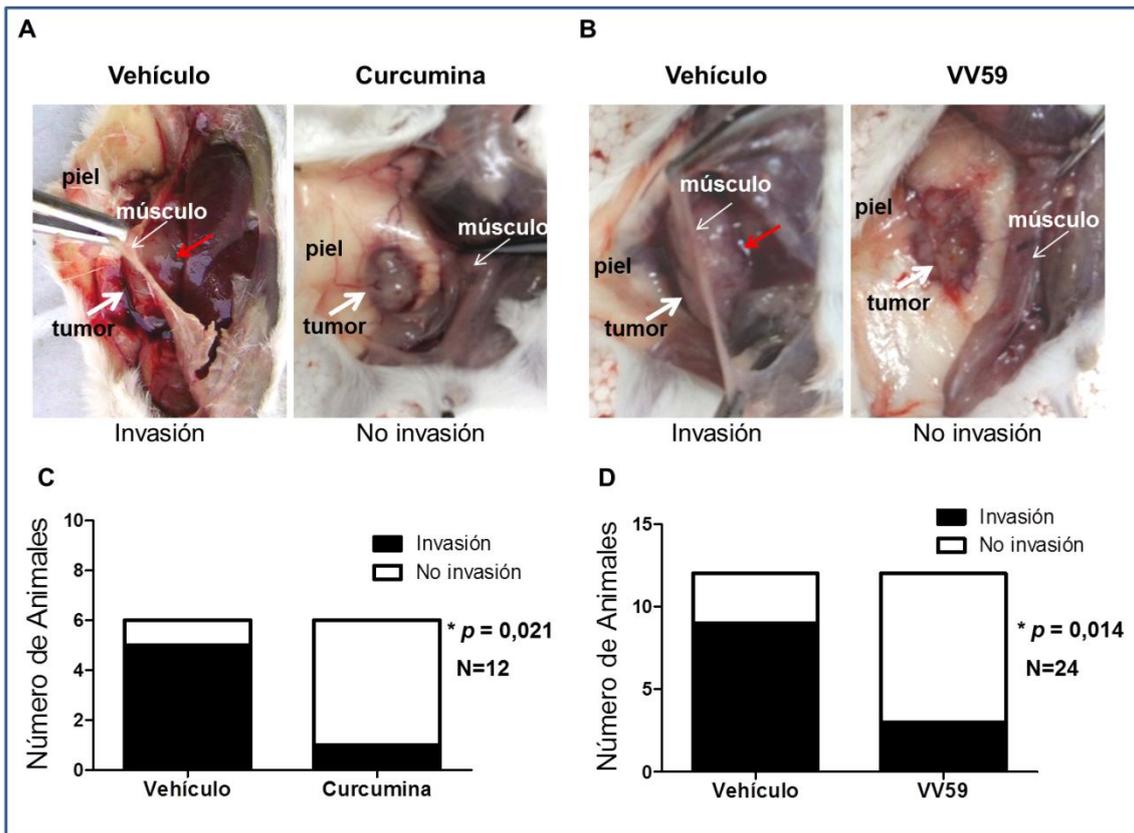


Figura 20. Efecto de la inhibición de p300 con VV59 sobre el índice mitótico, la expresión de Ki-67 y de Bax en el modelo de implante subcutáneo de células LM3 en ratones BALB/c. A, C y E. Se muestran fotomicrografías representativas de cortes teñidos con H&E (A), inmunomarcación de Ki-67 (C) y de Bax (E). B, D y F. Se muestran los gráficos con las respectivas cuantificaciones. En todos los casos se utilizó el test de Mann Whitney, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Estos resultados sugieren que la inhibición de p300 disminuye la carga tumoral mediante inducción de apoptosis y disminución de la proliferación celular.

Para que el tumor primario pueda crecer e incrementar su volumen debe ser capaz de degradar e invadir los tejidos que lo circundan. En este sentido es interesante destacar que se observó que un porcentaje significativamente menor de los tumores de los ratones tratados con curcumina (17 %) o VV59 (25 %) atravesó la pared muscular abdominal ingresando a la cavidad peritoneal comparado con los tumores de los animales tratados con vehículo (figura 21 A y B).

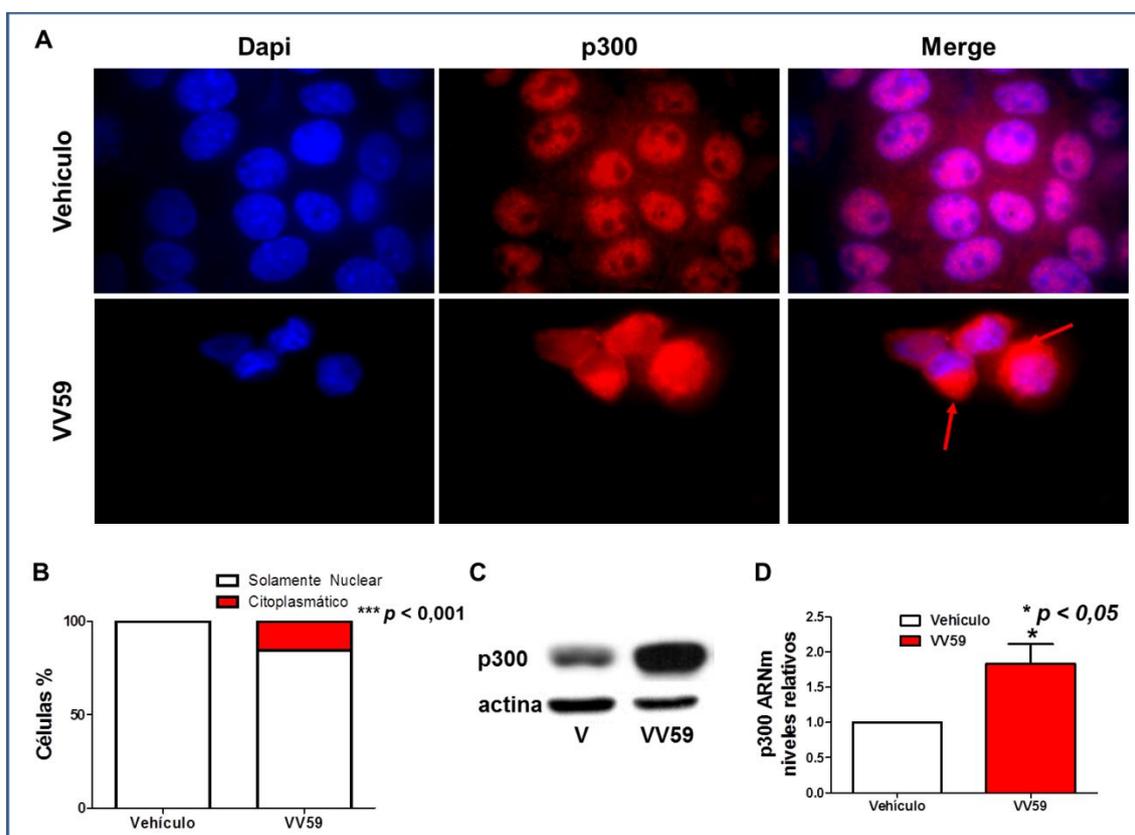


**Figura 21. Invasión del tumor primario a través de la pared de la cavidad abdominal en el modelo de implante subcutáneo de células LM3 en ratones BALB/c tratados con inhibidores de p300.** A y C. Animales tratados con curcumina. B y D. Animales tratados con VV59. A y B. Se muestran fotos representativas de tumores invadiendo la cavidad abdominal (izquierda) o sin invadirla (derecha). La flecha blanca gruesa señala el tumor en su ubicación subcutánea, la flecha blanca fina señala el músculo de la pared anterolateral abdominal (músculo) y la flecha roja señala la parte del tumor que atravesó la pared muscular. C y D se muestran los gráficos cuantificando la cantidad de animales en los que se observó presencia o ausencia de invasión del tumor primario a la cavidad abdominal. Test de Mann Whitney, \*  $p < 0,05$ .

Como se describió en la sección anterior, la inhibición de p300 redujo la migración, invasión y formación de lamelipodios en las células LM3 en cultivo. Estos resultados sugieren la hipótesis que esta proteína esté favoreciendo el proceso de metástasis. Dado que este modelo singenico de implante subcutáneo de células LM3 en ratones BALB/c genera metástasis pulmonares (Urtreger et al, 1997) se decidió contrastar dicha hipótesis. Para esto se cuantificaron las metástasis pulmonares en los animales tratados con VV59 y sus respectivos controles. Se observó que la administración del inhibidor redujo la cantidad de metástasis pulmonares por ratón respecto a la administración del



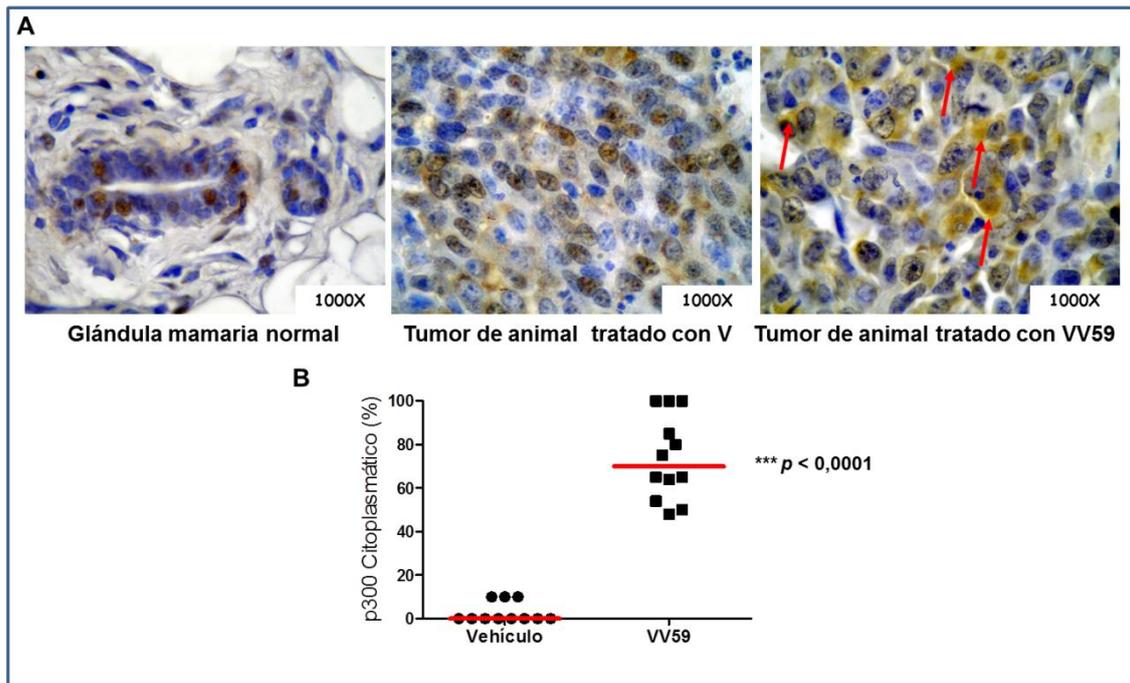
murino singeneico obtenido con estas células. También se decidió confirmar la expresión de p300 utilizando alternativamente western blot y RT-qPCR. En las células en cultivo tratadas con vehículo se detectó la típica localización nuclear. Sin embargo, cuando se trataron las células con VV59 se pudo observar localización nuclear y citoplasmática de p300 (figura 23 A y B, flechas rojas,  $p < 0,001$ , test Chi-cuadrado). Es de destacar además que se observó un aumento de los niveles totales de la proteína (figura 23 C) y de ARNm para p300 (figura 23 D).



**Figura 23. Características de la expresión de p300 en células LM3.** A. IF mostrando localización citoplasmática de p300 (flechas rojas) cuando las células son inhibidas con VV59. Aumento de 400 X. B. Cuantificación de las células mostrando expresión solamente nuclear y nuclear y citoplasmática de p300; \*\*\*  $p < 0,001$ , test Chi -cuadrado. C. WB mostrando aumento de expresión de p300 cuando las células son inhibidas con VV59. D. RT-qPCR mostrando aumento de los niveles del ARN mensajero para p300 cuando las células son inhibidas con VV59, \*  $p < 0,05$ , test de Student.

Confirmando los resultados observados en las células LM3 en cultivo, en el modelo murino la expresión de p300 fue casi exclusivamente nuclear en las

células tumorales de los ratones tratados con vehículo mientras que en las de los ratones tratados con VV59 se observó mayormente localización nuclear y citoplasmática (mediana del porcentaje citoplasmático de p300 en tumores de ratones tratados con vehículo = 0 versus mediana del porcentaje citoplasmático de p300 en tumores tratados con VV59 = 70,  $p < 0,0001$ , test de Mann Whitney, figura 24).



**Figura 24. Características de la expresión de p300 en los tejidos tumorales del modelo subcutáneo de células LM3.** A. se muestran fotos representativas de glándulas mamarias normales, y de tejidos tumorales de animales tratados con vehículo (V) y tratados con VV59 (las flechas rojas indican localización citoplasmática de p300). B. Se observa la cuantificación del porcentaje citoplasmático de p300 en los tumores de los ratones tratados con vehículo y con VV59, \*\*\*  $p < 0,0001$ , test de Mann Whitney.

## Estudio de la expresión de p300 en el modelo murino transgénico MMTV-PymT y en el de carcinogénesis inducida con DMBA en rata.

Como se describió en el apartado anterior, al inhibir p300 en las células LM3, tanto en cultivo como en los tumores del modelo animal, se pudo detectar una inusual localización citoplasmática de esta proteína. Al momento de realizar

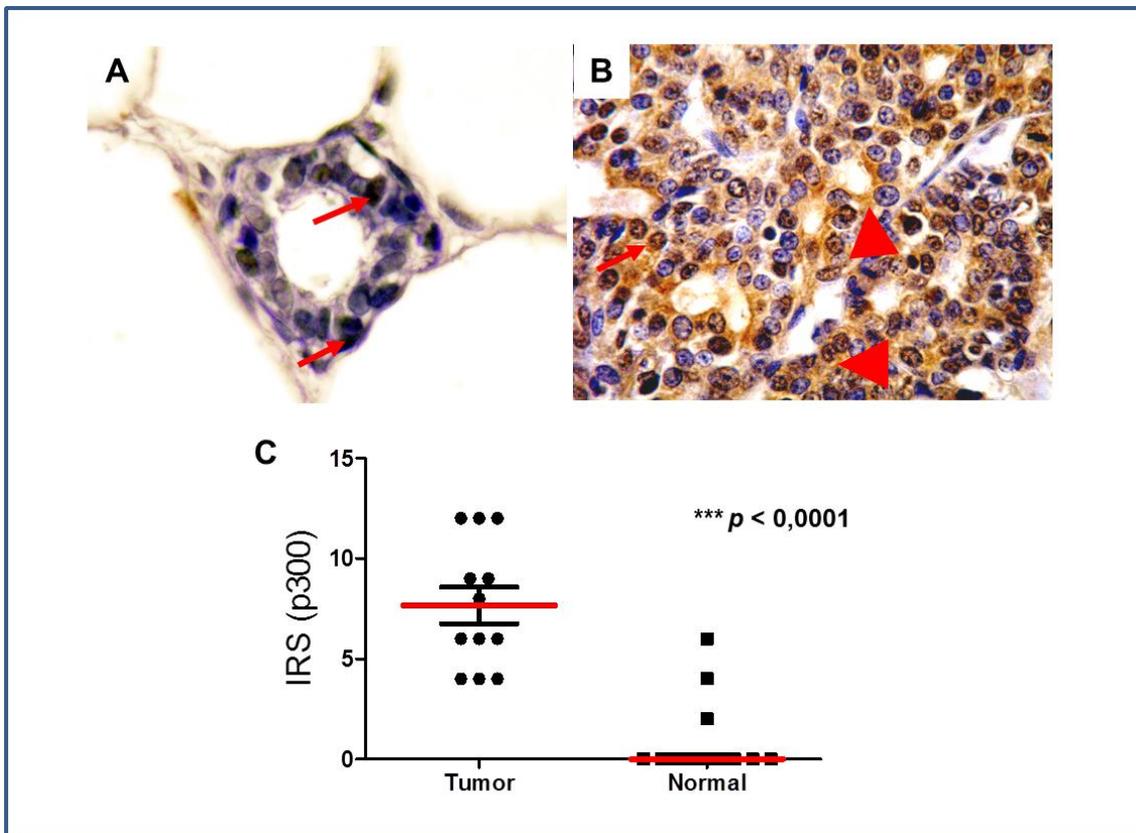
esta observación no existían reportes de esta localización inusual para p300. Además, esta localización resultaba extraña para una proteína cuya principal función es la de ser un cofactor transcripcional. Por esta razón, se decidió estudiar la expresión de p300 en otros modelos animales de carcinoma mamario que estaban disponibles en el laboratorio, observando las características generales de dicha expresión además de la localización subcelular.

El primero de estos modelos es el MMTV-PymT (Guy et al, 1992) que consiste en ratones transgénicos para una construcción que pone el oncogén del polioma T medio (PymT) bajo el control de las secuencias enhancer y promotoras del retrovirus del tumor mamario murino (MMTV). Este transgen produce la formación de tumores mamaros en estos animales. Se ha reportado que estos tumores son un excelente modelo para el carcinoma mamario humano dada la similitud con estos últimos (Lin et al, 2003). El segundo modelo es el de inducción de tumores mamaros de rata con el carcinógeno DMBA.

Como se contaba con tacos de parafina con tejidos de glándula mamaria normal y de todos los estados de la progresión tumoral en el modelo transgénico, se pudo estudiar la expresión de p300 en todos ellos. Se detectó expresión de p300 en las células epiteliales de la glándula mamaria normal. Esta expresión se incrementó fuertemente al desarrollarse los tumores (mediana IRS tejido normal = 1; mediana IRS tejido tumoral = 9;  $p = 0,0012$ , figura 25 E). Se muestran fotos representativas de la expresión de p300 en glándula mamaria normal (figura 25 B), neoplasia intraepitelial (figura 25 C) y adenocarcinoma mamario (figura 25 D). Todos los tumores analizados mostraron expresión de p300 mientras que solamente se detectó en el 60 % de las glándulas mamaras normales (tabla 1).



mayores niveles de expresión de p300 en tejido tumoral que en la glándula mamaria normal.



