

Tesis Doctoral

Interacción entre FGF2 y RE en cáncer de mama

Guillardoy, Tomás

2015-10-09

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Guillardoy, Tomás. (2015-10-09). Interacción entre FGF2 y RE en cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Guillardoy, Tomás. "Interacción entre FGF2 y RE en cáncer de mama". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-10-09.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Interacción entre FGF2 y RE en cáncer de mama

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Tomás Guillardoy

Director de Tesis: Claudia L. M. Lanari
Director Asistente: Sebastián Giulianelli
Consejero de Estudios: Anabella Srebrow
Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental
Buenos Aires, 2015.

Agradecimientos

A Claudia, por darme la oportunidad de desarrollar mi tesis en el laboratorio, por siempre aportar una nueva visión a todo mi trabajo y por confiar en mí para llevarlo adelante.

A Juan, quien fue mi primer mentor, le agradezco por haber invertido su tiempo en mí, por haberme enseñado gran parte de lo que hoy sé y por haberme ayudado en todo cuando arranqué en el laboratorio.

A Seba, por haber aportado tanto en esta tesis, me ayudó a salir adelante en los momentos de mayor frustración, y por haber siempre aportado una mirada crítica y constructiva a todo el trabajo que hicimos en conjunto.

Al resto de los investigadores del laboratorio: Caro, Vic y Pao, que con su buena onda me ayudaron a darle forma a esta tesis, con sus comentarios y sugerencias en los seminarios y con la buena onda en el día a día. Gracias a Virgi, que con su honestidad brutal pero siempre bienvenida me ayudó a encaminar muchas cosas de la mejor manera.

A mis compañeros de laboratorio, Marina, Lau, Gonza, Eme, Ani, la Colo, María y a la nueva generación, Meli, Ceci, Michelle, Jime, Aye, Andrés y Cynthia. Es por ellos, por haber compartido tantos mates, por haber compartido momentos de risa, de bronca, de frustración, de todo... Es en gran parte por ellos que llegué hasta acá y hoy soy una mejor persona por habérmelos cruzado.

Al Laboratorio de Isabel Luthy y todos sus integrantes: Ari, Lucía, Ezequiel por haber compartido desde reactivos hasta mates, charlas de pasillo e incluso aportes en la recta final de esta tesis.

Al IByME y toda su comunidad científica por haber formado parte de ella.

Al CONICET por haberme otorgado una beca tipo I y II para finalizar mi tesis doctoral.

A la Fundación Avon, por haberme becado para presentar parte de este trabajo a la comunidad científica internacional.

Al laboratorio del Dr. A. Baldi y en particular a Adrián que me proporciono el FGF2 que use en este trabajo.

Al Dr. Dan Donoghue que me facilitó el plásmido para el FGFR2-CA.

Al laboratorio del Dr JS. Gutkind y a Viqui Wargon por todo el trabajo de los arrays, y a Viqui tambien por haber compartido conmigo los primero años en el laboratorio

Al Dr. Martin Abba por su análisis minucioso de esos datos.

A mi familia, Susana, Mario y Esteban, que me apoyaron incondicionalmente, no sólo en este proyecto sino en mi vida. A Roxy, que me bancó todos estos años, las idas y vueltas, todo el detrás de escena de esta tesis y por compartir el día a día.

A todos, los quiero y nunca voy a terminar de agradecerles...

Interacción entre FGF2 y RE en cáncer de mama

La adquisición de independencia hormonal en carcinomas mamarios con expresión de receptores para hormonas esteroideas es un fenómeno frecuente con gran relevancia clínica. En este trabajo, abordamos el estudio de un posible mecanismo de activación ligando independiente del receptor de estrógenos alfa (RE α). Nuestra hipótesis se desprende de observaciones anteriores del laboratorio en las cuales observamos que el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), podía activar al receptor de progesterona (RP) a través del receptor para dicho factor (FGFR-2) en el modelo experimental murino C4 y en células de cáncer de mama humano T47D. Por otro lado, habíamos comprobado que el RE α era necesario para que el RP fuera transcripcionalmente activo. Con estas evidencias decidimos investigar si existía una interacción entre la vía de FGF2 y el RE α .

Se eligieron para este trabajo las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7, por ser la línea más frecuentemente utilizada para evaluar la funcionalidad del RE α , y la T47D, más utilizada para evaluar la función del RP, aunque también se estimulan con estrógenos. Al tratar ambas líneas celulares con FGF2, encontramos un aumento en su proliferación, que fue revertido tanto con inhibidores de FGFRs, como con el antiestrógeno puro ICI 182780 (ICI). Dicho incremento estaba acompañado por un aumento de la fosforilación de las serinas 118 y 167 del RE α en correlación con un aumento de la activación de las quinasas responsables de fosforilar a estas serinas, MAPK y Akt respectivamente. Más aún, experimentos de silenciamiento del RE α confirmaron que el mismo estaba involucrado en el efecto estimulador de la proliferación celular del FGF2. Con estos resultados, exploramos posteriormente la funcionalidad del RE α en respuesta a FGF2, demostrando que el RE α era capaz de inducir la expresión de un gen reportero luego del tratamiento con FGF2 y que no sólo era capaz de interactuar con su secuencia consenso en una construcción de ADN recombinante, sino que también se unía a esta secuencia en el ADN endógeno, induciendo la expresión de *c-MYC* y *pS2*. En particular la expresión de este último gen es considerado un indicador confiable de la activación del RE α .