**Figura 26. Expresión de p300 en el modelo de carcinogénesis química (DMBA).** Secciones de tejidos de glándula mamaria normal y de tumores fueron procesadas por IHQ como se describió en materiales y métodos. A y B. Fotomicrografías representativas de glándula mamaria normal (A) y adenocarcinoma mamario (B). Las flechas rojas indican localización nuclear y las cabezas de flechas rojas indican localización citoplasmática. La amplificación de las figuras es 400 X. En el gráfico se observa la semicuantificación (IRS) de p300 en el tejido tumoral y en la glándula mamaria normal;  $*** p < 0,0001$ , test de Mann Whitney.

Posteriormente analizamos la localización subcelular de p300. En aquellas glándulas mamarias normales en que se detectó p300 este se expresaba en el núcleo, como era de esperar. Llamativamente la proteína se pudo detectar en el citoplasma (además de en el núcleo) en todos los tumores del modelo de carcinogénesis en rata que mostraron expresión (figura 26 B) y en el 67 % de los tumores del modelo murino transgénico (figura 25 D y su inserto).

En la tabla 1 se presentan los datos cuantitativos de la expresión y localización subcelular de p300 en los dos modelos animales descriptos en este apartado.

**Tabla 1: Expresión de p300 en tejido normal y tumoral de los dos modelos animales**

Modelo animal		Expresión de p300			Localización de p300		
		positivo	negativo	Valor p	citoplasmático	Nuclear	Valor p
MMTV-PymT	N	9	6	0,0062	0	9	0,0013
	T	15	0		10	5	
DMBA	N	3	12	0,0001	0	3	0,0001
	T	12	0		12	0	

N = glándula mamaria normal; T = tejido tumoral; test Chi-cuadrado

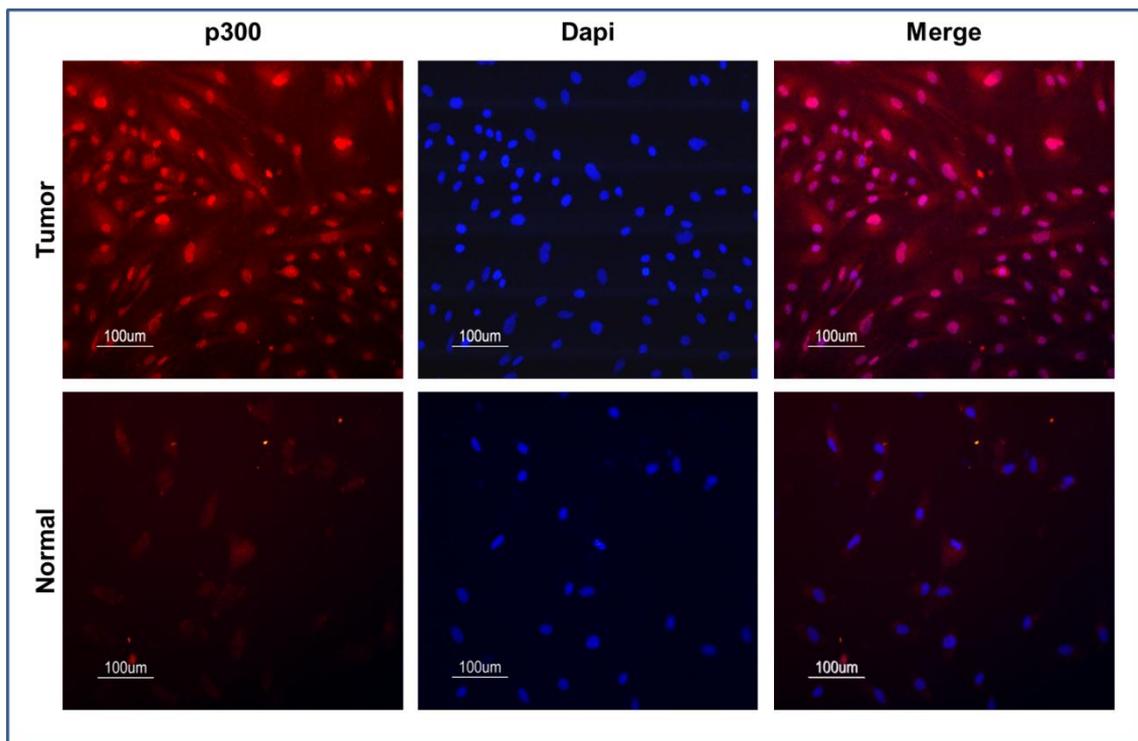
En conclusión, en estos dos modelos se pudo observar que la expresión de p300 es mayor en los tumores que en las glándulas mamarias normales y además que la expresión citoplasmática de la proteína aumenta junto con la progresión tumoral.

### **Parte del p300 citoplasmático se encuentra en estructuras con características de agresomas en las células tumorales en cultivo.**

Los primeros reportes de expresión citoplasmática de p300, aparecidos en el trascurso de la realización de estas tesis, afirman que la proteína se encuentra en el citoplasma para ser degradada (Chen et al, 2007; Brouillard & Cremisi, 2003) y más específicamente que esta degradación se produce en los agresomas en células HeLa (Chen et al, 2007). Los agresomas son inclusiones intracelulares que parecen funcionar reclutando y degradando proteínas mutadas, mal plegadas o que por diversas razones no han podido ser degradadas en los proteosomas (Kopito, 1997). Otro reporte, sin embargo, asocia la localización citoplasmática de p300 a su función de promover la degradación de p53 por medio de su actividad E4 ubiquitina ligasa en células de osteosarcoma (Shi et al, 2009).

Si la localización citoplasmática de p300 estuviera realmente relacionada con su degradación en los agresomas, y este fenómeno ocurriera con mayor

intensidad, o exclusivamente, en las células tumorales, el mismo podría estar relacionado al rol de esta proteína en el cáncer. Por esta razón decidimos investigar si el p300 citoplasmático observado en nuestros modelos experimentales de cáncer de mama se encontraba presente en agresomas. Para este propósito se realizaron cultivos primarios a partir de explantos de tumores mamarios inducidos con DMBA y de glándulas mamarias normales de ratas de la misma cepa, tal como se describió en la sección de materiales y métodos. En primer lugar se decidió comprobar si estos cultivos primarios expresaban p300. Tal como se muestra en la figura 27 se pudo observar que los niveles de p300 fueron mayores en los cultivos primarios derivados de los tumores que en los derivados de las glándulas mamarias normales, en concordancia con lo observado en los tejidos del modelo animal.

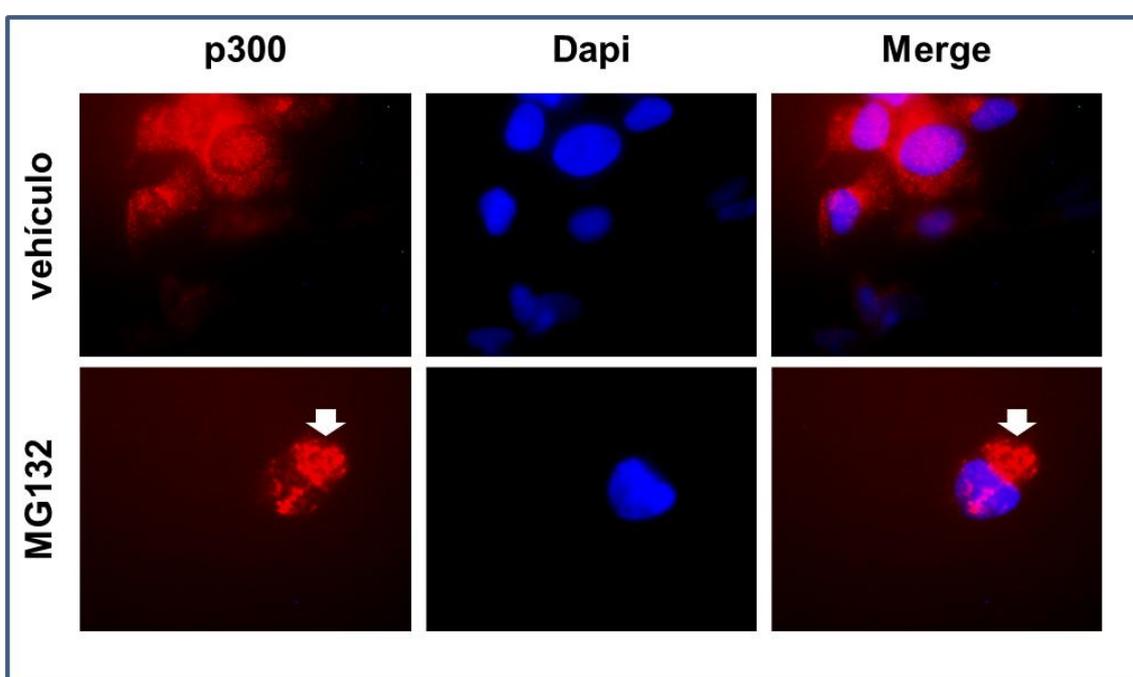


**Figura 27. Inmunofluorescencia para p300 en cultivos primarios derivados de tumores mamarios del modelo animal inducido con DMBA (Tumor) y de glándulas mamarias normales de ratas de la misma cepa (Normal). Amplificación 200 X.**

Dado que, como es sabido, la formación de agresomas se incrementa notablemente luego de la inhibición de la actividad proteosomal (Johnston et al, 1998; Zaarur et al, 2008; Kirilyuk et al, 2012; Ouyang et al, 2012) las células

fueron tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 (5  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) previo a la realización de las inmunofluorescencias.

En el cultivo primario derivado del tumor tratado con vehículo (control) se pudo observar expresión de p300 nuclear y citoplasmática (figura 28, vehículo). Cuando inhibimos el proteosoma con MG132 durante 12 h observamos que el 30 % de las células presentaban una acumulación de p300 en una estructura perinuclear con las características morfológicas típicas de un agresoma (figura 28, flecha blanca, MG132).

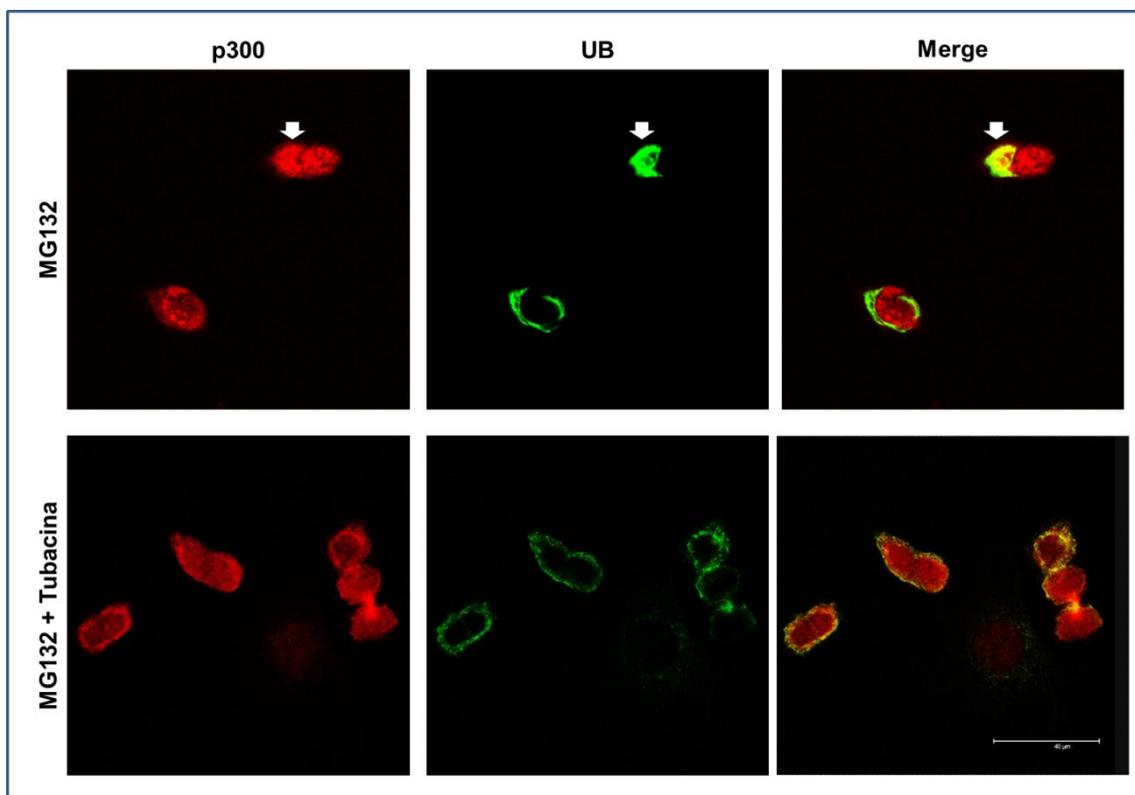


**Figura 28. Inmunofluorescencia para p300 en cultivos primarios derivados de tumores mamarios del modelo animal inducido con DMBA.** Las células fueron tratadas con MG132 (5  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) durante 12 h. Los experimentos fueron repetidos 2 veces. Se muestran fotos representativas. La flecha indica las estructuras con ubicación y características morfológicas propias de agresomas. Amplificación 1000 X.

Con el objeto de aportar más evidencia que indique que las estructuras a las que el p300 se asociaba efectivamente eran agresomas, se realizó una doble marcación para p300 y ubiquitina, ya que estas estructuras típicamente expresan este marcador. Como se observa en la figura 29 se pudo detectar que el tratamiento con MG132 inducía la formación de inclusiones en las que

p300 colocalizaba con ubiquitina, aumentando la probabilidad que estas inclusiones efectivamente fueran agresomas.

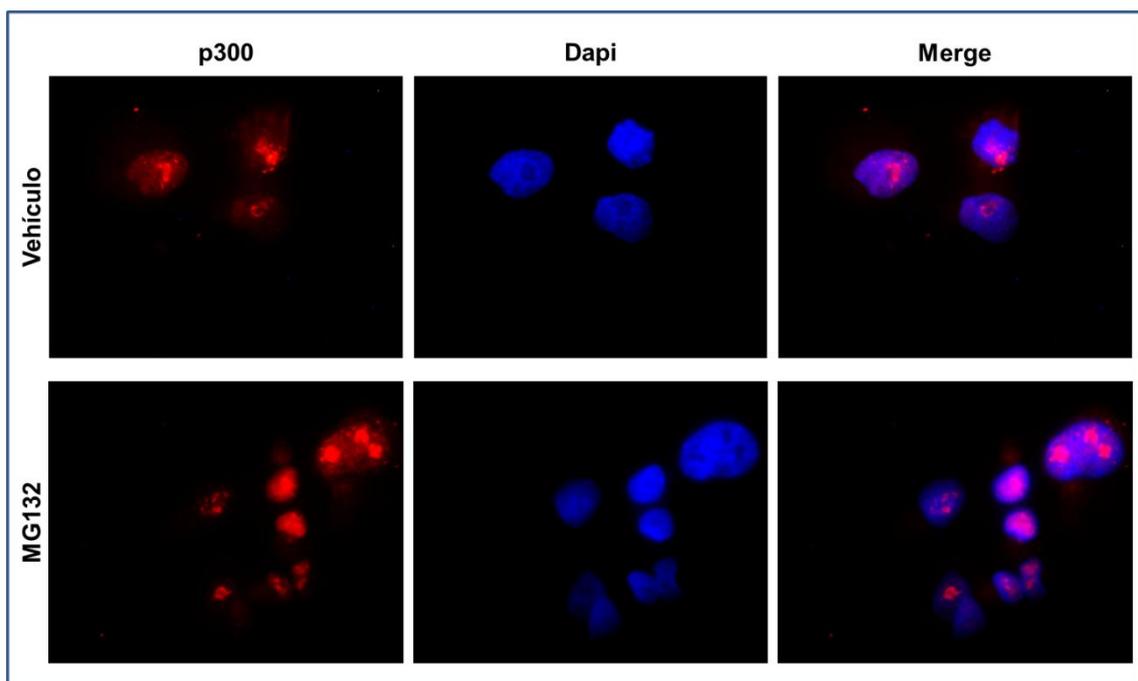
Además se ha reportado que la tubacina impide la formación de agresomas a través de la inhibición de la enzima HDAC6 (Hideshima et al, 2005). Con el objeto de agregar más evidencia de que las estructuras en la que se encontraba el p300 citoplasmático eran agresomas se trató a las células con MG132 y tubacina. Como se puede observar en la figura 29, el tratamiento con tubacina previene la formación de agresomas y por lo tanto no se observa el p300 y la ubiquitina en las estructuras previamente detectadas.



**Figura 29. Inmunofluorescencia para p300 y ubiquitina en células de cultivo primario derivados de tumores mamarios del modelo animal inducido con DMBA.** Se muestra una fotografía representativa mostrando localización de p300 y ubiquitina (UB) en inclusiones en el cultivo primario de tumor de ratas inducidas con DMBA tratado con MG132 (5  $\mu$ M) o MG132 (5  $\mu$ M) más tubacina (10  $\mu$ M) durante 12 h. Los experimentos fueron repetidos 2 veces. Amplificación 1000 X.