Luego de evaluar la interacción de las vías de FGF2 y RE α en células MCF-7 y T47D, desarrollamos un modelo con activación constitutiva del FGFR-2 al que denominamos MCF-7 R2CA (R2CA). Estas células fueron seleccionadas hasta obtener una transfección estable, y la línea resultante presentó una morfología similar a las células control. La línea R2CA expresó mayores niveles de MAPKs fosforiladas y al evaluar la fosfoserina 118 del RE α , si bien se vio un aumento de su proporción con respecto al control de carga, al relativizarlo con los niveles de RE α totales no se evidenció un aumento

específico ya que las células R2CA expresaron mayores niveles de RE α total. Sin embargo, el efecto final resultó en una mayor activación de esta vía corroborada además, no sólo por la inducción del RP en condiciones basales, sino por un aumento en la expresión del gen *pS2*, marcador de actividad transcripcional del RE α . Curiosamente, no se observaron modificaciones en pAkt lo que sugiere que otros FGFR estarían más asociados a la activación de Akt por FGF2, mientras que FGFR-2 involucraría a Erk.

Evaluamos también el crecimiento *in vivo* del modelo R2CA en comparación con el control que no crece sin el aporte hormonal exógeno. Demostramos que la activación constitutiva del FGFR-2 le confiere una ventaja proliferativa sobre las células control ya que se pudieron establecer como xenoinjertos aunque su crecimiento fue mayor con el tratamiento con estrógenos, resultados que se conciben con los estudios *in vitro* en los cuales se observó que se activa la vía de Erk pero no la de Akt.

Posteriormente, se evaluó la relación entre las vías de RE α y FGF2 en un modelo murino de cáncer de mama. En nuestro laboratorio se desarrolló un modelo de tumores por administración prolongada de acetato de medroxiprogesterona (MPA) en hembras vírgenes de ratones BALB/c. Se establecieron líneas que necesitan la administración de MPA para crecer, denominadas hormono-dependientes, entre ellas la C4-HD, variantes que no necesitan la hormona para crecer (hormono-independientes) como la variante C4-HI y variantes independientes de hormonas y resistentes a antiprogéstágenos (hormono-independientes resistentes) como la C4-HIR. Lo interesante de este modelo es que mientras en el tumor C4-HD el tratamiento con progestágeno activa al RE α y es completamente sensible al tratamiento con antiestrógenos, la variante C4-HI muestra una activación basal del RE α medida por fosforilación en las serinas 118 y 167, y es moderadamente sensible al tratamiento con el antiestrógeno Fulvestrant. En concordancia, cuando tratamos a los tumores con los inhibidores específicos de los FGFRs los tumores son parcialmente sensibles y los tumores tratados muestran una disminución en la fosforilación de las dos serinas mencionadas del RE α , indicando una interacción cruzada de estas vías en el modelo.

Otra área de interés en el laboratorio es la regulación epigenética en relación con la adquisición de hormono independencia en cáncer de mama. En trabajos previos de nuestro grupo se estudió el rol de la metilación en los mecanismos de resistencia a antiprogéstágenos. En este trabajo de tesis decidimos estudiar el papel de los *miRNAs* (*miRNAs*) en la progresión hacia la resistencia endócrina.

Se analizó la expresión de más de 300 *miRNAs* en un *microarray*, para las tres variantes mencionadas de la familia C4. Como contábamos con la información del transcriptoma de C4-HD y C4-HI, decidimos cruzar los datos con los obtenidos del *array* de *miRNAs*. Analizamos todos los genes potencialmente regulados por algún *miRNA* sobre o sub expresado en cada comparación, y evaluamos cómo era su expresión en el transcriptoma conocido. De los genes obtenidos, se destacaban tanto *FGFR-2* como *STAT5*. En particular *STAT5* es un gen que codifica para una proteína que ya habíamos estudiado en el modelo experimental y podría formar parte de un complejo con *FGFR-2* y mediar efectos transcripcionales a través de RP. Encontramos también como candidato interesante a *PTEN*, una fosfatasa involucrada en la vía de señalización de Akt, que tiene relevancia en la activación de $RE\alpha$ ligando independiente.

Nos centramos en 5 *miRNAs*, de los cuales el miR-1 se destaca por ser el único sobre expresado en C4-HIR al compararlo con C4-HI, aunque no se pudo validar; los *miRNAs* 335 y 222, para los cuales no observamos diferencias significativas entre los tres tipos de tumores; y los *miRNAs* 31 y 155, los cuales aumentaban su expresión en las distintas variantes tumorales con estadios más avanzados de progresión tumoral: C4-HI mostró mayores niveles que C4-HD y C4-HIR que C4-HI ($p < 0.001$). Ambos *miRNAs* se encuentran involucrados en la vía de señalización de FGF2 sugiriendo su participación en la progresión hacia la resistencia hormonal en este modelo, a través de la regulación de esta vía. Estos resultados también sugieren que la expresión de estos *miRNAs* podría ser utilizada como marcador de progresión tumoral. En conclusión FGF2 es capaz de activar tanto a $RE\alpha$ como a RP en forma ligando independiente y la activación de esta vía de señalización participaría en la progresión del cáncer de mama.

Palabras clave: Cáncer de mama, FGF2, receptor hormonal, estrógenos, miRNA, vías de señalización, independencia hormonal, tumor.

Interaction between FGF2 and ER in breast cancer

The acquisition of hormone independence in breast cancer has a wide implication in patient therapeutics. In this thesis, we studied a possible mechanism of ligand-independent activation of the estrogen receptor alpha (ER α). Our hypothesis is based on previous observations, mainly from our laboratory, in which it was determined that Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) could activate the progesterone receptor (PR), through FGFR-2, in the C4 murine breast cancer model and in human breast cancer T47D cells. On the other hand, we found that ER α was necessary to mediate PR transcriptional activity. With this evidence we decided to investigate whether there was an interaction between FGF2 and ER α signaling pathways.