Estos resultados indicarían que, al menos en cultivos primarios derivados de tumores mamarios inducidos con DMBA, parte del p300 citoplasmático es

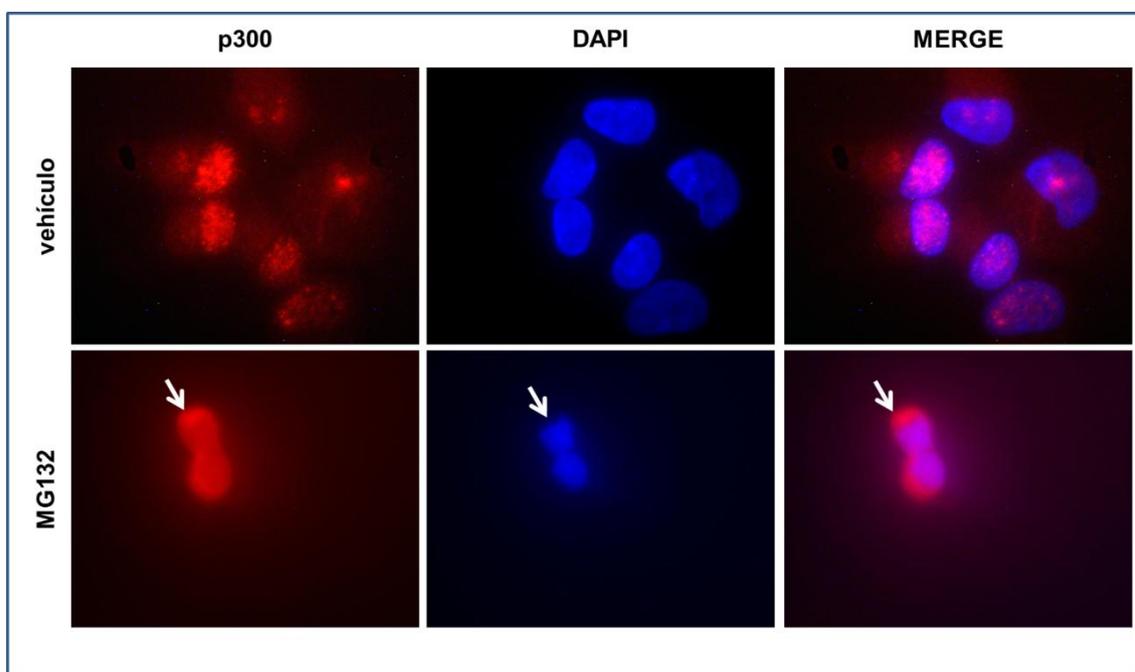
reclutado en agresomas. Surge entonces la siguiente pregunta: ¿Hay diferencias en este reclutamiento de p300 hacia los agresomas entre células epiteliales normales y células de cáncer mamario? Para contestar esta pregunta se realizaron cultivos primarios de glándulas mamarias normales de ratas de la misma cepa que se utilizó para desarrollar los tumores. De igual forma que lo realizado para las células de los cultivos primarios tumorales, las células fueron tratadas con MG132 o vehículo y se realizó inmunofluorescencia para p300. El p300 fue observado principalmente en núcleo y sorprendentemente, no pudo detectarse reclutamiento de p300 citoplasmático en agresomas (figura 30). Cabe aclarar que se realizaron incubaciones a tiempos más largos (48 y 72 h) para descartar la posibilidad de que las células normales tardaran más en reclutar p300 en los agresomas. Sin embargo, tampoco en estas condiciones se observaron agresomas conteniendo p300.



**Figura 30. Inmunofluorescencia para p300 en cultivo primario de glándula mamaria normal de rata.** Las células fueron tratadas con MG132 (5  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) durante 72 h e inmunomarcadas para p300. Los experimentos fueron repetidos 2 veces. Se utilizó DAPI para observar los núcleos. Se muestran fotografías representativas. Amplificación 1000 X.

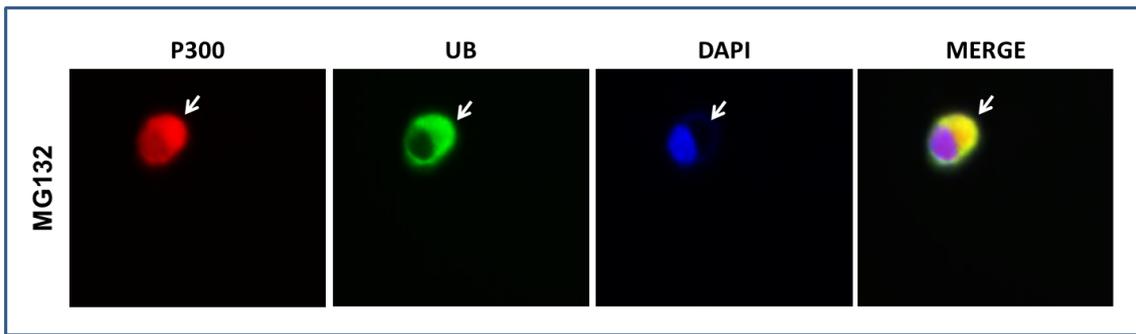
Estos resultados muestran que en células de cultivos primarios derivados de los tumores del modelo de carcinogénesis en rata inducidos con DMBA, al menos parte del p300 detectado en el citoplasma es reclutado en estructuras

que por sus características morfológicas y el marcador utilizado, parecen ser agresomas. ¿Será este un fenómeno aislado de estas células o se repetirá en otras líneas celulares de carcinoma mamario? Para responder a esta pregunta se estudió si el reclutamiento de p300 citoplasmático ocurría también en las células de la línea LM3. Las células fueron tratadas con el inhibidor de proteosoma MG132 5  $\mu$ M o vehículo (DMSO) y a continuación se realizó una inmunofluorescencia para detectar p300. Similarmente a lo observado en las células del cultivo primario derivado de tumores inducidos por DMBA, al tratar las células con el inhibidor del proteosoma se pudo detectar la presencia de p300 reclutado en estructuras perinucleares con aspecto de agresomas (figura 31).



**Figura 31. Inmunofluorescencia para p300 en la línea celular LM3.** Células de la línea LM3 fueron tratadas con MG132 5  $\mu$ M o vehículo (DMSO) durante 12 h. Los experimentos fueron repetidos 2 veces. Se muestran fotos representativas. Las flechas indican inclusiones perinucleares conteniendo p300. Amplificación 1000 X.

De igual forma que lo descrito anteriormente se realizó inmunofluorescencia para p300 y ubiquitina en células tratadas con MG132 ya que los agresomas típicamente expresan este marcador. Nuevamente se repitió el resultado observándose que se formaban acúmulos perinucleares en los cuales colocalizaban el p300 y la ubiquitina (figura 32).



**Figura 32. Inmunofluorescencia para p300 y ubiquitina en la línea celular LM3.** Células de la línea LM3 fueron tratadas con MG132 5  $\mu$ M o vehículo (DMSO) durante 12 h. Las flechas blancas muestran las típicas estructuras perinucleares de aspecto de agresomas en las que se observa colocalización de p300 y ubiquitina (UB). Se muestra una foto representativa. Amplificación 1000 X.

En conclusión, estos resultados sugieren que en células de tumores mamarios parte del p300 citoplasmático es reclutado en estructuras que, en principio, pueden clasificarse como agresomas. Como se describirá en la discusión esto puede tener importancia en relación a los mecanismos a través de los cuales el p300 actúa sobre la progresión tumoral. Sin embargo, hay que remarcar aquí que existe todavía mucha discusión en relación a la forma de identificar a los agresomas y que la marcación con ubiquitina es solo una de ellas. Tampoco hay en la bibliografía consenso acerca de las varias funciones que han sido sugeridas para estas estructuras. Por lo tanto los experimentos preliminares descritos en esta sección no pretenden ser más que el breve comienzo de una nueva línea de investigación del laboratorio en la que queda mucho trabajo por realizar.

## **Estudios de la expresión de p300 en biopsias de carcinomas mamarios humanos.**

Los resultados hasta aquí presentados han sido obtenidos en líneas celulares, cultivos primarios y en modelos animales. Como es sabido, estos modelos experimentales, válidos como son, presentan diferencias con los tumores desarrollados en el contexto de los tejidos del cuerpo humano. Por lo tanto, los datos con ellos obtenidos pueden no ser directamente trasladables a la biología

del cáncer de nuestra especie. Por esta razón, se intentó validar los resultados obtenidos estudiando la importancia del p300 para el carcinoma mamario humano. Con este objetivo se estudiaron las características de la expresión del p300 en biopsias humanas de carcinoma mamario y se correlacionaron con los parámetros clínicos e histopatológicos de que se disponía.

Se comenzó analizando por inmunohistoquímica la expresión de p300 en 101 biopsias de carcinomas mamaros ductales (estadios I a III). En relación a la frecuencia de expresión de la proteína se pudo detectar que la misma era mayor en los tumores que en las glándulas mamarias no malignas. Se denomina a estas últimas como no malignas, y no como glándulas mamarias normales, debido a que la biopsia se realizó por la presencia de un tejido anormal sospechando que se trataba de un crecimiento maligno. Sin embargo, el diagnóstico histopatológico fue negativo para cáncer. Por esta razón no sería correcto hablar de glándula mamaria normal. El 90 % (91/101) de los tumores expresó p300 mientras que solo se detectó en el 55 % (5/9) de las glándulas mamarias no malignas ( $p = 0,029$ , test Chi- cuadrado).

Con respecto a los niveles de p300 semicuantificados por el índice IRS, estos fueron mayores en el tejido tumoral (mediana = 6) que en la glándula mamaria no maligna (mediana = 1;  $p = 0,0012$ , figura 33 A).

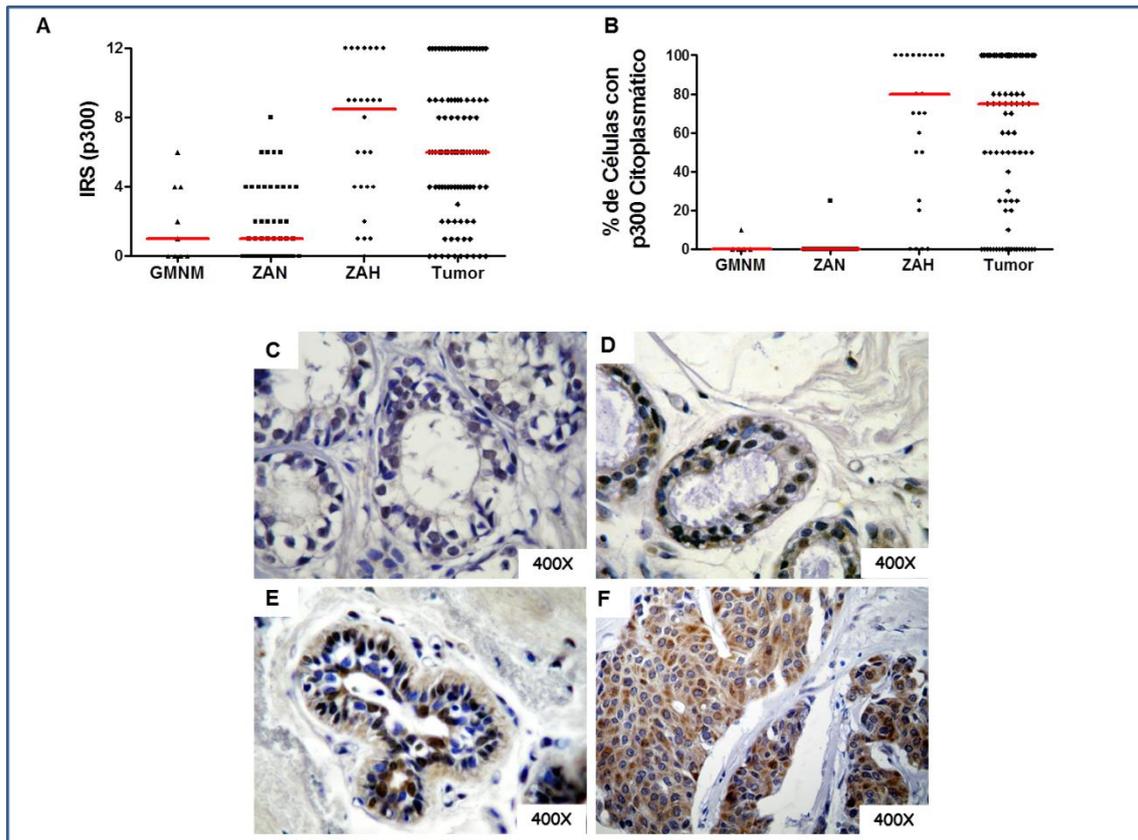
En cuanto a la localización subcelular se pudo detectar una mayor expresión citoplasmática de p300 en los tumores que en las glándulas mamarias no malignas en las cuales la proteína se observó casi exclusivamente en la típica localización nuclear. Este resultado se obtuvo analizando tanto la frecuencia de biopsias que expresaban p300 citoplasmático como el porcentaje de células que expresaban p300 citoplasmático en cada muestra. En relación a la frecuencia de biopsias, en el 77 % de los tumores (70/91) se detectó expresión citoplasmática (además de nuclear) en comparación con un 20 % (1/5) en las glándulas mamarias no malignas ( $p = 0,0047$ ; test Chi-cuadrado). La mediana del porcentaje de células que presentaron p300 citoplasmático fue de 75 en los tumores en comparación con 0 para la glándula mamaria no maligna ( $p = 0,0054$ ; figura 33 B).

Debido a la dificultad para obtener un número elevado de muestras humanas de glándulas mamarias no malignas se comparó la expresión y localización de p300 entre el tejido tumoral y su zona adyacente de aspecto histológico normal (ZAN). Como ya se indicó, el 90 % (91/101) de los tumores expresó p300 en comparación con el 62,5 % (30/48) de las ZAN ( $p = 0,0001$ ; test Chi cuadrado). Los niveles de p300 semicuantificados por el índice IRS también fueron significativamente mayores en el tejido tumoral (mediana = 6) que en la ZAN (mediana = 1;  $p < 0,0001$ , figura 33 A).

En relación a la localización subcelular también se pudo detectar una mayor localización citoplasmática de p300 en los tumores que en las zonas adyacentes de aspecto histológico normal (ZAN) en las cuales la proteína se observó casi exclusivamente en la típica localización nuclear. Nuevamente se analizó tanto la frecuencia como el porcentaje de células que expresaban p300 citoplasmático en cada muestra. En relación a la frecuencia de biopsias, en el 77 % de los tumores (70/91) se detectó expresión citoplasmática (además de nuclear) en comparación con un 3,3 % (1/30) de la ZAN ( $p < 0,0001$ ; test Chi cuadrado). La mediana del porcentaje de células que presentaron p300 citoplasmático fue de 75 en los tumores en comparación con 0 para las ZAN ( $p < 0,0001$ ; figura 33 B).

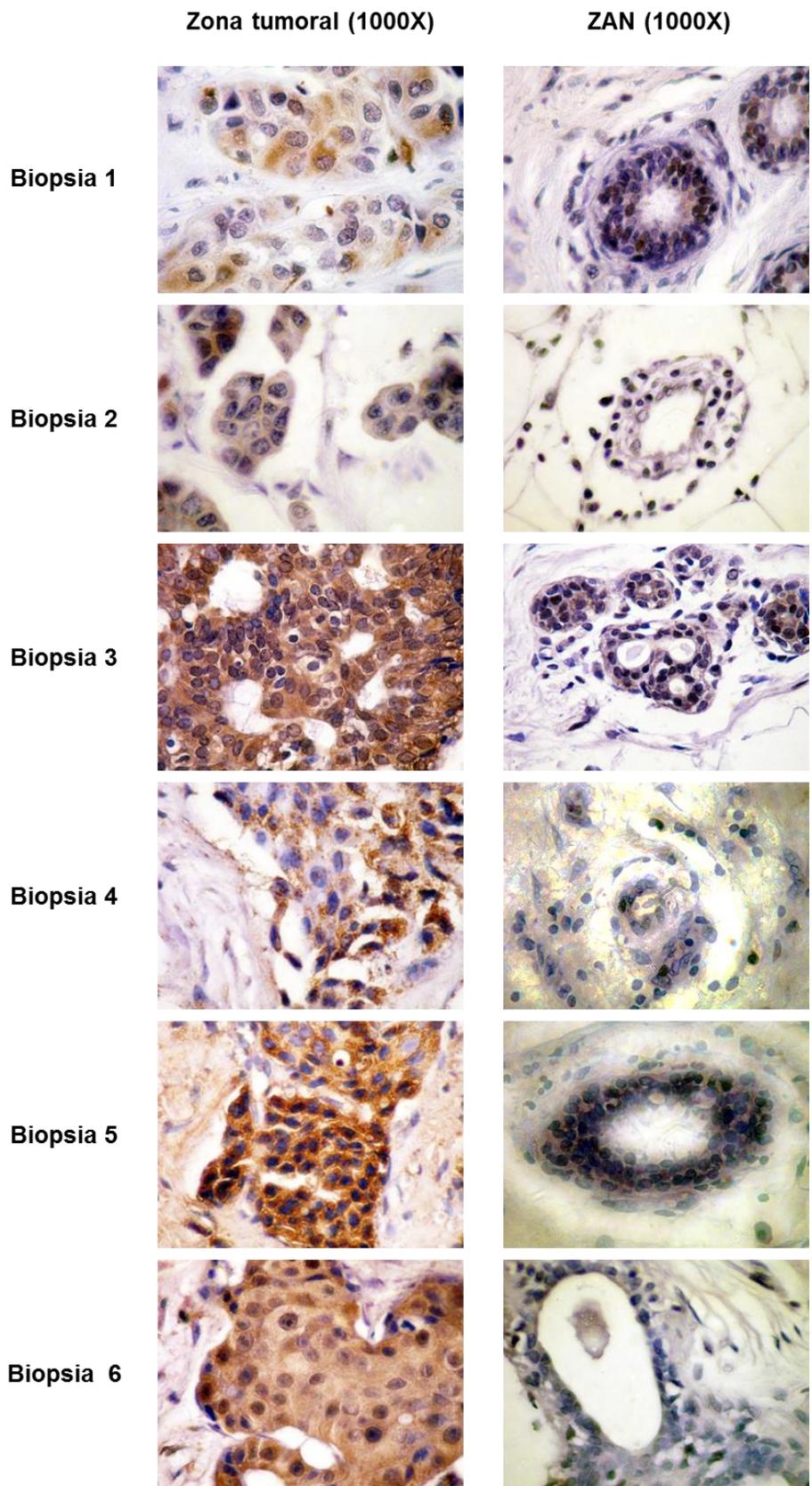
También se estudiaron los niveles de expresión de p300 y su localización citoplasmática en zonas adyacentes al tumor con tejidos hiperplásicos (ZAH), no detectándose diferencias significativas con los valores obtenidos para los tejidos tumorales (figura 33 A y B).

En la figura 33 se muestran fotomicrografías representativas de inmunohistoquímicas para p300 mostrando una glándula mamaria no maligna (figura 33 C), una zona adyacente de aspecto histológico normal (figura 33 D), una glándula mamaria hiperplásica (figura 33 E) y un carcinoma mamario (figura 33 F).



**Figura 33. Expresión y localización de p300 en muestras humanas de carcinoma mamario.** A. Niveles de expresión de p300 semicuantificados utilizando el IRS en glándula mamaria no maligna (GMNM), en zona adyacente de aspecto histológico normal (ZAN), en zonas adyacentes al tumor con tejidos hiperplásicos (ZAH) y en tejidos tumorales (tumor). Las barras rojas muestran los valores de las medianas. Test de Mann Whitney. B. Localización de p300 en biopsias humanas. Los puntos representan los porcentajes de células expresando p300 citoplasmático para cada biopsia. Las barras rojas muestran los valores de las medianas. Test de Mann Whitney. C-F: Fotomicrografías representativas mostrando expresión de p300 en glándula mamaria no maligna (C), zona adyacente de aspecto histológico normal (D), zonas adyacentes al tumor con tejidos hiperplásicos (E) y en tejidos tumorales (F).

En la figura 34 se muestran fotomicrografías representativas de varios carcinomas mamarios mostrando expresión citoplasmática de p300 con sus zonas adyacentes de aspecto histológico normal en las que la expresión de p300 citoplasmático es casi indetectable.



**Figura 34. Biopsias de carcinomas mamarios mostrando distintos niveles de expresión citoplasmática de p300 y sus respectivas zonas adyacentes de aspecto histológico normal. En todos los casos la amplificación es 1000 X.**

En conclusión, estos estudios inmunohistoquímicos de expresión de p300 en biopsias humanas muestran que la proteína está fuertemente sobreexpresada en los tejidos tumorales con respecto a las glándulas mamarias no malignas o a los tejidos adyacentes de aspecto histológico normal. Además, se ha detectado una inusual localización citoplasmática de p300 en los tejidos tumorales siendo casi indetectable en las glándulas mamarias no malignas o en las zonas adyacentes de aspecto histológico normal.

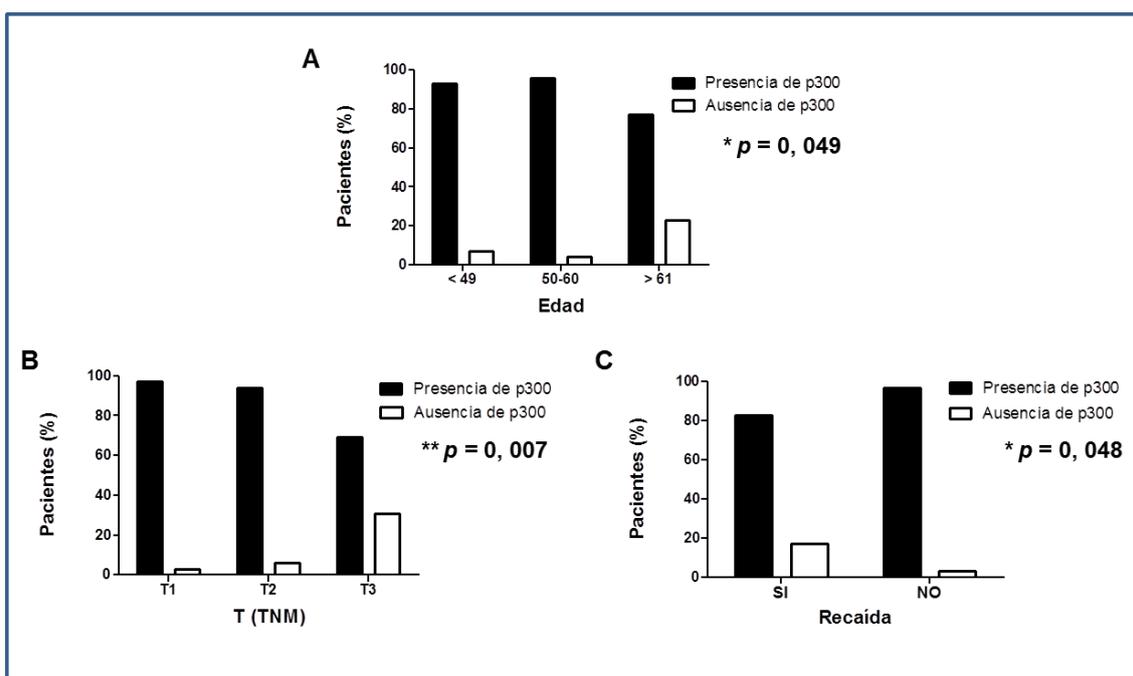
## **Estudios de correlación de la expresión de p300 en biopsias humanas de carcinomas mamarios con datos clínicos e histopatológicos.**

Una vez estudiada la expresión de p300 y sus características en biopsias humanas se realizaron los estudios de correlación de dicha expresión con los parámetros clínicos e histopatológicos de los que se disponía. Como se observa en la tabla 2 se analizaron los siguientes parámetros: edad, estadio, tamaño del tumor, estatus de los ganglios linfáticos, recaída, grado histológico, grado nuclear, índice mitótico, RE, RP y Her2. En la misma tabla se pueden observar los resultados de dicho estudios. Este análisis reveló que existe una asociación significativa entre la expresión de p300 y una menor edad de la paciente ( $p = 0,049$ , figura 35 A), un menor tamaño tumoral ( $p = 0,0071$ , figura 35 B) y una ausencia de la recaída ( $p = 0,048$ , figura 35 C).

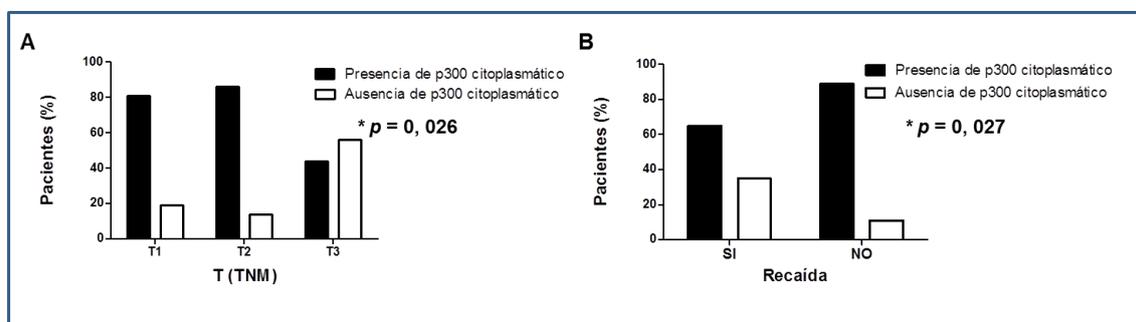
Como se ha descrito anteriormente durante el transcurso de esta tesis se ha detectado una inusual localización citoplasmática para p300. Como se describió en el apartado anterior, esta localización es casi exclusiva de los tumores mamarios siendo casi indetectable en los tejidos utilizados como control (glándulas mamarias no malignas y zonas adyacentes de aspecto histológico normal). Lógicamente estas observaciones conducen a preguntarse si esta localización tiene alguna relación con la transformación maligna y/o la progresión tumoral en el cáncer de mama. Tratando de comenzar a responder

a esta pregunta se analizó la correlación de la expresión citoplasmática de p300 con los mismos parámetros clínicos e histopatológicos.

Como se puede ver en la tabla 3 y en forma similar a lo detectado con la expresión de p300 se pudo observar una asociación significativa entre la expresión citoplasmática de p300 y un menor tamaño tumoral ( $p = 0,026$ , figura 36 A) y ausencia de recaída ( $p = 0,027$ , figura 36 B).



**Figura 35. Estudio de la correlación de la expresión de p300 con datos clínicos e histopatológicos.** Gráficos mostrando la correlación de la expresión de p300 con la edad de las paciente (A), T del TNM (B) o recaída de la enfermedad (C), Test Chi-cuadrado.



**Figura 36. Estudio de la correlación de la localización citoplasmática de p300 con datos clínicos e histopatológicos.** Gráficos mostrando la correlación de la localización citoplasmática de p300 con T del TNM (A) o recaída de la enfermedad (B), Test Chi-cuadrado

**Tabla 2: Asociación de la expresión de p300 con los parámetros clínicos e histopatológicos de las pacientes con cáncer de mama.**

Parámetros clínicos e histopatológicos	Total de pacientes	Expresión de p300 (Nº de pacientes y porcentaje de los mismos)		Valor <i>p</i> *
		Presencia p300	Ausencia p300	
<b>Edad (años)</b>				
<49	29	27 (93,1)	2 (6,9)	<b>0,049</b>
50-60	28	27 (96,4)	1 (3,6)	
>61	26	20 (76,9)	6 (23,1)	
<b>Estadío</b>				
I	26	23(88,5)	3(11,5)	<b>0,081</b>
II	30	29(96,7)	1(3,3)	
III	21	16(76,2)	5(23,8)	
ND	6	-	-	
<b>T (TNM)</b>				
T1(<2cm)	37	36(97,3)	1(2,7)	<b>0,007</b>
T2 (>2 a ≤5 cm)	31	29(93,5)	2(6,45)	
T3 (> 5cm)	13	9(69,2)	4(30,8)	
ND	2	-	-	
<b>Ganglios</b>				
Negativo	46	42(91,3)	4(8,7)	<b>0,293</b>
Positivo	30	25(83,3)	5(16,7)	
ND	7	-	-	
<b>Recaída</b>				
Ausencia	38	37(97,4)	1(2,6)	<b>0,048</b>
Presencia	24	20(83,3)	4(16,7)	
ND	21	-	-	
<b>Grado histológico</b>				
I	4	4(100)	0(0)	<b>0,366</b>
II	30	25(83,3)	5(16,7)	
III	40	37(92,5)	3(7,5)	
ND	9	-	-	
<b>Grado nuclear</b>				
I	2	2(100)	0(0)	<b>0,900</b>
II	33	30(90,9)	3(9,1)	
III	25	23(92)	2(8)	
ND	23	-	-	
<b>Índice mitótico</b>				
I	29	29(100)	0(0)	<b>0,115</b>
II	13	11(84,6)	2(15,4)	
III	10	9(90)	1(10)	
ND	31	-	-	
<b>RE</b>				
Positivo	24	20(83,3)	4(16,7)	<b>0,106</b>
Negativo	55	52(94,5)	3(5,5)	
ND	4	-	-	
<b>RP</b>				
Positivo	20	18(90)	2(10)	<b>0,819</b>
Negativo	60	55(91,7)	5(8,3)	
ND	3	-	-	
<b>Her2</b>				
Positivo	21	19(90,5)	2(9,5)	<b>0,550</b>
Negativo	53	50(94,3)	3(5,7)	
ND	9	-	-	

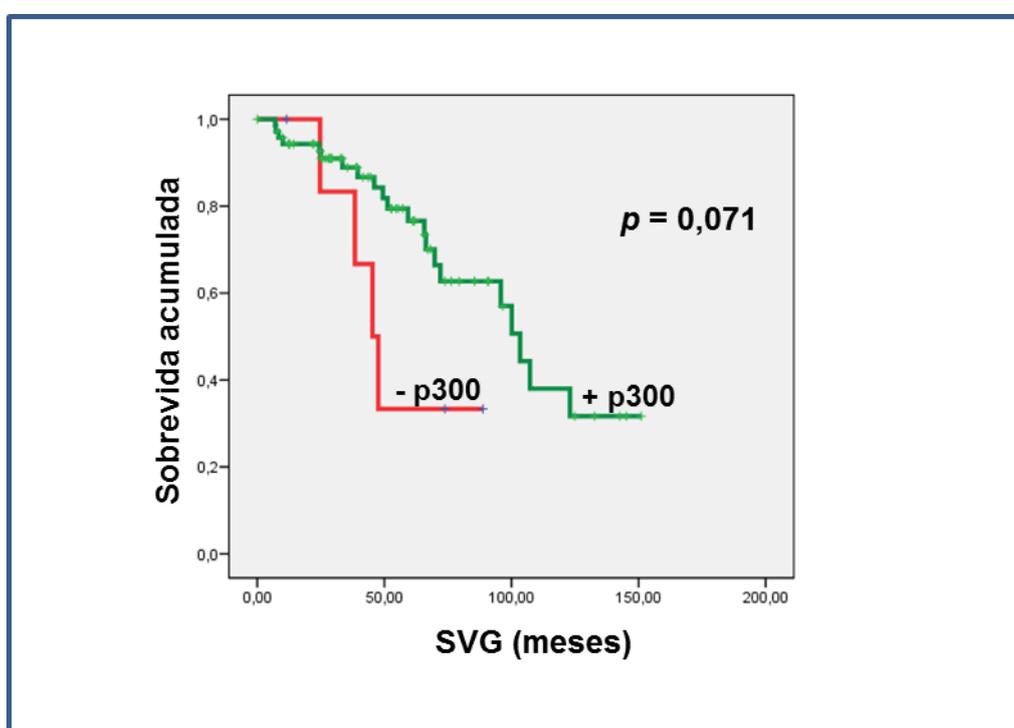
\* Test de Chi-cuadrado, *p* <0,05 fue considerado significativo. ND: No disponible

**Tabla 3: Asociación de la localización citoplasmática de p300 con los parámetros clínicos e histopatológicos de las pacientes con cáncer de mama.**

Parámetros clínicos e histopatológicos	Total de pacientes	Expresión citoplasmática de p300 (Nº de pacientes y porcentaje de los mismos)		Valor $p^*$
		Presencia	Ausencia	
<b>Edad (años)</b>				
<49	27	22(81,5)	5(18,5)	<b>0,643</b>
50-60	27	20(74,1)	7(25,9)	
>61	20	14(70,0)	6(30,0)	
<b>Estadío</b>				
I	23	20(87,0)	3(13,0)	<b>0,544</b>
II	29	22(75,9)	7(24,1)	
III	16	12(75,0)	4(25,0)	
ND**	6	-	-	
<b>T(TNM)</b>				
T1(<2cm)	36	29(80,6)	7(19,4)	<b>0,026</b>
T2 (>2 a ≤ 5 cm)	29	25(86,2)	4(13,8)	
T3 (> 5cm)	9	4(44,4)	5(55,6)	
<b>Ganglios</b>				
Negativo	42	34(81,0)	8(19,0)	<b>0,629</b>
Positivo	25	19(76)	6(24)	
ND	7	-	-	
<b>Recaída</b>				
Ausencia	37	33(89,2)	4(10,8)	<b>0,027</b>
Presencia	20	13(65,0)	7(35,0)	
ND	17	-	-	
<b>Grado histológico</b>				
I	4	2(50)	2(50)	<b>0,265</b>
II	25	19(76,0)	6(24,0)	
III	37	31(83,8)	6(16,2)	
ND	8	-	-	
<b>Grado nuclear</b>				
I	2	2(100)	0(0)	<b>0,648</b>
II	30	24(80,0)	6(20,0)	
III	23	20(87,0)	3(13,0)	
ND	19	-	-	
<b>Índice mitótico</b>				
I	29	23(79,3)	6(20,7)	<b>0,810</b>
II	11	9(81,8)	2(18,2)	
III	9	8(88,9)	1(11,1)	
ND	25	-	-	
<b>RE</b>				
Positivo	20	14(70,0)	6(30,0)	<b>0,160</b>
Negativo	52	44(84,6)	8(15,4)	
ND	2	-	-	
<b>RP</b>				
Positivo	18	14(77,8)	4(22,2)	<b>0,705</b>
Negativo	55	45(81,8)	10(18,2)	
ND	1	-	-	
<b>Her2</b>				
Positivo	19	16(84,2)	3(15,8)	<b>0,983</b>
Negativo	50	42(84,0)	8(16,0)	
ND	5	-	-	

\* Test de Chi- cuadrado,  $p < 0,05$  fue considerado significativo. ND: No disponible

Obviamente, otro de los parámetros clínicos que interesa estudiar si se quiere evaluar la capacidad pronóstica de un potencial marcador molecular es su correlación con la sobrevida de los pacientes. Se decidió entonces realizar la estimación de la función de supervivencia (para la sobrevida global) mediante el método de Kaplan–Meier, tomando como factor la variable expresión positiva o negativa de p300. Para analizar si existían diferencias significativas entre las distribuciones de supervivencia (curvas) se aplicó el test Log Rank. Este análisis mostró que no existían diferencias significativas entre las pacientes con expresión negativa (n=8) o positiva (n=73) de p300 ( $p = 0,071$ , figura 37).



**Figura 37. Correlación entre la expresión de p300 y el tiempo de sobrevida de los pacientes.** Curvas de sobrevida de 81 pacientes de acuerdo a la expresión de p300 (log-rank test). Sobrevida global, probabilidad de sobrevida de todos los pacientes con CM: expresión negativa, n=8; expresión positiva, n=73.

Cabe destacar que estos resultados obtenidos con biopsias humanas no son los esperados en base a los descriptos anteriormente que fueron obtenidos utilizando las líneas celulares y los modelos animales, donde se observó que la inhibición del p300 produce efectos antitumorales (es decir que p300 tendría efectos protumorales). La asociación entre la expresión general y la citoplasmática de p300 con un menor tamaño tumoral y con ausencia de

recaída si bien no establece una relación de causa-efecto, sugiere una acción antitumoral o de gen supresor tumoral para esta proteína. En el mismo marco es inesperada la ausencia de correlación de la expresión total de p300 con la sobrevida global de las pacientes. El asesoramiento estadístico alertó que este resultado puede estar influenciado por el bajo número de muestras que no expresaron p300 (n=8) y que el valor de p indicaba una tendencia a una mayor sobrevida de los pacientes que expresaban p300 en sus tumores indicando nuevamente un rol de gen supresor tumoral.