In this PhD thesis we used the emblematic cell line used to study ER α responses in breast cancer, the MCF-7 cells, as well as the T47D cells, which although estrogen responsive, their proliferation is triggered mainly by the PR. An increase in the proliferation rate was observed in both cell lines when treated with FGF2 that was reversed by incubation with the pure antiestrogen ICI182.780 (ICI) or by two FGFRs inhibitors, PD173074 and BGJ398. Next, we measured the phosphorylation status of the ER α , and found increased phosphorylation of serines 118 and 167, which correlated with increased MAPK and Akt activation, the kinases responsible for the phosphorylation of the mentioned sites respectively. Moreover, ER α silencing experiments confirmed that this receptor was involved in FGF2-induced cell proliferation, at more extent in MCF-7 than in T47D cells.

We then explored the functionality of the ER α in response to FGF2. We found that ER α was not only able to induce a reporter gene expression upon FGF2 treatment, but it was also able to interact with the native sequence in the DNA, inducing the expression of both *c-MYC* and *pS2*, being the latter gene considered as a trade mark of gene expression in response to estrogen receptor activation.

Then, we stably transfected MCF-7 cells with a constitutive activated FGFR-2. These cells, named R2CA MCF-7 (R2CA), express higher levels of phosphorylated MAPKs in basal conditions than the control counterpart, showing no changes in Akt activation. Accordingly, an increase in total serine 118 pER α was observed which correlated with an increase in PR and *pS2* expression. The fact that FGF2 activates both Akt and Erk pathways suggests that other FGF receptors in addition to FGFR-2 participate in FGF2-mediated actions in this model.

We evaluated the ability of R2CA cells to bypass estrogen dependency *in vivo*. The constitutive activation of FGFR-2 gave these cells a proliferative advantage over control cells which do not grow without estrogen supply. Tumors were established although they reached a small size that did not increase with time unless estrogen was administered. These results are in agreement with the previous data suggesting that activation of FGFR-2 partially mimics FGF2 effects on cell signaling.

In our laboratory we have developed a murine mammary tumor model by prolonged administration of medroxyprogesterone acetate (MPA) in female virgin BALB/c mice. These tumors originally needed MPA administration to grow and were considered as hormone-dependent being C4-HD the prototype tumor of this class. Sporadically, hormone-independent variants arise, as C4-HI, that do not need exogenous administration of hormones to grow but they still respond to antiprogesterin treatment. Upon selective pressure induced by antiprogesterin treatment, we were able to develop resistant variants such as C4-HIR. Interestingly, serine 118/167 pER α is highly expressed in hormone-independent tumors which partially respond to fulvestrant (antiestrogen) or to FGFR inhibitors, being the latter able to inhibit pER α expression, indicating an interaction between these pathways in the murine model.

Another area of interest in our Laboratory is the epigenetic regulation in relation to the acquisition of hormone resistance. In this thesis we encouraged the study of the role of miRNAs that might be associated with the FGF2 pathway. The expression of more than 300 miRNAs was analyzed in a microarray for the three mentioned variants of the C4 tumors. From this analysis all differentially expressed miRNAs were obtained in all possible comparisons between tumor variants. As we already had information about the transcriptome of C4-HD and C4-HI, we decided to cross the data with that obtained from the miRNA array. We examined all genes potentially regulated by a miRNA over- or under-expressed in each comparison, and their expression was evaluated in the known transcriptome. Two genes that stood out were *FGFR-2* and *STAT5*. In particular, *STAT5* was already studied in C4 tumors as being part of a complex with FGFR-2 mediating the transcriptional effects of PR. PTEN phosphatase, was also found as an interesting candidate involved in the Akt signaling pathway, which is relevant in the ligand independent ER α activation.

We focused in five miRNAs to further assess their relevance to mechanisms linked to tumor progression. miR-1 was the only overexpressed miRNA in C4-HIR when compared to C4-HI in the array, however we were unable to validate this data. miRNAs 335 and 222 were similarly expressed in all

tumors and miRNAs 31 and 155, which are possible FGF2-regulated miRNAs, both showed increased expression in C4-HI as compared with C4-HD and in C4-HIR as compared with C4-HI, a model that represents different stages of tumor progression. These results are in agreement with those which suggest a role for FGF2 pathway in the acquisition of hormone-independence and endocrine resistance. These results also indicate that these miRNAs might also be used as markers of tumor progression in breast cancer. In conclusion, FGF2 activates ER α , as well as PR, suggesting that alterations in key members of the FGF signaling pathway may be participating in the onset of hormone independence and/or resistance.

Key Words: Breast cancer, FGF2, hormone receptor, estrogens, miRNA, signalling pathways, hormonal independence, tumor.

Abreviaturas

AP-1	Proteína Activadora 1
BGJ	BGJ398
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
Ct	Ciclo umbral
DBD	Dominio de unión al ADN
ERE	Elemento de respuesta a Estrógenos
E ₂	17β-Estradiol
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FGFR	Receptor de FGF
HD	Hormono dependiente
HER2/neu	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (ERBB2)
HI	Hormono independiente
HIR	Hormono independiente y resistente
HRE	Elemento de respuesta a hormonas
LBD	Dominio de unión al ligando
MFP	Mifepristona o RU-486
miRNA/miR	microRNA
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
NLS	Señal de localización nuclear
PD	PD173074
PKB/Akt	Proteína quinasa B
PRM	Moduladores del Receptor de Progesterona
RA	Receptor de Andrógenos
REα	Receptor de Estrógenos alfa
REβ	Receptor de Estrógenos beta
RG	Receptor de Glucocorticoides

RPA	Receptor de Progesterona, Isoforma A
RPB	Receptor de Progesterona, Isoforma B
R2CA	FGFR-2 constitutivamente activado
SC	Subcutáneo
SERD	Disruptor selectivo de RE
SERM	Modulador selectivo de RE
SFB	Suero fetal bovino
SFBch	Suero fetal bovino depletado de esteroides (<i>charcolizado</i>)
siRNA	ARN pequeño de interferencia
3'UTR	Región tres prima sin traducir
WB	<i>Western Blot</i>
wt	<i>Wild Type</i>

Índice

AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vii
ABREVIATURAS	x
PARTE I	1
I. Introducción	1
i. Cáncer de mama	2
ii. Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y sus receptores	4
iii. Receptores de hormonas esteroides	10
iv. Receptor de Estrógenos	11
v. Mecanismo de acción de los estrógenos	12
vi. Clasificación de terapias endócrinas	15
vii. MicroRNAs (miRNAs)	17
viii. miRNAs de interés en cáncer y en la regulación de la expresión de receptores hormonales	20
II. Hipótesis	22
III. Objetivos	23
PARTE II	25
I. Materiales y métodos	25
i. Líneas celulares	26
ii. Obtención de líneas celulares transfectadas establemente	26
iii. Animales	26
iv. Tumores utilizados	27
v. Trasplantes tumorales	28
vi. Ensayos <i>in vivo</i>	28
vii. Obtención de extractos proteicos	29
viii. <i>Western Blot</i>	30
ix. Inmunohistoquímica	30
x. Inmunofluorescencia	31
xi. <i>Array</i> de miRNAs	31
xii. Medición de miRNAs	32
xiii. Medición de genes por PCR en tiempo real	32
xiv. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	34
xv. Ensayos de incorporación de ³ H-timidina	35
xvi. Ensayos de proliferación por conteo celular	35
xvii. Análisis estadístico	35
PARTE III	37
Resultados	37
Capítulo I. FGF2 y RE α	38
1.1 La estimulación de la proliferación celular con FGF2 es inhibida por el tratamiento con un antiestrógeno o por silenciamiento del RE α	38

1.2 FGF2 activa al RE α	45
1.3 Determinación de los niveles de transcripción de genes modulados por el RE α	50
1.4 Estudios sobre el promotor de un gen endógeno regulado por la vía del receptor de estrógenos	52
1.5 Generación de una línea celular con sobre expresión de una versión constitutivamente activa del FGFR-2	54
1.6 Expresión de FGFR-2, receptores hormonales y factores de interés en células MCF-7-R2CA	58
1.7 Expresión de genes regulados por RE α en el modelo MCF-7 con el gen mutante	60
1.8 Proliferación en el modelo R2CA	61
1.9 Crecimiento in vivo del modelo R2CA	63
1.10 Estudios histológicos del modelo de xenotransplantes de R2CA	67
1.11 Receptores hormonales en el modelo <i>in vivo</i> de R2CA	69
1.12 Crecimiento in vivo de tumores del modelo C4 tratados con un inhibidor de FGFRs	71
1.13 Los inhibidores de FGFR bloquean la activación del RE α sin embargo en los tumores HI sólo bloquean parcialmente el crecimiento	73
 Capitulo II. miRNAs y cáncer	 75
2.1 Análisis de un <i>micro array</i> de los miRNAs mejor caracterizados en ratón	76
2.2 Identificación de posibles genes diana para los miRNAs diferencialmente expresados en las variantes tumoraes y comparación con el transcriptoma de los tumores C4	80
2.3 Estudios de Pathway Enrichment en el modelo C4	86
2.4 Expresión de miRNAs medida por stem-loop	91
 PARTE IV	 93
Discusión	94
 PARTE V	 111
Conclusiones	112
1 Resumen de resultados	112
1.1. En células MCF-7 y T47D	112
1.2. En células MCF-7 R2CA	112
1.3. En tumores C4 del modelo murino	113
1.4. En estudios de miRNAs de tumores de la familia C4	114
TABLA 1	115
APENDICE 1	116
APENDICE 2	123
APENDICE 3	125
BIBLIOGRAFIA	126

PARTE I

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Cáncer de mama.

El cáncer de mama es una de las neoplasias malignas más frecuentes en la población mundial, siendo el más frecuente en mujeres tanto en países industrializados como en países en desarrollo. A nivel global, es la quinta causa de muerte por cáncer en el mundo, y aunque es la principal entre mujeres de países sub desarrollados, es la segunda causa de muerte después del cáncer de pulmón en países desarrollados (Ferlay et al. 2014).

En particular en la Argentina, aunque no haya estadísticas recientes, el cáncer de mama es la segunda o tercer neoplasia más frecuente, dependiendo de la edad, según una estadística llevada a cabo por el Ministerio de Salud del país, en el año 2006 (**Fig. 1-1**) (Tomado de <http://www.ms.gba.gov.ar/estadisticas/vitales>).