Tratando de profundizar el estudio se realizó un análisis multivariado. Se modeló no sólo la relación entre la tasa de supervivencia y el tiempo, sino también la posible relación con diferentes variables registradas para cada sujeto, es decir, se calculó la tasa de mortalidad como una función del tiempo y de las variables pronóstico. El modelo más utilizado en estos casos es el denominado “de riesgos proporcionales” o “modelo de Cox”. Las variables incorporadas en el modelo fueron: p300; grupo etario, alcoholismo, hábito de fumar, estadio, estatus de ganglios linfáticos axilares, antecedentes familiares, RE (receptores estrogénicos), RP (receptores de progesterona), HER2, neoadyuvancia, tratamiento quirúrgico, hormonoterapia, radioterapia y estatus de sobrevida global (SVG). Las variables que intervinieron en la ecuación y que por lo tanto resultaron influyentes en la supervivencia fueron: p300, cigarrillo y hormonoterapia (tabla 4). Es de destacar entonces que este estudio está indicando que la expresión de p300 en los tejidos tumorales es una variable independiente de las demás que estaría asociada a la sobrevida global de los pacientes con cáncer de mama.

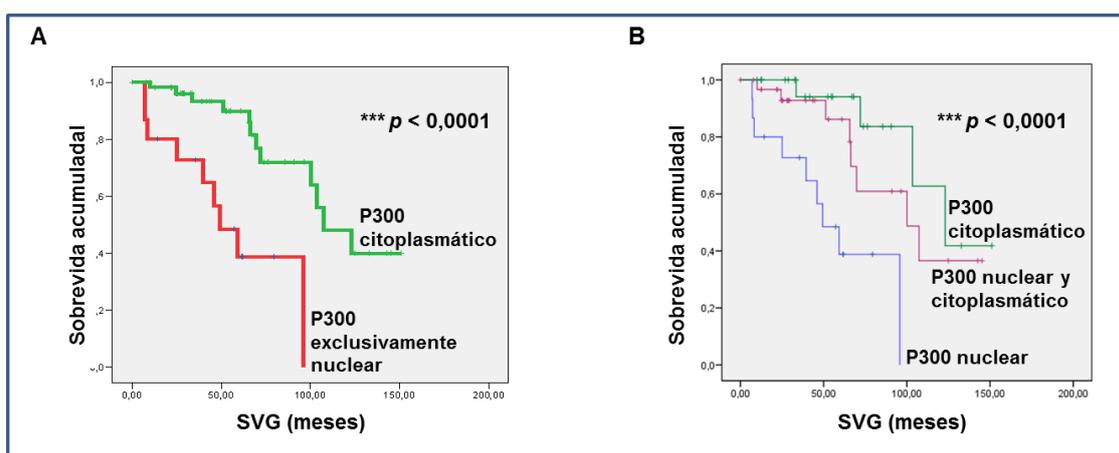
**Tabla 4: Expresión de p300 como variable influyente sobre la sobrevida del paciente.**

<b>Variables en la ecuación</b>	<b>B</b>	<b>SE</b>	<b>Wald</b>	<b>df</b>	<b>Sig.</b>	<b>Exp(B)</b>
Expresión de p300	-2,971	1,019	8,501	1	,004	,051
Hábito de fumar	-2,231	,976	5,224	1	,022	,107
Terapia hormonal	-1,746	,826	4,469	1	,035	,174

El hecho que la expresión citoplasmática de p300 se detectó casi exclusivamente en los tejidos tumorales hizo surgir la hipótesis que su localización subcelular podría estar involucrada en el papel desempeñado por

el p300 en cáncer de mama. Para comenzar a contrastar esta hipótesis se decidió analizar la correlación entre la localización subcelular de p300 y la sobrevida de las pacientes.

Las curvas de Kaplan-Meier mostraron que las pacientes que presentaban tumores con p300 citoplasmático tenían mayor sobrevida (mediana = 107,3 meses) que aquellas pacientes que poseían tumores con expresión exclusivamente nuclear de p300 (mediana = 49,4 meses,  $p < 0,0001$ , test Log Rank, figura 38 A). Dado que algunos tumores presentaban expresión casi exclusivamente citoplasmática de p300 mientras que otros presentaban p300 tanto en núcleo como en citoplasma se decidió hacer el análisis dividiendo a las pacientes en tres grupos, a saber: p300 predominantemente citoplasmático, p300 nuclear + citoplasmático y p300 predominantemente nuclear. Las pacientes cuyos tumores expresaban p300 exclusivamente en el citoplasma tenían mayor sobrevida (mediana = 123 meses) que aquellas cuyos tumores presentaban p300 en núcleo y citoplasma (mediana = 100 meses). Estas últimas a su vez presentaban una sobrevida mayor que las pacientes cuyos tumores presentaban p300 casi exclusivamente nuclear (mediana = 49 meses,  $p < 0,0001$ , test Log Rank figura 38 B).



Para analizar si la localización de p300 era una variable independiente en su relación con la supervivencia de las pacientes se realizó un análisis multivariado. Se encontró que las variables que intervienen en la ecuación son: localización de p300 y hábito de fumar; es decir, estas dos variables influyen en la supervivencia en forma independiente (tabla 5).

**Tabla 5: Localización de p300 como variable influyente sobre la supervivencia del paciente**

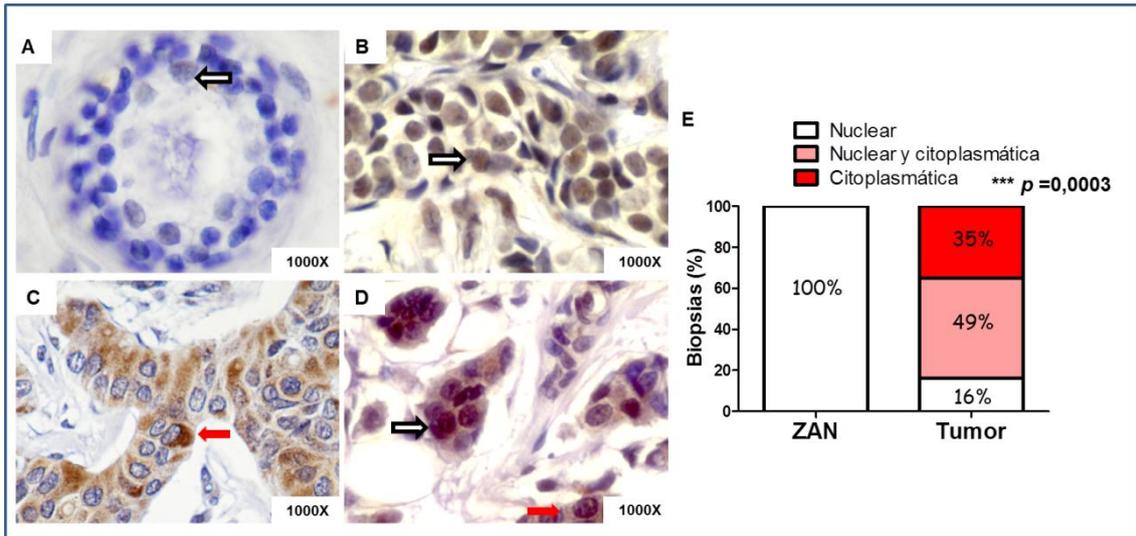
Variables en la ecuación	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Localización de p300	-,957	,431	4,933	1	,026	,384
Hábito de fumar	-1,452	,683	4,522	1	,033	,234

## **Estudios de la expresión de p300 en biopsias de carcinomas mamarios humanos triple negativos.**

Tal como se describió en la introducción los carcinomas mamarios clasificados como triple negativos no expresan receptores hormonales ni el receptor HER2. Estos tumores tienen un comportamiento clínico más agresivo y un peor pronóstico. Además, por la ausencia de estos mismos receptores carecen de una terapia dirigida. Por estas razones sería importante caracterizar mejor estos carcinomas detectando nuevos marcadores moleculares y nuevos blancos para su tratamiento. Debido a esto se decidió iniciar el estudio de la expresión de p300 en biopsias humanas de este tipo de tumores y analizar su correlación con parámetros clínico e histopatológicos. Para este estudio se logró obtener 40 biopsias.

Se comenzó estudiando la cantidad de tumores que expresaban p300 detectándose la presencia de la proteína en el 92,5 % (37/40) de las muestras. También se estudiaron los niveles de expresión semicuantificando por medio del índice IRS observándose una mayor expresión de p300 en las zonas tumorales (mediana = 8) que en las zonas adyacentes de aspecto histológico normal (ZAN, mediana = 1;  $p = 0,0023$ , figura 39).

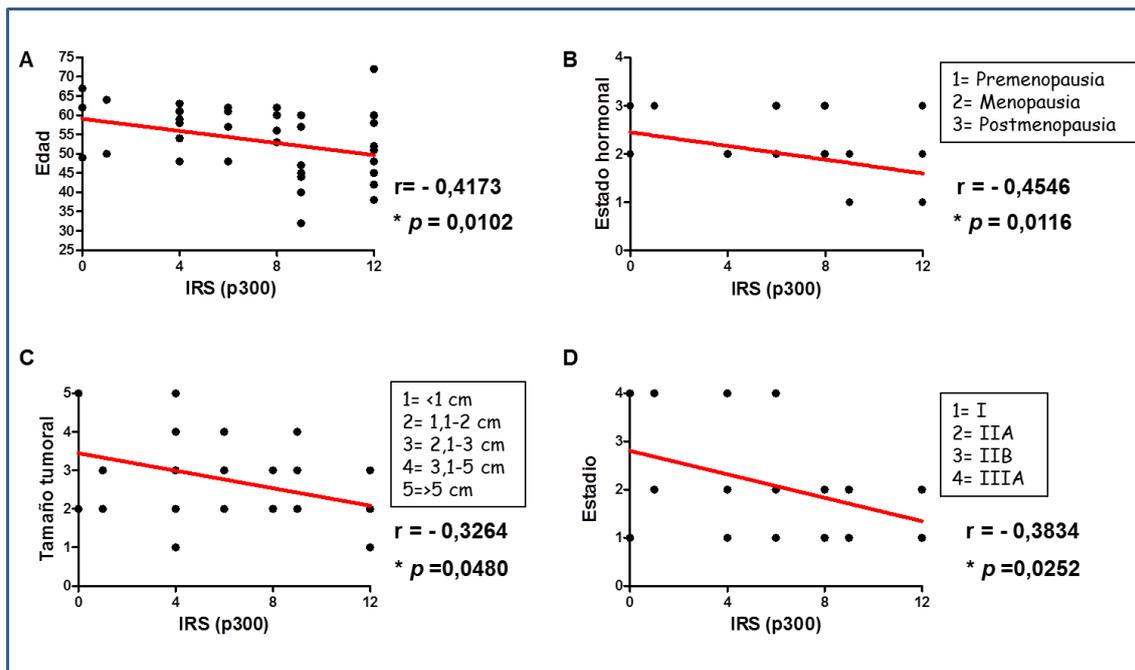




**Figura 40. Localización subcelular de p300.** Fotomicrografías representativas mostrando localización nuclear de p300 en las zonas adyacentes de aspecto histológico normal (ZAN) (A) y localización nuclear (B), citoplasmática (C) y citoplasmática y nuclear (D) en los tejidos tumorales. E. El gráfico de barra muestra los porcentajes de cada localización subcelular de p300 en tejidos tumorales y ZAN; test Chi-cuadrado,  $p = 0,0003$ .

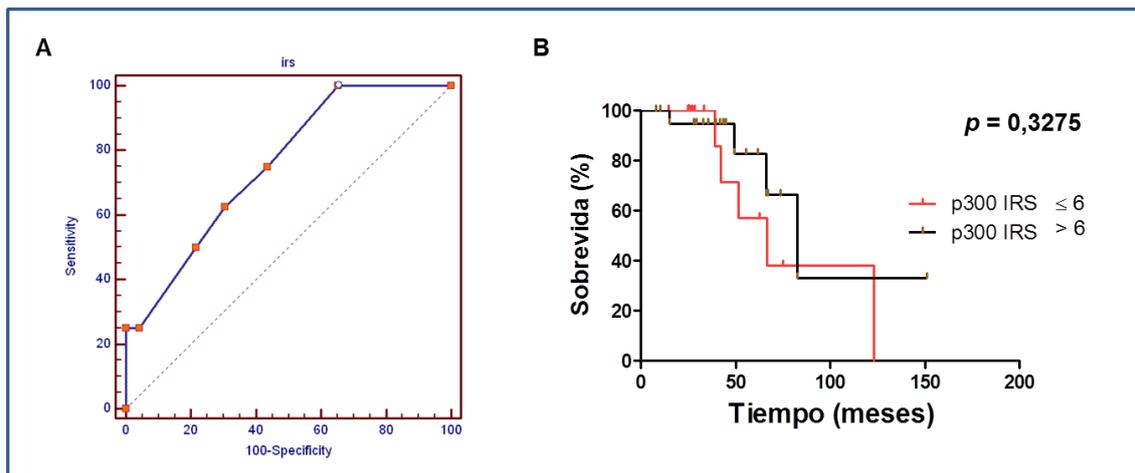
## Estudios de correlación de la expresión de p300 con datos clínicos e histopatológicos en biopsias humanas de carcinomas triple negativos.

También para estos carcinomas se realizó el análisis de correlación de la proteína p300 con los siguientes parámetros clínicos e histopatológicos: edad, estado hormonal, tamaño tumoral, estadio y grado nuclear e histológico. En este caso se consideró conveniente utilizar el coeficiente de correlación de Spearman (no paramétrico). El análisis de correlación se realizó teniendo en cuenta los niveles de p300 semicuantificados por medio del índice IRS. Los resultados de estos estudios mostraron que mayores niveles de p300 se asocian a menor edad de las pacientes ( $p = 0,0102$ ) y con el estado hormonal premenopaúsico ( $p = 0,0116$ ). En cuanto a su correlación con los factores pronósticos se encontró que mayores niveles de p300 se asocian con un menor tamaño tumoral ( $p = 0,0480$ ) y con estadios menos avanzados ( $p = 0,0252$ , figura 41).



**Figura 41. Estudios de correlación entre los niveles de p300 y parámetros clínicos e histopatológicos.** Los gráficos muestran la correlación entre el IRS de p300 y la edad (A), el estado hormonal (B), el tamaño tumoral (C) y el estadio (D), test de correlación de Spearman.

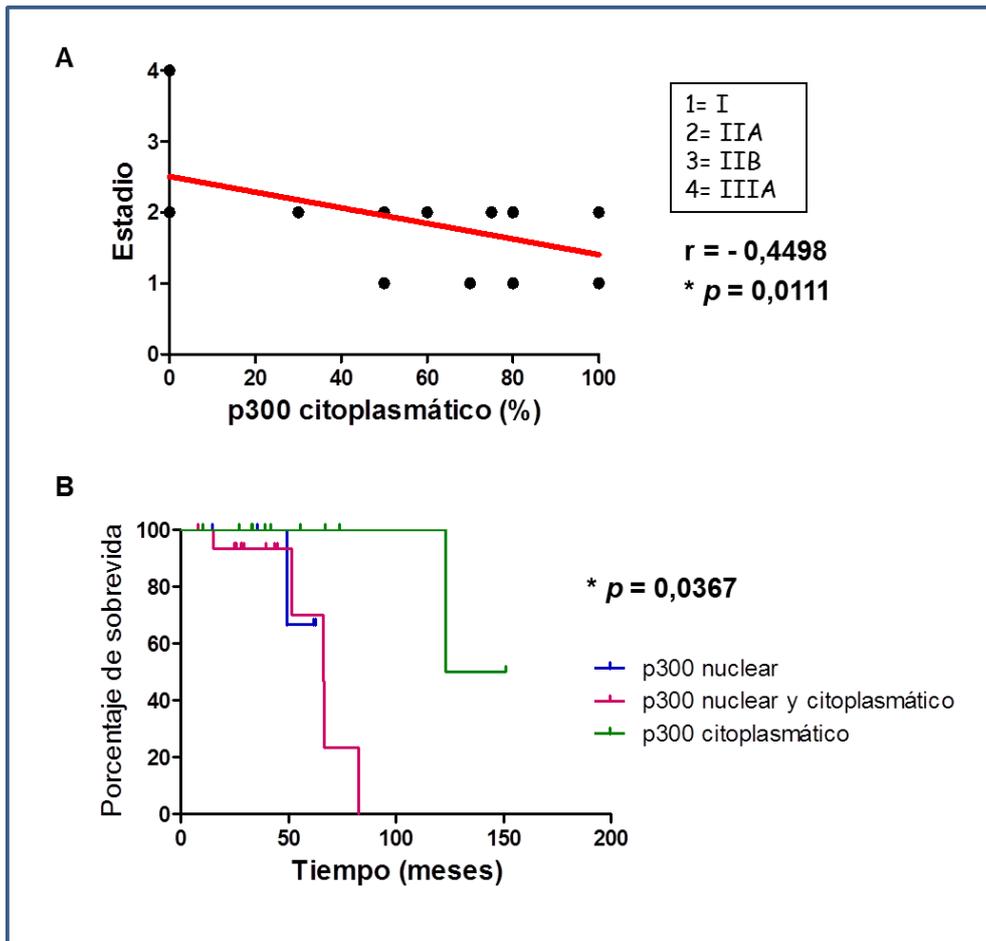
También se realizó el análisis de correlación entre la expresión de p300 con la supervivencia global de las pacientes utilizando las curvas de Kaplan-Meier. En primer lugar se estudió la correlación entre la presencia y ausencia de p300 con la supervivencia global no detectándose diferencias significativas entre las curvas. En este caso solo había tres biopsias con ausencia de p300, por lo cual se decidió utilizar curvas ROC (Receiving Operating Characteristic) con el fin de hallar el punto de corte estadísticamente válido para definir valores altos y bajos de los niveles de expresión de p300. El punto de corte resultó corresponder a un valor de IRS de 6 (figura 42 A). Las curvas de supervivencia global separando a las pacientes en aquellos cuyos tumores tenían un IRS > 6 y aquellos que tenían un IRS ≤ 6 tampoco mostraron diferencias significativas (figura 42 B). En este caso no se pudo realizar un análisis multivariado debido a que el número de biopsias de carcinomas triple negativos no eran suficientes.



**Figura 42. Análisis de correlación de la expresión de p300 con la sobrevida global.** A. Curva ROC. El área debajo de la curva para el valor de corte de 6 fue de 0,0753 con un intervalo de confianza de 95 % entre 0,566 y 0.889. Para este punto de corte la sensibilidad fue del 62,5 % y la especificidad de 69,57 % B. Curvas de Kaplan-Meier comparando la sobrevida global con un IRS > a 6 e IRS ≤ 6,  $p = 0,3275$ , test Log-Rank.