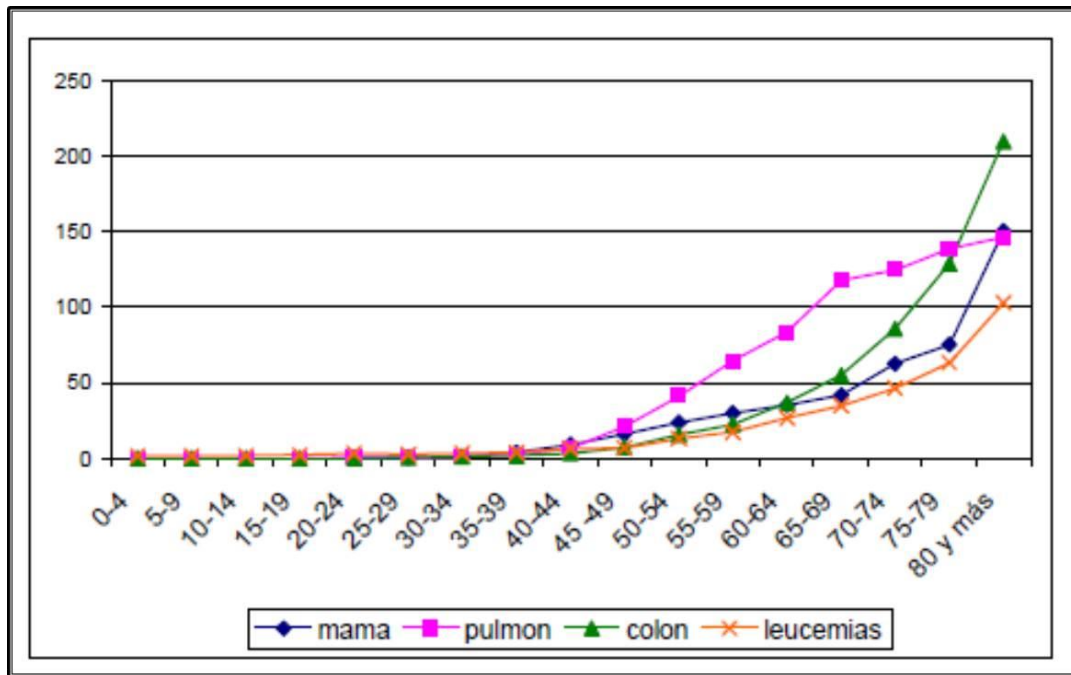


Figura 1-1. Tasas de mortalidad según edades, para las neoplasias más frecuentes, en Argentina en el 2006. (Tomado de <http://www.ms.gba.gov.ar/estadisticas/vitales>)

Existen dos tipos principales de cáncer de mama:

- Ductal, que se originaría a partir de las células epiteliales que forman los ductos galactóforos, el cual representa el 70% de los casos.
- Lobulillar, que se originaría a partir de las células epiteliales de los lobulillos y son los menos frecuentes.

Los carcinomas mamarios suelen detectarse por medio de la observación de mamografías como pequeñas calcificaciones en la mama del paciente. Son tumores muy pequeños que no invaden otros órganos. Sin tratamiento o por falta de diagnóstico, aumenta la probabilidad del desarrollo de un cáncer invasivo en un período de diez años desde el diagnóstico inicial. Una vez que el tumor adquiere la capacidad de invadir puede infiltrar otros órganos. El primer sitio donde puede diseminarse es en los ganglios linfáticos axilares, pero pueden además metastatizar en pulmón, hueso y cerebro. En esta instancia, se denomina cáncer metastásico, y se llaman tumores de mama secundarios a los tumores encontrados en estos órganos.

Cuando una paciente es diagnosticada con un cáncer de mama, se utilizan como factores pronóstico la expresión de los receptores de hormonas, el índice de proliferación utilizando el marcador Ki67 y la expresión del gen HER2/neu, todos marcadores evaluados por inmunohistoquímica. Estos marcadores permiten agrupar a los tumores en aquellos positivos para receptores hormonales, en particular los receptores de estrógenos alfa (RE α) y progesterona (RP) y aquellos que no expresan. Entre estos últimos, una subclase de tumores triple negativos (con ausencia además de expresión de HER2/neu). Esta primera clasificación, dicta el tratamiento a seguir, siendo el tamoxifeno el tratamiento por excelencia en tumores con alta expresión de RE α .

En la actualidad, si bien en la clínica se sigue utilizando al RE α para categorizar y tomar decisiones terapéuticas, con el desarrollo de las técnicas de *microarrays*, se subclasificó a los tumores mamarios tomando en cuenta su perfil de expresión génica (Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001). El análisis global de la expresión permitió subclasificar a los tumores RE+ y RE- en las siguientes clases:

- I. Basales o *basal-like*: carece de expresión de RE α , y se caracteriza por la expresión de citoqueratinas 5 y 17, y laminina. Se lo conoce como triple negativo porque además de la ausencia de receptores hormonales, no expresa HER2/neu. Esta categoría es la de peor pronóstico clínico.

II. Aquellos positivos para HER2/neu, se caracterizan por la amplificación del gen para ERBB2, aunque no expresen receptores hormonales. Son tumores similares a los anteriores aunque de mejor pronóstico dado que son susceptibles a las terapias basadas en anticuerpos bloqueantes (como Trastuzumab) en combinación con quimioterapia.

III. Tipo normal o *normal breast-like*: es un subtipo caracterizado por la expresión de genes asociados a tejido epitelial y adiposo y baja expresión de genes característicos de células luminales.

IV. Tipos luminales: dentro de esta categoría se encuentran los tumores que expresan RE α :

a) Luminal A: son tumores que expresan RE α y de bajo grado, es decir con bajo índice de proliferación y bien diferenciados, con buen pronóstico

b) Luminal B: son tumores que pueden expresar menores niveles de RE α , con mayor índice proliferativo y menor grado de diferenciación (Sotiriou and Pusztai 2009).

V. En los últimos años se describió una nueva subclase conocida como *Claudin-low*, que incluye tumores triple negativos pero no expresan altos niveles de proteínas de adhesión célula-célula como por ejemplo E-caderina (Prat and Perou 2011).

Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y sus receptores.

Los FGFs son una familia de proteínas de unión a heparán sulfato, mediadoras de funciones de proliferación, migración y diferenciación en muchos tipos celulares durante el desarrollo embrionario (**Figura 1-2**). En el tejido adulto, poseen funciones homeostáticas, como por ejemplo la regeneración tisular. En vertebrados, se han identificado 22 genes de FGFs, que dan lugar a 23 factores, con pesos moleculares que varían entre los 17 y los 34 kDa (Ornitz and Itoh 2001).