También se estudió la correlación entre la localización subcelular de p300 con los parámetros clínicos e histopatológicos de los que se disponía observándose que una mayor expresión de p300 citoplasmático se correlaciona con estadios menos avanzados de la enfermedad ( $p = 0,0258$ , figura 43 A).

El análisis de correlación entre la localización subcelular de p300 y la sobrevida global nuevamente mostró que aquellos pacientes con mayor expresión citoplasmática de p300 en sus tumores tenían una mayor sobrevida global ( $p = 0,0376$ , figura 43 B).



**Figura 43. Análisis de correlación entre la localización subcelular de p300 con el estadio tumoral y la supervivencia global.** A. Gráfico mostrando la correlación entre localización citoplasmática de p300 con el estadio. Cada punto representa el promedio para cada tumor del porcentaje de células con p300 citoplasmático en 10 campos al azar,  $p = 0,0258$ ; test de correlación de Spearman. B. Curvas de Kaplan-Meier comparando la supervivencia global de las pacientes con tumores que expresan p300 solamente nuclear, nuclear y citoplasmático y solamente citoplasmático,  $p = 0,0367$ , test Log-rank.

En conclusión, una alta expresión de p300 en tumores de mama triple negativos se asocia a un menor tamaño tumoral y a menores estadios. Además, la localización exclusivamente citoplasmática se correlacionó con un menor estadio de las pacientes y con una mayor supervivencia global. Como ya se comentó estos estudios estadísticos no indican una relación de causa-efecto. Sin embargo, es de destacar que, al igual que lo observado en el estudio general de los carcinomas mamarios, los resultados sugieren que p300 actúa como un supresor tumoral y que su localización citoplasmática, observada casi exclusivamente en los tejidos tumorales, se asocia a una mayor supervivencia global.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Como se ha visto en la introducción de esta tesis, existe evidencia que el p300 está relacionado con el cáncer en general aunque no está claro si actúa como un oncogén o un gen supresor tumoral (Goodman y Smolick, 2000). En algunos trabajos se reportan acciones de la proteína claramente protumorales y en otros se deduce una función contraria para distintos tipos de cáncer. Esto no es de extrañar si se tiene en cuenta la diversidad de alteraciones moleculares que subyace al conjunto de patologías que se reúne bajo el nombre de cáncer. Sin embargo, varias veces estos dos roles antagónicos se han reportado para la misma clase de cáncer.

En relación al carcinoma mamario, que es el que nos ocupa en esta tesis, como también se ha descrito detalladamente en la introducción, se han reportado ambos roles.

También hay que destacar que la mayor parte de las investigaciones sobre la relación ente p300 y el carcinoma mamario se han realizado en líneas celulares derivadas de estos tumores siendo escasos los estudios utilizando modelos animales. Igualmente escasos han sido los estudios que utilizaron biopsias humanas para estudiar mutaciones en el gen de p300 o analizar correlaciones con datos clínicos e histopatológicos. Estos últimos también han arrojado resultados contradictorios ya que, por ejemplo, Kurebayashi y colaboradores (2000) le asignan un rol protumoral, mientras que Green y colaboradores (2008) describen que el p300 tiene un rol antitumoral.

En este trabajo de tesis se ha intentado realizar un estudio integral de la influencia de esta importante proteína multifuncional en el cáncer de mama. Para ello se ha trabajado en los tres sistemas experimentales habitualmente utilizados en los estudios de biología del cáncer. Se ha investigado el rol del p300 realizando experimentos con líneas celulares derivadas de carcinomas mamaros murino y humanos, con modelos animales y con biopsias humanas. Teniendo en cuenta la importancia de los receptores hormonales para el

desarrollo de estos tumores hemos incluido líneas hormono-dependientes y hormono-independientes.

En la línea celular murina LM3 y en la línea celular humana MDA-MB-231, ambas hormono-independientes, se ha observado que la inhibición de la función acetilasa de p300 reduce la viabilidad celular (por medio de la inducción de la apoptosis), la migración y la invasión celular. Como es la inhibición de la actividad acetilasa de p300 la que produce este efecto experimental se puede deducir que p300 puede actuar como un oncogén ejerciendo efectos protumorales. Este efecto no pudo detectarse en las líneas hormono-dependientes murina LM05 y la humana T47D. Es sabido que los carcinomas mamarios que expresan receptores hormonales tiene una biología muy distinta de aquellos que no lo hacen y es sumamente interesante investigar la causa de esta acción diferencial de p300. Como se ha descrito en la introducción, el p300 es un regulador de la transcripción génica que realiza esta función a través de múltiples mecanismos tales como acetilar histonas y factores de transcripción, actuar como una proteína puente entre la maquinaria basal de transcripción y complejos de factores de transcripción y como proteína “scaffold” para estos mismos complejos. Además, como también se describió en la introducción, hay mucha evidencia que demuestra que el p300 puede interactuar con los receptores de estrógenos para modular la transcripción de los genes blanco de estos últimos. Surge entonces la hipótesis que el efecto de p300 involucre distintos mecanismos moleculares de acción en los tumores hormono-dependientes y en los hormono-independientes. En los experimentos realizados en esta tesis con líneas celulares se ha inhibido solo la función acetilasa de p300. Es posible que esta inhibición afecte solamente la acción de esta proteína sobre las líneas hormono-independientes y que sean los otros mecanismos de acción del p300, no afectados por esta inhibición, los que actúen preponderantemente sobre las líneas hormono dependientes. Este tema ha iniciado una nueva línea de investigación en el laboratorio en el que se ha desarrollado esta tesis.

En el modelo de transplante singeneico de células LM3 utilizado en esta tesis se ha demostrado que la inhibición de la actividad acetilasa de p300 disminuye

la carga tumoral, la capacidad de invasión del tumor primario a la cavidad abdominal y el número de metástasis pulmonares. Estos efectos de p300 parecen deberse a que induce apoptosis y disminuye la proliferación celular. Esta acción del p300 sobre la proliferación celular en los tumores del modelo animal no fue detectada en los estudios con células en cultivo. Es conocida la importancia de las interacciones heterotípicas entre las células epiteliales tumorales y las células del estroma tumoral. Obviamente, en las células en cultivo estas interacciones no están presentes y es posible que esta diferencia esté relacionada con la ausencia de acción del p300 sobre el ciclo celular. De todas formas también en este modelo animal se ha detectado un claro rol oncogénico para la actividad acetilasa del p300 al igual que en las líneas celulares.

En concordancia con estos resultados, obtenidos en líneas celulares y en el modelo animal de carcinoma mamario, un rol oncogénico para p300 ha sido reportado también para otros tipos de cáncer, por ejemplo, leucemia, cáncer de próstata, colon y pulmón (Borrow et al, 1996; Debes et al, 2003; Ishihama et al, 2007; Karamouzis et al, 2007). Más importante aún es el hecho que estos resultados concuerdan con trabajos que demuestran que inhibidores de la actividad acetiltransferasa de p300 son potentes agentes antitumorales (Yang et al, 2013) y que la inhibición de p300 es una estrategia efectiva en el tratamiento de carcinomas mamarios triple negativos (Liao et al, 2012).

Los estudios de expresión de p300 y su correlación con datos clínicos e histopatológicos mostraron que una alta expresión de esta proteína se asocia con menor tamaño tumoral y ausencia de recaída no observándose una relación clara con la sobrevida global. Similarmente, en los carcinomas mamarios triple negativos la elevada expresión de p300 se asoció con menor tamaño tumoral y menor estadio de la enfermedad sin observarse tampoco una relación con la sobrevida. Si bien las correlaciones estadísticas no comprueban una relación de causa y efecto, estos resultados son sorprendentes, ya que están sugiriendo un rol de gen supresor tumoral para el p300 en los carcinomas mamarios oponiéndose a los resultados obtenidos en esta misma tesis con líneas celulares y con el modelo animal.

Una posible explicación a esta contradicción se encuentra en la atípica localización citoplasmática del p300. Como se ha descrito en la sección de resultados, se ha detectado consistentemente, tanto en los modelos animales de cáncer mamario investigados como en las biopsias humanas, que a diferencia de los tejidos que pueden ser considerados normales o no malignos, en los tejidos tumorales el p300 se encuentra en el citoplasma. Esta localización citoplasmática puede ir acompañada en mayor o menor medida por la localización nuclear de la proteína.

Está claro por lo que se desprende de la función biológica de p300 y de la abundante evidencia del modo de acción de esta proteína en líneas celulares de cáncer en general y de carcinoma mamario en particular (ver introducción), que un rol oncogénico del p300 se debe total o preponderantemente a su acción de regulador de la transcripción génica y, por lo tanto, requiere de su localización nuclear. Si el p300 es trasladado desde el núcleo al citoplasma la proteína no podría ejercer entonces su rol oncogénico.

¿Qué hace el p300 en el citoplasma? Hay dos posibilidades: que se encuentre allí para ser secuestrado y/o degradado o que esté ejerciendo alguna función biológica específica. En el primer caso al trasladarse desde el núcleo al citoplasma simplemente dejaría de ejercer su efecto oncogénico al no poder ejercer su efecto sobre la transcripción génica. En el segundo caso es posible que sus funciones biológicas en el citoplasma tengan un rol antitumoral.

Cuando esta localización citoplasmática fue detectada al comienzo de este trabajo de tesis existían en la literatura pocos reportes de la misma. Sin embargo, en los últimos años han aparecido trabajos que describen la localización citoplasmática de p300 y algunos de ellos sugieren cuál puede ser la significancia biológica de esta localización. Chen y colaboradores proponen que el traslado de p300 al citoplasma es parte de la regulación de la función de esta proteína, ya que en el citoplasma la misma sería ubiquitinada y degradada en los proteosomas o bien sería secuestrada en los agrosomas si el sistema proteosomal se viera colapsado (Chen et al, 2007; Chen & Li, 2011). También se ha reportado que el p300 citoplasmático disminuye la actividad de la histona

desacetilasa 6 (HDAC6). Como es sabido esta última enzima desacetila a la tubulina incrementando la motilidad celular. Por lo tanto, en este caso, el p300 en el citoplasma ejercería un efecto inhibitor de la motilidad celular (Han et al, 2009).

Los resultados de esta tesis junto con lo reportado en la bibliografía, sugieren una nueva y más refinada hipótesis la cual se detalla a continuación. La alteración patológica de la actividad acetilasa con su consecuente efecto sobre la función reguladora de la transcripción del p300 contribuye a la transformación maligna y a la progresión tumoral en el carcinoma mamario. Es probable que la célula trate de compensar esta acción defectuosa de la actividad acetilasa incrementando los niveles de p300, lo que a su vez conduce a mayores niveles de la proteína en el citoplasma. Alternativamente, puede suceder que la translocación de p300 al citoplasma sea parte de un mecanismo de regulación de la acción de esta proteína, tal como sugieren Chen y Li (2011), y que este mecanismo se encuentre desregulado en las células tumorales. En cualquier caso, el resultado es un incremento de p300 citoplasmático. Una vez en el citoplasma la proteína es degradada por los proteosomas o secuestrada en los agrosomas en caso que los primeros se vieran sobrepasados en su acción. También es probable que en el citoplasma p300 tenga funciones biológicas tales como la inhibición de la HDAC6 con su consecuente acción sobre la motilidad celular y que estas acciones ejerzan un efecto antitumoral.

En resumen, la acción oncogénica del p300 se ejerce en el núcleo a través de su acción sobre la regulación de la transcripción y al ser trasladado al citoplasma esta acción se pierde, ya sea por la separación física del sitio de acción nuclear, porque además es degradado en los proteosomas y/o secuestrado en los agrosomas y posiblemente también porque ejerce nuevas funciones específicas de su ubicación en el citoplasma que tienen efectos antitumorales.

Cabe destacar que también para otras proteínas tales como el p27<sup>kip1</sup> se ha demostrado que su función puede ser regulada mediante su traslado al

citoplasma y que este mecanismo de translocación puede estar alterado en el cáncer (Bloom & Pagano, 2003; Besson et al, 2004).

Esta hipótesis es coincidente con los resultados obtenidos en esta tesis. Al inhibir la actividad acetilasa de p300 y consecuentemente su acción reguladora de la transcripción, en las líneas celulares y en el modelo animal, se obtuvieron claros efectos antitumorales. Probablemente la célula reacciona a esta inhibición incrementando los niveles de p300 lo cual produce un incremento de su localización citoplasmática tal como se observó en las células LM3 y en el modelo animal obtenido con estas células. Cuando en los experimentos con los cultivos primarios derivados del modelo de inducción carcinogénica con DMBA se inhibió la actividad de los proteosomas, el elevado nivel de p300 citoplasmático en las células tumorales, pero no en las normales, indujo el reclutamiento de la proteína en los agregomas. Esta hipótesis también coincide con los estudios realizados en biopsias humanas ya que explica el aumento de p300 citoplasmático observado en los tejidos tumorales y su ausencia en las glándulas mamarias no malignas o en los tejidos adyacentes al tumor de aspecto histológico normal. La hipótesis también explica por qué no se encontró correlación significativa entre la expresión total de p300 y la supervivencia de las pacientes, ya que al considerar la expresión celular total se estaba teniendo en cuenta tanto el p300 nuclear con su efecto protumoral como el p300 citoplasmático con su efecto neutro o antitumoral. En cambio cuando se tuvieron en cuenta solamente los niveles de p300 citoplasmático se obtuvo una consistente asociación con una mayor supervivencia. En este sentido es muy llamativa la coincidencia detectada cuando se observó que las pacientes que presentaban p300 exclusivamente citoplasmático en sus tejidos tumorales tenían mayor supervivencia que aquellas que presentaban p300 tanto en el núcleo como en el citoplasma, y que estas últimas tenían mayor supervivencia que aquellas que presentaban p300 exclusivamente en el núcleo de sus células tumorales, tal como se puede observar en la figura 38 B.

Para finalizar, se desea remarcar que esta hipótesis puede explicar el rol dual antagónico, de oncogén y de gen supresor tumoral, reportado reiteradamente para la acción de esta proteína en el cáncer.

En conclusión, en este trabajo de tesis se ha aportado evidencia que indica que la actividad acetilasa de p300 está involucrada en la progresión del carcinoma mamario promoviendo la supervivencia y la invasión celular, como ha sido demostrado en líneas celulares de carcinomas mamarios en cultivo y en un modelo murino de este tipo de cáncer. En conjunto, estos resultados apoyan un rol oncogénico para el p300 en el carcinoma mamario. También se demostró que el p300 citoplasmático está sobreexpresado en los tumores mamarios humanos y que esta localización citoplasmática se asocia con un menor tamaño tumoral, menor tasa de recaída y mayor sobrevida global de las pacientes.

Finalmente, este trabajo de tesis sugiere una nueva y mejor hipótesis que es que la localización citoplasmática de p300 impide los efectos protumorales que la proteína tiene en el núcleo, promoviendo de esta manera una mayor sobrevida de las pacientes. Además explica el rol dual observado para el p300 en el cáncer. Esta nueva hipótesis es esquematizada en la figura 44.

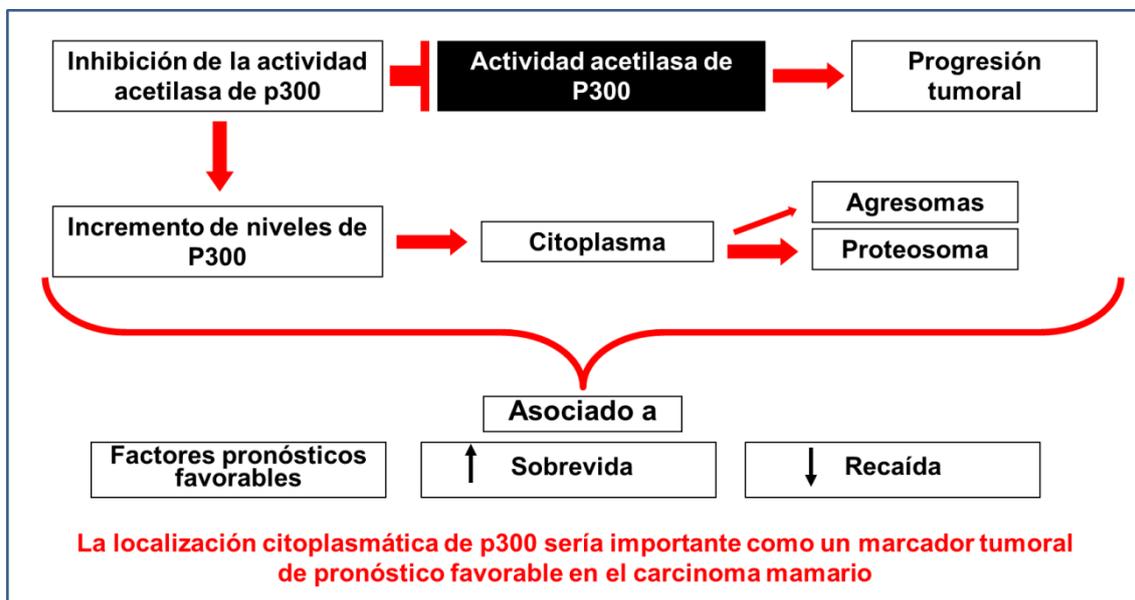


Figura 44. Esquema de la hipótesis surgida de este trabajo de tesis.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. **Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis.** *Mod Pathol* 1998. **11**(2):155-168.
2. Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K. **Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways.** *Cell* 1997; **89**(7):1175-1184.
3. Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, Kundu TK. **Curcumin, a Novel p300/CREB-binding Protein-specific Inhibitor of Acetyltransferase, Represses the Acetylation of Histone/Nonhistone Proteins and Histone Acetyltransferase-dependent Chromatin Transcription.** *J Biol Chem* 2004, **279** (49): 51163–51171.
4. Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T. **Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro.** *Oncogene* 1995, **11** (12):2509-2514.
5. Bannister AJ, Kouzarides T. **The CBP co-activator is a histone acetyltransferase.** *Nature* 1996,**384**: 641–643.
6. Bannister AJ, Miska EA. **Regulation of gene expression by transcription factor acetylation.** *Cell Mol Life Sci* 2000, **57** (8-9):1184-92.
7. Bannister AJ1, Miska EA, Görlich D, Kouzarides T. **Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300.** *Curr Biol* 2000, **10** (8):467-470.
8. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson

- AL, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Weigelt B, Ellis IO, Reis-Filho JS. **Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists.** *Mod Pathol* 2011, **24**(2):157-167.
9. Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM. **p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation.** *Genes Dev* 2004, **18**(8):862-76.
10. Bhandaru M, Ardekani GS, Zhang G, Martinka M, McElwee KJ, Li G, Rotte A. **A combination of p300 and Braf expression in the diagnosis and prognosis of melanoma.** *BMC Cancer* 2014, **14**(1):398. doi: 10.1186/1471-2407-14-398.
11. Bloom 1, Pagano M. **Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation.** *Semin Cancer Biol* 2003, **13** (1):41-7.
12. Borrow J, Stanton VP, Jr., Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RSK, Civin CI, Distech C, Dubé I, Frischauf AM, Horsman D, Mitelman F, Volinia S, Watmore AE, Housman DE. **The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein.** *Nat Genet* 1996, **14**:33-41.
13. Brouillard F, Cremisi CE. **Concomitant increase of histone acetyltransferase activity and degradation of p300 during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells.** *J Biol Chem* 2003, **278** (41):39509-39516.
14. Bruzzone A, Vanzulli SI, Soldati R, Giulianelli S, Lanari C, Luthy IA: **Novel human breast cancer cell lines IBH-4, IBH-6, and IBH-7 growing in nude mice.** *J Cell physiol* 2009, **219**:477-484.

15. Bryan EJ, Jokubaitis VJ, Chamberlain NL, Baxter SW, Dawson E, Choong DY, Campbell IG. **Mutation analysis of EP300 in colon, breast and ovarian carcinomas.** *Int J Cancer* 2002, **102**(2):137-141.
16. Carlson RW, Allred DC, Anderson BO, Burstein HJ, Carter WB, Edge SB, Erban JK, Farrar WB, Goldstein LJ, Gradishar WJ, Hayes DF, Hudis CA, Jahanzeb M, Kiel K, Ljung BM, Marcom PK, Mayer IA, McCormick B, Nabell LM, Pierce LJ, Reed EC, Smith ML, Somlo G, Theriault RL, Topham NS, Ward JH, Winer EP, Wolff AC. **Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology.** *J Natl Compr Canc Netw* 2009, **7** (2), 122–192.
17. Chan HM, La Thangue NB. **p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 13):2363-2373.
18. Chan HM, Krstic-Demonacos M, Smith L, Demonacos C, La Thangue NB. **Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(7):667-674.
19. Chang YW, Chen HA, Tseng CF, Hong CC, Ma JT, Hung MC, Wu CH, Huang MT, Su JL. **De-acetylation and degradation of HSPA5 is critical for E1A metastasis suppression in breast cancer cells.** *Oncotarget* 2014, **5**(21):10558-10570.
20. Chen H, Hung MC. **Involvement of co-activator p300 in the transcriptional regulation of the HER-2/neu gene.** *J. Biol. Chem* 1997, **272**:6101-6104.
21. Chen J, Halappanavar S, Th' ng JP, Li Q. **Ubiquitin-dependent distribution of the transcriptional coactivator p300 in cytoplasmic inclusion bodies.** *Epigenetics* 2007, **2** (2): 92–99.
22. Chen J, Halappanavar SS, St-Germain JR, Tsang BK, Li Q. **Role of Akt/protein kinase B in the activity of transcriptional coactivator p300.** *Cel. Mol Life Sci* 2004, **61** (13): 1675–1683.

23. Chen J, Li Q. **Life and death of transcriptional co-activator p300.** *Epigenetics* 2011, **6**(8):957-961.
24. Chen Y, Shu W, Chen W, Wu Q, Liu H and Cui G. **Curcumin, both Histone Deacetylase and p300/CBP-Specific Inhibitor, Represses the Activity of Nuclear Factor Kappa B and Notch 1 in Raji Cells.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007, **101**: 427–433.
25. Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. **Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP.** *Nature* 1993, **365**:855-859.
26. Cho YA, Hong JS, Choe EJ, Yoon HJ, Hong SD, Lee JI, Hong SP. **The role of p300 in the tumor progression of oral squamous cell carcinoma.** *J Oral Pathol Med* 2014. doi: 10.1111/jop.12227.
27. Chung HH, Sze SK, Tay AS, Lin VC. **Acetylation at lysine 183 of progesterone receptor by p300 accelerates DNA binding kinetics and transactivation of direct target genes.** *J Biol Chem* 2014, **289**(4):2180-2194.
28. Curino AC, Engelholm LH, Yamada SS, Holmbeck K, Lund LR, Molinolo A.A., Behrendt N, Nielsen BS, Bugge TH. **Intracellular collagen degradation mediated by uPARAP/Endo180 is a major pathway of extracellular matrix turnover during malignancy.** *J Cell Biol* 2005, **169** (6): 977–985.
29. Davies AH, Reipas KM, Pambid MR, Berns R, Stratford AL, Fotovati A, Firmino N, Astanehe A, Hu K, Maxwell C, Mills GB, Dunn SE. **YB-1 transforms human mammary epithelial cells through chromatin remodeling leading to the development of basal-like breast cancer.** *Stem Cells* 2014, **32**(6):1437-1450.

30. Debes JD, Sebo TJ, Lohse CM, Murphy LM, Haugen DA, Tindall DJ. **p300 in prostate cancer proliferation and progression.** *Cancer Res* 2003, **63**(22):7638-7640.
31. Debes JD, Sebo TJ, Heemers HV, Kipp BR, Haugen DL, Lohse CM, Tindall DJ. **p300 modulates nuclear morphology in prostate cancer.** *Cancer Res* 2005, **65**(3):708-712.
32. Dietze EC, Caldwell LE, Marcom K, Collins SJ, Yee L, Swisshelm K, Hobbs KB, Bean GR, Seewaldt VL. **Retinoids and retinoic acid receptors regulate growth arrest and apoptosis in human mammary epithelial cells and modulate expression of CBP/p300.** *Microsc Res Tech* 2002, **59**(1):23-40.
33. Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, Montecchia F, Charreau EH, Pasqualini CD, Lanari C. **Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma.** *Breast Cancer Res Treat* 1995, **35**: 173–186.
34. Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, Livingston DM. **Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor.** *Genes Dev* 1994, **8**:869-884.
35. Eckner R, Ludlow JW, Lill NL, Oldread E, Arany Z, Modjtahedi N, DeCaprio JA, Livingston DM and Morgan JA. **Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen.** *Mol. Cell. Biol.* 1996, **16**:3454–3464.
36. Edge SB, Byrd DR (eds). **AJCC cancer staging manual.** 2010, *Springer*, New York.
37. Edge SB, Compton CC. **The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.** *Ann Surg Oncol* 2010, **17**(6):1471-1474.

38. Eliseeva ED, Valkov V, Jung M, Jung MO: **Characterization of novel inhibitors of histone Acetyltransferases.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6** (9):2391–2398.
39. Fan S, Ma YX, Wang C, Yuan RQ, Meng Q, Wang JA, Erdos M, Goldberg ID, Webb P, Kushner PJ, Pestell RG, Rosen EM. **p300 Modulates the BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity.** *Cancer Res* 2002, **62**(1):141-151.
40. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, Macgrogan G, Bergh J, Cameron D, Goldstein D, Duss S, Nicoulaz AL, Brisken C, Fiche M, Delorenzi M, Iggo R. **Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis.** *Oncogene* 2005, **24**(29):4660-4671.
41. Filigheddu N, Sampietro S, Chianale F, Porporato PE, Gaggianesi M, Gregnanin I, Rainero E, Ferrara M, Perego B, Riboni F, Baldanzi G, Graziani A, Surico N. **Diacylglycerol kinase  $\alpha$  mediates 17- $\beta$ -estradiol-induced proliferation, motility, and anchorage-independent growth of Hec-1<sup>a</sup> endometrial cancer cell line through the G protein-coupled estrogen receptor GPR30.** *Cell Signall* 2011, **23**: 1988-1996.
42. Gao Y, Geng J, Hong X, Qi J, Teng Y, Yang Y, Qu D, Chen G. **Expression of p300 and CBP is associated with poor prognosis in small cell lung cancer.** *Int J Clin Exp Pathol* 2014, **7**(2):760-767.
43. Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Sowter HM, Delhanty JD, Ponder BA, Kouzarides T, Caldas C. **Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers.** *Nat Genet* 2000, **24**(3):300-303.
44. Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. **Protocols for screening chemical agents and natural products against**

- animal tumors and other biological systems.** *Cancer Chemotherapy Reports* 1972, **3**:1-103.
45. Giles RH, Peters DJ, Breuning MH. **Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease.** *Trends Genet* 1998, **14**(5):178-183.
46. Giordano A, Avantaggiati ML. **p300 and CBP: partners for life and death.** *J Cell Physiol* 1999, **181**(2): 218-30.
47. Goodman RH, Smolik S. **CBP/p300 in cell growth, transformation, and development.** *Genes Dev* 2000, **14**(13):1553-77.
48. Ghosh AK1, Yuan W, Mori Y, Varga J. **Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators.** *Oncogene* 2000, **19**(31):3546-3555.
49. Green AR, Burney C, Granger CJ, Paish EC, El-Sheikh S, Rakha EA, Powe DG, Macmillan RD, Ellis IO, Stylianou E. **The prognostic significance of steroid receptor co-regulators in breast cancer: co-repressor NCOR2/SMRT is an independent indicator of poor outcome.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, **110** (3):427–437.
50. Grossman SR, Perez M, Kung AL, Joseph M, Mansur C, Xiao ZX, Kumar S, Howley PM, Livingston DM. **p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation.** *Mol Cell* 1998 **2**(4):405-415.
51. Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, Nakatani Y, Livingston DM. **Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300.** *Science* 2003, **300**(5617):342-344.
52. Gu W1, Roeder RG. **Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain.** *Cell* 1997, **90**(4):595-606.

53. Guedj M, Marisa L, de Reynies A, Orsetti B, Schiappa R, Bibeau F, MacGrogan G, Lerebours F, Finetti P, Longy M, Bertheau P, Bertrand F, Bonnet F, Martin AL, Feugeas JP, Bièche I, Lehmann-Che J, Lidereau R, Birnbaum D, Bertucci F, de Thé H, Theillet C. **A refined molecular taxonomy of breast cancer.** *Oncogene* 2012, **31**(9):1196-1206.
54. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. **Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease.** *Mol Cell Biol* 1992, **2** (3) 954–961.
55. Han Y, Jeong HM, Jin YH, Kim YJ, Jeong HG, Yeo CY, Lee KY. **Acetylation of histone deacetylase 6 by p300 attenuates its deacetylase activity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **383**: 88–92.
56. Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
57. Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
58. Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halachmi S, Liu H, Searcy B, Kurokawa R, Brown M. **p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(21):11540-11545.
59. Heemers HV1, Debes JD, Tindall DJ. **The role of the transcriptional coactivator p300 in prostate cancer progression.** *Adv Exp Med Biol* 2008, 617:535-540.
60. Hideshima T, Bradner JE, Wong J, Chauhan D, Richardson P, Schreiber SL, Anderson KC. **Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma.** *PNAS* 2005, 102 (24): 8567-8572.
61. Horwitz KB, McGuire WL. **Specific progesterone receptors in human breast cancer.** *Steroids* 1975, **25**:497–505.

62. Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL. **Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen.** *Endocrinology* 1978, **103**:1742–1751.
63. Hou X1, Li Y, Luo RZ, Fu JH, He JH, Zhang LJ, Yang HX. High expression of the transcriptional co-activator p300 predicts poor survival in resectable non-small cell lung cancers. *Eur J Surg Oncol* 2012, **38**(6):523-530.
64. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend MG, Sawyer LR, Wu J, Liu Y, Nanda R, Tretiakova M, Ruiz Orrico A, Dreher D, Palazzo JP, Perreard L, Nelson E, Mone M, Hansen H, Mullins M, Quackenbush JF, Ellis MJ, Olopade OI, Bernard PS, Perou CM. **The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms.** *BMC Genomics* 2006, **7**:96.
65. Hudelist G, Czerwenka K, Kubista E, Marton E, Pischinger K, Singer CF. **Expression of sex steroid receptors and their co-factors in normal and malignant breast tissue: AIB1 is a carcinoma-specific co-activator.** *Breast Cancer Res Treat* 2003, **78**(2): 193-204.
66. Huh JW, Kim HC, Kim SH, Park YA, Cho YB, Yun SH, Lee WY, Chun HK. **Prognostic impact of p300 expression in patients with colorectal cancer.** *J Surg Oncol* 2013; **108**(6):374-377.
67. Inuzuka H, Gao D, Finley LW, Yang W, Wan L, Fukushima H, Chin YR, Zhai B, Shaik S, Lau AW, Wang Z, Gygi SP, Nakayama K, Teruya-Feldstein J, Toker A, Haigis MC, Pandolfi PP, Wei W. **Acetylation-dependent regulation of Skp2 function.** *Cell* 2012, **150**(1):179-193.
68. Isharwal S, Miller MC, Marlow C, Makarov DV, Partin AW, Veltri RW. **p300 (histone acetyltransferase) biomarker predicts prostate cancer**

- biochemical recurrence and correlates with changes in epithelia nuclear size and shape. *Prostate* 2008, 68(10):1097-104.**
69. Ishihama K, Yamakawa M, Semba S, Takeda H, Kawata S, Kimura S, Kimura W. **Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. *J Clin Pathol* 2007, 60(11):1205-1210.**
70. Iyer NG, Ozdag H and Caldas C. **p300/CBP and cancer. *Oncogene* 2004, 23: 4225–4231.**
71. Janknecht R. **The versatile functions of the transcriptional coactivators p300 and CBP and their roles in disease. *Histol Histopathol* 2002, 17(2):657-68.**
72. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. **Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 1998, 143(7):1883-98.**
73. Kalkhoven E. **CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* 2004, 8(6):1145-1155.**
74. Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG. **Roles of CREB-binding protein (CBP)/p300 in respiratory epithelium tumorigenesis. *Cell Res* 2007, 17:324-332.**
75. Kawaguchi Y, Ito A, Appella E, Yao TP. **Charge modification at multiple C-terminal lysine residues regulates p53 oligomerization and its nucleus-cytoplasm trafficking. *J Biol Chem* 2006, 281(3):1394-1400.**
76. Kim EJ, Choi MR, Park H, Kim M, Hong JE, Lee JY, Chun HS, Lee KW, Yoon Park JH. **Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. *Breast Cancer Research* 2011, 13(4):R78.**

77. Kim MS, Lee SH, Yoo NJ, Lee SH. **Frameshift mutations of tumor suppressor gene EP300 in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability.** *Hum Pathol* 2013, **44**(10):2064-2070.
78. Kim SH, Kang HJ, Na H, Lee MO. **Trichostatin A enhances acetylation as well as protein stability of ERalpha through induction of p300 protein.** *Breast Cancer Res* 2010, **12**(2):R22.
79. Kim TK, Kim TH, Maniatis T. **Efficient recruitment of TFIIB and CBP-RNA polymerase II holoenzyme by an interferon-beta enhanceosome in vitro.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(21):12191-12196.
80. Kirilyuk A, Shimoji M, Catania J, Sahu G, Pattabiraman N, Giordano A, Albanese C, Mocchetti I, Toretsky JA, Uversky VN, Avantaggiati ML. **An intrinsically disordered region of the acetyltransferase p300 with similarity to prion-like domains plays a role in aggregation.** *PLoS One* 2012, **7**(11):e48243.
81. Koshiishi N, Chong J-M, Fukasawa T, Ikeno R, Hayashi Y, Funata N, Nagai N, Miyaki M, Matsumoto Y, Fukayama M. **p300 gene alterations in intestinal and diffuse types of gastric carcinoma.** *Gastric Cancer* 2004, **7**: 85–90.
82. Kopito RR. **Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation.** *Trends Cell Biol* 2000, **10** (12) 524–530.
83. Kouzarides T. **Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?** *EMBO J* 2000, **19**(6):1176-1179.
84. Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Tanaka K, Yamamoto S, Sonoo H: **Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators and corepressors in breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**: 512–518.

85. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. **World Health Organization classification of tumours of the breast.** 2012, IARC, Lyon.
86. Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MC, Giulianelli S, Cerliani JP, Wargon V, Molinolo A. **The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2009, **16**:333–350.
87. Lanari C, Wargon V, Rojas P, Molinolo AA. **Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready?** *Endocr Relat Cancer* 2012, **19**:35–50.
88. Lee IH, Finkel T. **Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase.** *J Biol Chem* 2009, **284**(10):6322- 6328.
89. Lee YH, Bedford MT, Stallcup MR. **Regulated recruitment of tumor suppressor BRCA1 to the p21 gene by coactivator methylation.** *Genes Dev* 2011, **25**(2):176-188.
90. Le Gallo M, O'Hara AJ, Rudd ML, Urick ME, Hansen NF, O'Neil NJ, Price JC, Zhang S, England BM, Godwin AK, Sgroi DC; NIH Intramural Sequencing Center (NISC) Comparative Sequencing Program, Hieter P, Mullikin JC, Merino MJ, Bell DW. **Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes.** *Nat Genet* 2012, **44**(12):1310-1315.
91. Li M, Luo R-Z, Chen J-W, Cao Y, Lu J-B, He J-H, Wu Q-L, Cai M-Y. **High expression of transcriptional coactivator p300 correlates with aggressive features and poor prognosis of hepatocellular carcinoma.** *J Trans Med* 2011, **9**(5):2-11.
92. Li Y, Yang H-X, Luo R-Z, Zhang Y, Li M, Wang X and Jia W-H. **High Expression of p300 Has an Unfavorable Impact on Survival in Resectable Esophageal Squamous Cell Carcinoma.** *Ann Thorac Surg* 2011, **91**:1531– 8.