Los miembros de esta familia guardan similitudes estructurales y poseen homología en su secuencia de residuos de amino ácidos que los agrupa en subfamilias, pero a pesar de ello cada uno cumple roles diferentes en el organismo. Además, miembros de distintas subfamilias pueden tener funciones similares, por ejemplo los factores FGF1 y 2 (a y b; o ácido y básico) son ambos mitógenos (Powers et al. 2000), y promueven la proliferación de células endoteliales. También estimulan la angiogénesis (Lavine et al. 2006) y la proliferación de fibroblastos, en las etapas tempranas del proceso

de regeneración tisular (Basilico and Moscatelli 1992). Otros miembros de la familia, como por ejemplo el FGF10 se expresan exclusivamente durante la embriogénesis y gobiernan el desarrollo de órganos parenquimales como el pulmón (Cardoso 2001) o el sistema gastrointestinal, mediante un patrón direccional de expresión, que pone de manifiesto la interacción entre epitelio y mesénquima (Zhang et al. 2006).

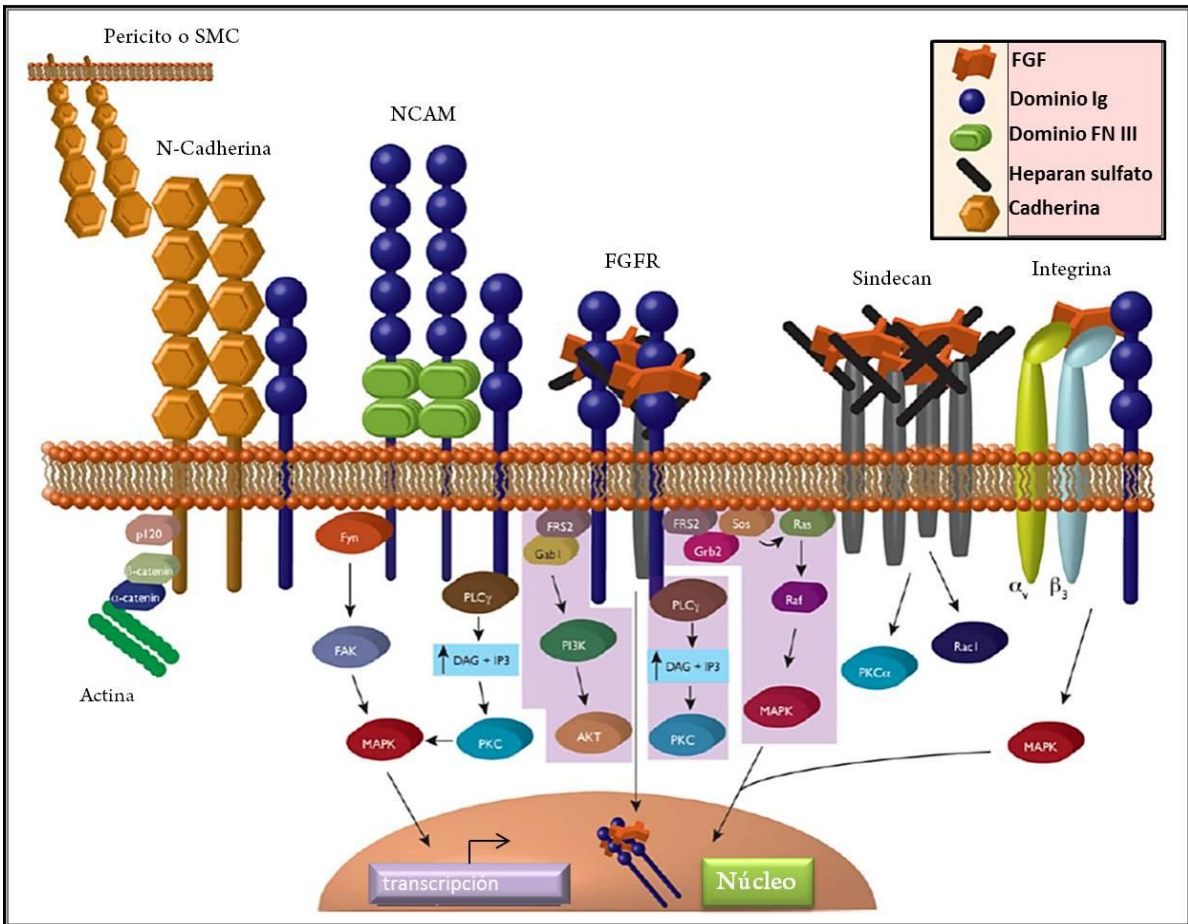


Figura 1-2. Esquema de los mecanismos y vías de señalización involucradas en los efectos mediados por FGF-FGFR. En el centro se puede observar la señalización canónica de la vía resaltado en lila. Hacia la izquierda, se muestran efectos mediados por ligandos no canónicos como la N-cadherina y el dominio fibronectina III (FN III) de NCAM. A la derecha, se observa la interacción de los receptores con sindecán e integrina. Adaptado de (Murakami et al. 2008).