93. Liao D, Yang H and Luo J. **Targeting p300 for inhibiting triple negative breast cancer.** *Cancer Res* 2012, **72**(8) doi:1538-7445.AM2012-4763.
94. Liao ZW, Zhou TC, Tan XJ, Song XL, Liu Y, Shi XY, Huang WJ, Du LL, Tu BJ, Lin XD. **High expression of p300 is linked to aggressive features and poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma.** *J Transl Med* 2012, 10:110. doi: 10.1186/1479-5876-10-110.
95. Liefers GJ1, Tollenaar RA. **Cancer genetics and their application to individualised medicine.** *Eur J Cancer* 2002, **38**(7):872-879.
96. Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM. **Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators.** *Nature* 1997, **387**(6635):823-827.
97. Lin EY, Jones JG, Li P, Zhu L, Whitney KD, Muller WJ, Pollard JW. Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol* 2003, **163** (5):2113-2126.
98. Liu Y, Mayo MW, Nagji AS, Hall EH, Shock LS, Xiao A, Stelow EB, Jones DR. **BRMS1 suppresses lung cancer metastases through an E3 ligase function on histone acetyltransferase p300.** *Cancer Res* 2013, **73**(4):1308-1317.
99. Liu Z, Luo X, Liu L, Zhao W, Guo S, Guo Y, Wang N, He H, Liao X, Ma W, Zhou H, Zhang T. **Histone acetyltransferase p300 promotes MKL1-mediated transactivation of catechol-O-methyltransferase gene.** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2013, **45**(12):1002-1010.
100. Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, (4):402-408.

101. Lu P1, Zhang D, Gao Y, Hu C. **Expression and significance of TSG101, P21 and P300/CBP in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung.** *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2007, **10**(3):197-202.
102. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. **Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers.** *Cancer Biol Ther* 2010, **10**(10):955-960.
103. Marcu MG, Jung YJ, Lee S, Chung EJ, Lee MJ, Trepel J, Neckers L. **Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase.** *Med Chem* 2006, **2**(2):169-174.
104. Martínez-Balbás MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. **Regulation of E2F1 activity by acetylation.** *EMBO J* 2000, **19**(4):662-671.
105. Marzio G, Wagener C, Gutierrez MI, Cartwright P, Helin K, Giacca M. **E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation.** *J Biol Chem* 2000, **275**(15):10887-10892.
106. Merika M, Williams AJ, Chen G, Collins T, Thanos D. **Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription.** *Mol Cell* 1998, **1**(2):277-287.
107. Missero C, Calautti E, Eckner R, Chin J, Tsai LH, Livingston DM, Dotto GP. **Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(12):5451-5455.
108. Mooney SM, Goel A, D'Assoro AB, Salisbury JL, Janknecht R. **Pleiotropic effects of p300-mediated acetylation on p68 and p72 RNA helicase.** *J Biol Chem* 2010, **285**(40):30443-30452.

109. Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K. **The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats.** *J Clin Invest* 2008, **8**(3):868-878.
110. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. **ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor.** *FEBS Lett* 1996, **392**:49–53.
111. Muraoka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Shitara N, Chong JM, Iwama T, Miyaki M. **p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas.** *Oncogene* 1996, **12**(7):1565-1569.
112. Naryzhny SN, Lee H. **The post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen: acetylation, not phosphorylation, plays an important role in the regulation of its function.** *J Biol Chem* 2004, **279**(19):20194- 20199.
113. Ogiwara H, Kohno T. **CBP and p300 histone acetyltransferases contribute to homologous recombination by transcriptionally activating the BRCA1 and RAD51 genes.** *PLoS One* 2012, **7**(12):e52810. doi: 10.1371/journal.pone.0052810.
114. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. **The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases.** *Cell* 1996, **87**(5):953-959.
115. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Pedamallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, Cherniack AD, Ambrogio L, Cibulskis K, Bertelsen B, Romero-Cordoba S, Treviño V, Vazquez-Santillan K, Guadarrama AS, Wright AA, Rosenberg MW, Duke F, Kaplan B, Wang R, Nickerson E, Walline HM, Lawrence MS, Stewart C, Carter SL, McKenna A, Rodriguez-Sanchez IP, Espinosa-Castilla M, Woie K, Bjorge L, Wik E, Halle MK, Hoivik EA, Krakstad C, Gabiño NB, Gómez-Macías GS, Valdez-Chapa LD, Garza-

- Rodríguez ML, Maytorena G, Vazquez J, Rodea C, Cravioto A, Cortes ML, Greulich H, Crum CP, Neuberger DS, Hidalgo-Miranda A, Escareno CR, Akslen LA, Carey TE, Vintermyr OK, Gabriel SB, Barrera-Saldaña HA, Melendez-Zajgla J, Getz G, Salvesen HB, Meyerson M. **Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas.** *Nature* 2014, **506**(7488):371-375.
116. Opar A. **ASCO presentations highlight value of cancer biomarkers.** *Nat Rev Drug Discov* 2008, **7**(7):547-548.
117. Ouyang H, Ali YO, Ravichandran M, Dong A, Qiu W, MacKenzie F, Dhe-Paganon S, Arrowsmith CH, Zhai RG. **Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini.** *J Biol Chem* 2012, **287**(4):2317-27.
118. Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G, Horwitz KB. **Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300.** *J Biol Chem* 199, **273**(17):10696-10701.
119. Pao GM, Janknecht R, Ruffner H, Hunter T, Verma IM. **CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(3):1020-1025.
120. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. **Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(8):1160-1167.
121. Peña C, García JM, García V, Silva J, Domínguez G, Rodríguez R, Maximiano C, García de Herreros A, Muñoz A, Bonilla F. **The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the**

**correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas.** *Int J Cancer* 2006, **119**(9):2098-2104.

122. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**:747-752.
123. Petit V, Thiery JP. **Focal adhesions: structure and dynamics.** *Biol Cell* 2000, **92**(7):477-494.
124. Pouponnot C, Jayaraman L, Massagué J. **Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP.** *J Biol Chem* 1998, **273**(36):22865-22868.
125. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. **Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2010, **12**(5):R68. doi: 10.1186/bcr2635. Epub 2010 Sep 2.
126. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. **Combinatorial biomarker expression in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **120**:293–308.
127. Remmele W, Stegner HE. **Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue.** *Pathologe* 1987, **8**:138–140.
128. Rotte A, Bhandaru M, Cheng Y, Sjoestroem C, Martinka M, Li G. **Decreased Expression of Nuclear p300 Is Associated with Disease Progression and Worse Prognosis of Melanoma Patients.** *PLOS ONE* 2013, **8**(9): 1-12.

129. Sambrook J, Fritsch ET, Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1989.
130. Scolnick DM, Chehab NH, Stavridi ES, Lien MC, Caruso L, Moran E, Berger SL, Halazonetis TD. **CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein.** *Cancer Res* 1997, **57**(17):3693-3696.
131. Shi D, Pop MS, Kulikov R, Love IM, Kung AL, Grossman SR. **CBP and p300 are cytoplasmic E4 polyubiquitin ligases for p53.** *PNAS* 2009, **106** (38): 16275–16280.
132. Shukrun M, Jabareen A, Abou-Kandil A, Chamias R, Aboud M, Huleihel M. **HTLV-1 Tax oncoprotein inhibits the estrogen-induced-ER  $\alpha$ -Mediated BRCA1 expression by interaction with CBP/p300 cofactors.** *PLoS One* 2014, **9**(2):e89390. doi: 10.1371/journal.pone.0089390.
133. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:10869- 10874.
134. Stein RW, Corrigan M, Yaciuk P, Whelan J, Moran E. **Analysis of E1A-mediated growth regulation functions: binding of the 300-kilodalton cellular product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity.** *J Virol* 1990, **64**:4421-4427.
135. Stossi F, Madak-Erdogan Z, Katzenellenbogen BS. **Estrogen receptor alpha represses transcription of early target genes via p300 and CtBP1.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**(7):1749-1759.

136. Subbaramaiah K, Hudis C, Chang SH, Hla T, Dannenberg AJ. **EP2 and EP4 receptors regulate aromatase expression in human adipocytes and breast cancer cells. Evidence of a BRCA1 and p300 exchange.** *J Biol Chem* 2008, **283**(6):3433-3444.
137. Sunagawa Y, Sono S, Katanasaka Y, Funamoto M, Hirano S, Miyazaki Y, Hojo Y, Suzuki H, Morimoto E, Marui A, Sakata R, Ueno M, Takeya H, Wada H, Hasegawa K, Morimoto T. **Optimal Dose-Setting Study of Curcumin for Improvement of Left Ventricular Systolic Function After Myocardial Infarction in Rats.** *J Pharmacol Sci* 2014 Nov 19.
138. Syrjänen S, Naud P, Sarian L, Derchain S, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, Tatti S, Branca M, Erzen M, Serpa-Hammes L, Matos J, Arlindo F, Sakamoto-Maeda M, Costa S, Syrjänen K. **p300 expression is related to high-risk human papillomavirus infections and severity of cervical intraepithelial neoplasia but not to viral or disease outcomes in a longitudinal setting.** *Int J Gynecol Pathol* 2010, **29**(2):135-145.
139. Tang HY, Shih A, Cao HJ, Davis FB, Davis PJ, Lin HY. **Resveratrol-induced cyclooxygenase-2 facilitates p53-dependent apoptosis in human breast cancer cells.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(8):2034-2042.
140. Tomita A, Towatari M, Tsuzuki S, Hayakawa F, Kosugi H, Tamai K, Miyazaki T, Kinoshita T, Saito H. **c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300.** *Oncogene* 2000, **19**(3): 444-451.
141. Urtreger AJ, Ladedá VE, Puricelli LI, Rivelli A, Vidal MC, Sacerdote de Lustig E, Bal de Kier Joffé E. **Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two murine mammary tumor cell lines.** *Int J Oncol* 1997, **11**:489–496.

142. Vleugel MM, Shvarts D, van der Wall E, van Diest PJ. **p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer.** *Hum Pathol* 2006, **37**(8):1085–1092.
143. Vo N, Goodman RH. **CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation.** *J Biol Chem* 2001, **276**(17):13505-13508.
144. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. **Cancer genome landscapes.** *Science* 2013, **339**(6127):1546-1558.
145. Wang Z, Inuzuka H, Zhong J, Liu P, Sarkar FH, Sun Y, Wei W. **Identification of acetylation-dependent regulatory mechanisms that govern the oncogenic functions of Skp2.** *Oncotarget* 2012, **3**(11):1294-1300.
146. Wang Q, Li J, Yang X, Sun H, Gao S, Zhu H, Wu J, Jin W. **Nrf2 is associated with the regulation of basal transcription activity of the BRCA1 gene.** *Acta Biochim Biophys Sin* 2013, **45**(3):179-187.
147. Whyte P, Williamson NM, Harlow E. **Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins.** *Cell* 1989, **56**:67-75.
148. Wirtenberger M, Tchatchou S, Hemminki K, Schmutzhard J, Sutter C, Schmutzler RK, Meindl A, Wappenschmidt B, Kiechle M, Arnold N, Weber BH, Niederacher D, Bartram CR, Burwinkel B. **Associations of genetic variants in the estrogen receptor coactivators PPARGC1A, PPARGC1B and EP300 with familial breast cancer.** *Carcinogenesis* 2006, **27**(11):2201-2208.
149. Wong PP, Pickard A, McCance DJ. **p300 alters keratinocyte cell growth and differentiation through regulation of p21(Waf1/CIP1).** *PLoS One* 2010, **5**(1):e8369. doi: 10.1371/journal.pone.0008369.

150. Xiao X, Cai M, Chen J, Guan X, Kung H, Zeng Y, Xie D. **High Expression of p300 in Human Breast Cancer Correlates with Tumor Recurrence and Predicts Patients Adverse Prognosis.** *Chin J Cancer Res* 2011, **23**(3):3-9.
151. Yang H, Pinello CE, Luo J, Li D, Wang Y, Zhao LY, Jahn SC, Saldanha SA, Planck J, Geary KR, Ma H, Law BK, Roush WR, Hodder P and Liao D: **Small-Molecule Inhibitors of Acetyltransferase p300 Identified by High-Throughput Screening Are Potent Anticancer Agents.** *Mol Cancer Ther* 2013 **12**(5): 610-620.
152. Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, Bronson RT, Li E, Livingston DM, Eckner R. **Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300.** *Cell* 1998, **93**(3):361-372.
153. Yokomizo C, Yamaguchi K, Itoh Y, Nishimura T, Umemura A, Minami M, Yasui K, Mitsuyoshi H, Fujii H, Tochiki N, Nakajima T, Okanoue T, Yoshikawa T. **High expression of p300 in HCC predicts shortened overall survival in association with enhanced epithelial mesenchymal transition of HCC cells.** *Cancer Lett* 2011, **310**(2):140-147.
154. Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Shioya H, Utsugisawa Y, Shi Y, Weichselbaum R, Kufe D. **Function for p300 and not CBP in the apoptotic response to DNA damage.** *Oncogene* 1999, **18**(41):5714-5717.
155. Zaarur N, Meriin AB, Gabai VL, Sherman MY. **Triggering aggresome formation. Dissecting aggresome-targeting and aggregation signals in synphilin 1.** *J Biol Chem* 2008, **283**(41):27575-84.
156. Zhang C, Li K, Wei L, Li Z, Yu P, Teng L, Wu K, Zhu J. **p300 expression repression by hypermethylation associated with tumour invasion and**

**metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma.** *J Clin Pathol* 2007, **60**(11):1249-53.

157. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, Olashaw N, Parsons JT, Yang XJ, Dent SR, Yao TP, Lane WS, Seto E. **HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin.** *Mol Cell* 2007, **27**(2):197-213.
158. Zhang Y, Zhang M, Dong H, Yong S, Li X, Olashaw N, Kruk PA, Cheng JQ, Bai W, Chen J, Nicosia SV, Zhang X. **Deacetylation of cortactin by SIRT1 promotes cell migration.** *Oncogene* 2009, **28**(3):445-460.
159. Zhang LH, Huang Q, Fan XS, Wu HY, Yang J, Feng AN. Clinicopathological significance of SIRT1 and p300/CBP expression in gastroesophageal junction (GEJ) cancer and the correlation with E-cadherin and MLH1. *Pathol Res Pract* 2013, **209**(10):611-617.
160. Zhou J, Zhan S, Tan W, Cheng R, Gong H, Zhu Q. **P300 binds to and acetylates MTA2 to promote colorectal cancer cells growth.** *Biochem Biophys Res Commun* 2014, **444**: 387–390.

# PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

El contenido de este trabajo forma parte de las siguientes publicaciones, premios y presentaciones a congresos y simposios:

## Publicaciones

**Inhibition of p300 suppresses growth of breast cancer: role of its subcellular localization.** María E. Fermento, Norberto A. Gandini, Débora G. Salomón, María J. Ferronato, Cristian A. Vitale, Julián Arévalo, Alejandro López Romero, Myriam Nuñez, Manfred Jung, María M. Facchinetti, Alejandro C. Curino. *Experimental and Molecular Pathology*, N° 97, pp 411–424, 2014.

## Premios

**Premio accésit** otorgado al trabajo de investigación presentado en las XXIII Jornadas Nacionales de Oncología del Instituto Ángel H Roffo, 29-31 agosto 2007, Buenos Aires, cuyo título es P53 Y P300 Son Reclutados En Agresomas De Adenocarcinomas Mamarios Murinos Pero Están Ausentes De Estas Inclusiones Yuxtannucleares En La Glándula Mamaria Normal. Autores: Fermento ME.; Lang C; Gandini NA; Fiore L; Facchinetti MM & Curino AC.

## Trabajos seleccionados para simposios

**Rol del P300 en líneas celulares y biopsias humanas de carcinoma mamario triple negativo.** Seleccionado para su presentación en el Simposio “**Avances en Oncología**” bajo la modalidad de charla corta. María E Fermento, Norberto A Gandini, Débora G Salomón, Lucila Gonzalez Donna, Alejandro Ferro, María M Facchinetti, Alejandro Curino. LVIII reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas (SAIC), 20-23 de noviembre de 2013, Mar del Plata.

## Presentaciones a congresos

**La inhibición de p300 retarda el crecimiento del carcinoma mamario a través de la modulación de la proliferación celular y de la apoptosis. Importancia de la localización subcelular de este cofactor transcripcional.** María E Fermento, Norberto A Gandini, Julián Arévalo, Jorge Blasco, Alejandro Lopez Romero, Lucila Gonzalez Donna, Alejandro Ferro, Débora G Salomón, María J Ferronato, María M Facchinetti, Alejandro Curino. LVII reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas (SAIC), 14-17 de noviembre de 2012, Mar del Plata.

**Efecto de la inhibición de p300 en la progresión del carcinoma mamario.** Fermento M E, Salomón DG, Gandini N A, Ferronato MJ, Facchinetti M M y Curino A C. LVI reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas (SAIC), 16-19 noviembre del 2011, Mar del Plata.

**Rol de p300 en la progresión del carcinoma mamario.** Fermento M E, Buzchiazzo M, Andrés N C, Gandini N A, Curino A C y Facchinetti M M, LV reunión anual de la SAIC, 17-20 noviembre del 2010, Mar del Plata.

**Rol de P300/CBP en carcinoma mamario.** Fermento M E, Grioli S M, Gravina N A, Salomón D G, Andrés N C, Gandini N A, Facchinetti M M y Curino AC. XXVI Jornadas de Oncología del Instituto Ángel H. Roffo. Buenos Aires, Septiembre, 2010.

**El cofactor transcripcional p300/cbp se encuentra sobreexpresado y en una inusual localización citoplasmática en adenocarcinoma mamario humano y de rata.** Fermento M E, Gandini N A, Lang CA, Maturi H V, Agriello E, Facchinetti M M & Curino A C. LIII Reunión Científica Anual de la SAIC, 19-22 de noviembre del 2008, Mar del Plata.

**Sobreexpresión del cofactor transcripcional p300/CBP en adenocarcinoma mamario: inusual localización citoplasmática.** Fermento

M E, Gandini N A, Lang C A, Maturi H V, Agriello E, Curino A C y Facchinetti M  
M. XXIV Jornadas Nacionales de Oncología del Instituto "Angel H. Roffo".  
Buenos Aires. Octubre 2008.