Como ya se mencionó, la mayoría de las funciones asociadas a FGF están mediadas por sus receptores. Los FGFRs son una familia de cuatro receptores de tipo tirosina quinasa, que pertenecen a la superfamilia de los receptores de inmunoglobulina. Su estructura consta de un extremo amino-terminal extracelular, un dominio transmembrana helicoidal y un dominio carboxilo-terminal intracelular. Este

último es el que posee la actividad tirosina quinasa y contiene además residuos de tirosinas que pueden fosforilarse y cumplir roles regulatorios. La región extracelular contiene 3 dominios de inmunoglobulinas *like* (*Ig like*) denominados D1, D2 y D3 donde los dominios D2 y D3 participan en la unión a sus ligandos (Givol and Yayon 1992; Johnson and Williams 1993; McKeehan et al. 1998) (**Figura 1-3**). Los cuatro receptores guardan una alta homología de secuencia (entre 55 y 72 %) y poseen un considerable número de variantes por *splicing* alternativo (Powers et al. 2000). El *splicing* más importante, ocurre mayormente en los dominios *Ig-like* y en particular el D3 es el más relevante, ya que determina la especificidad de unión del receptor a los FGFs. Cada una de estas variantes se denominan IIIa, IIIb y IIIc, donde la primera se genera por la falta del exón 9 completo cuya función es desconocida, y las otras dos, mutuamente excluyentes, comprometiendo la mitad carboxi-terminal del exón 9 del dominio D3. La expresión de las isoformas IIIb y IIIc está regulada en distintos tejidos en los cuales comúnmente la variante IIIb se expresa en células epiteliales y la IIIc en células estromales uniendo cada una de ellas diferentes FGFs. Esto conduce a una estrecha y compleja intercomunicación entre el estroma y el epitelio en los tejidos. El FGFR-4 es el único receptor que no sufre el *splicing* alternativo para generar las isoformas IIIb o IIIc pero puede, junto con los demás FGFRs, dar otras isoformas que no involucran estos exones como lo son las isoformas C1, C2 y C3.

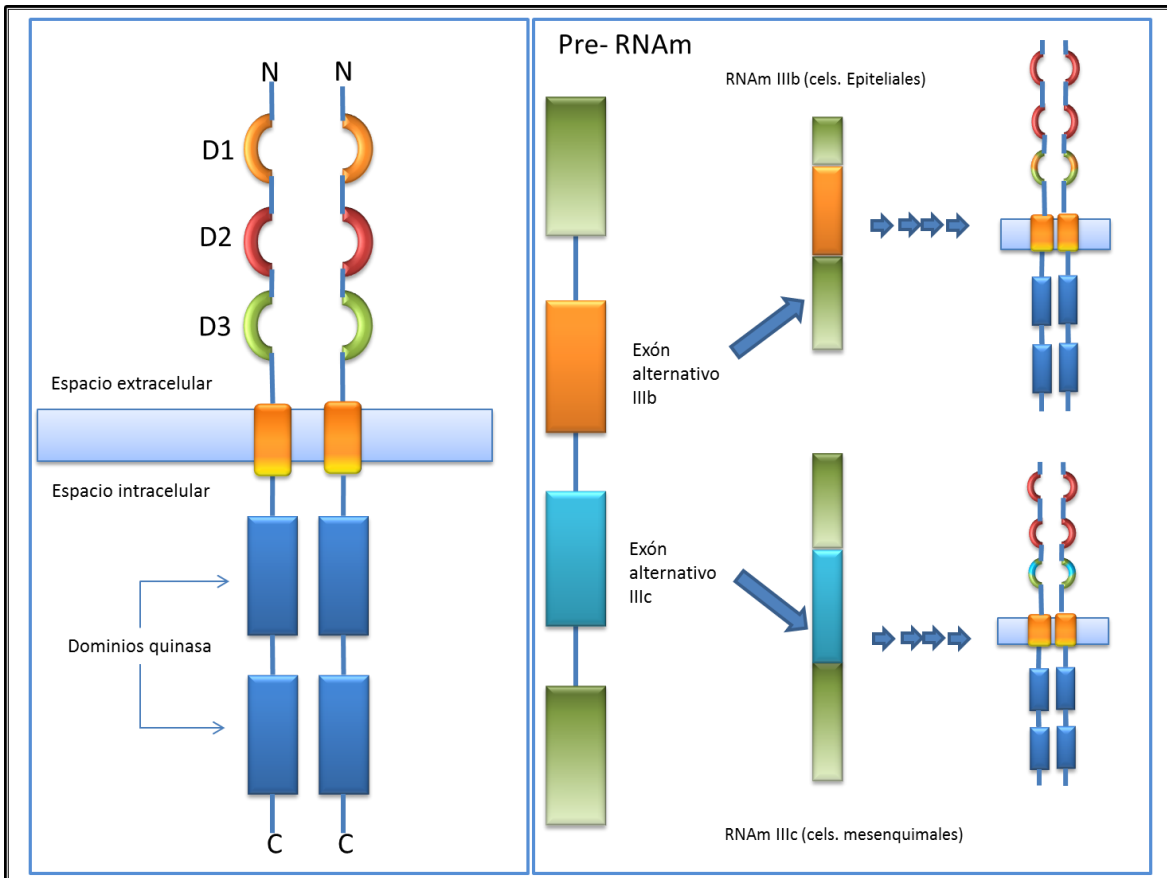


Figura 1-3. Esquema del FGFR-2, ejemplificando la estructura de estos receptores. (A) Dímero del FGFR-2 con su orientación transmembrana, mostrando sus tres dominios Ig-like (D1, 2 y 3), su región transmembrana (TM), y sus dominios con actividad de quinasa. (B) pre- mRNA y sus variantes de *splicing* alternativos, que dan lugar a las isoformas IIIb y IIIc, dependiendo los exones que se incluyan en el mensajero maduro. Adaptado de (Grosso et al. 2008).

La vía clásica o canónica (que se muestra en la **Figura 1-2**) de señalización de los receptores de FGF, implica la unión de FGF con heparán sulfato y su dimerización para formar un complejo de alta afinidad por los receptores de FGF. La unión a ligando provoca la dimerización del FGFR, el cual se autofosforila por su dominio tirosina quinasa en residuos de tirosina intracelulares. A su vez, fosforila al sustrato de FGFR-2 (*Fibroblast growth factor receptor substrate 2* o FRS2), activándolo. Una vez fosforilado, FRS2 recluta a la proteína unida a factor de crecimiento 2 (*Growth factor receptor-bound protein 2* o GRB2) y a SHP2 (una fosfatasa de tirosina). Así, se activa la vía de MAPK y PI3K (Katoh and Katoh 2006). Puede además reclutarse PLC γ por el dominio fosforilado del FGFR, lo cual lleva a la catálisis de PIP2 dando como productos DAG e IP3. DAG activa a la protein quinasa C (PKC) y su cascada

de señalización, mientras que IP3 induce la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico y activando también la vía de Ca²⁺-Calmodulina (Eswarakumar et al. 2005).

Por otro lado, existen vías no clásicas, que involucran receptores que no pertenecen a la familia de FGFRs, como por ejemplo los proteoglicanos de membrana de la familia del sindecan, en particular el sindecan-4 que puede señalizar mediando estímulos con FGF a través de la vía de PKC α (Murakami et al. 2008).

Debido a su papel en diversos procesos como diferenciación y proliferación, mutaciones que lleven a una activación constitutiva del receptor, pueden dar lugar al desarrollo de varias patologías incluidas cáncer de próstata, mama, etc. (Katoh and Nakagama 2014). En mama, cobra relevancia el receptor FGFR-2, ya que se han identificado múltiples cambios de un solo nucleótido (SNPs) que correlacionan con un cierto porcentaje de riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas (Easton et al. 2007; Hunter et al. 2007). Por otro lado, se ha demostrado que el producto de un *splicing* alternativo defectuoso del FGFR-2 en el que el exón 20 es incluido como exón final (a diferencia de la isoforma *Wild Type*, cuyo exón final es el 21) (Katoh and Katoh 2003) da origen a la sobre expresión de una isoforma que carece la región C-terminal de regulación y se vuelve constitutivamente activa, provocando la fosforilación de manera ligando-independiente a FRS2, y esto induce la cascada de señalización de MAPK, llevando a la proliferación celular desmedida (Moffa and Tannheimer 2004).

Los FGFRs también pueden sufrir mutaciones activantes, que los vuelven constitutivamente activos dando como consecuencia una señalización desregulada y una consecuente patología (Wesche et al. 2011) (**Figura 1-4**).

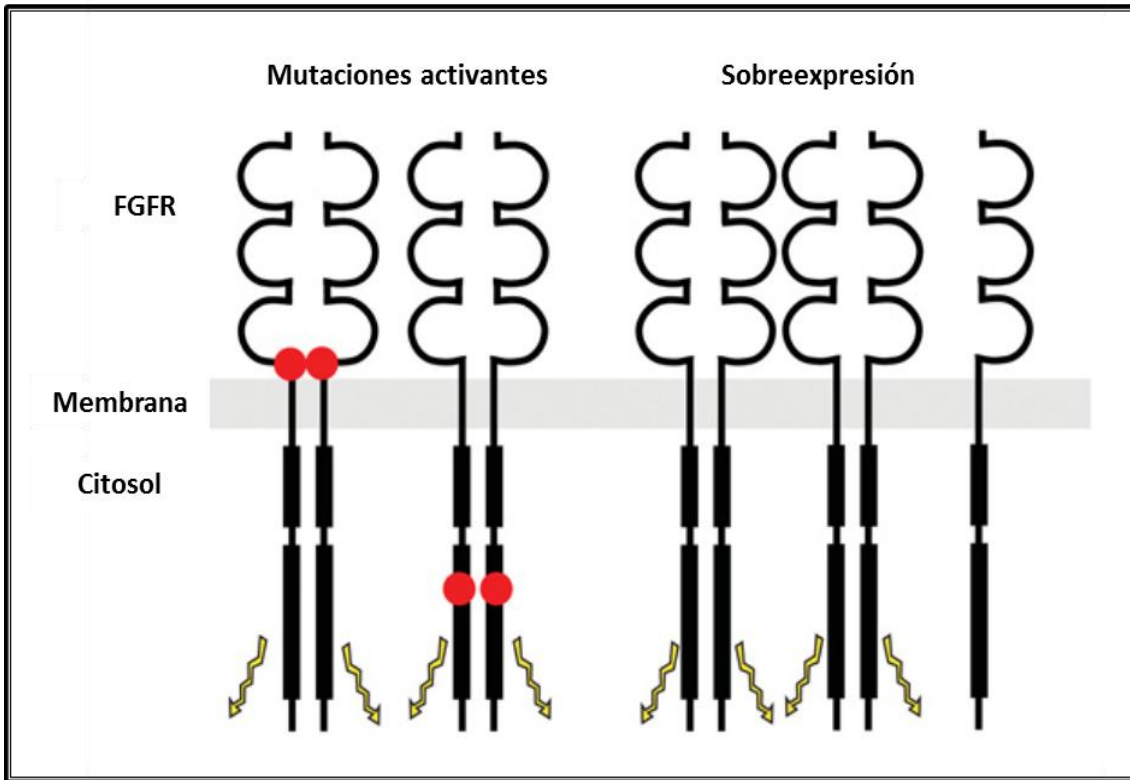


Figura 1-4. Mutaciones activantes de los FGFRs. La sobreactivación de los FGFRs puede deberse a distintos mecanismos; por ejemplo, sobre expresión del receptor o dimerización constitutiva como consecuencia de mutaciones puntuales, entre otros (Wesche et al. 2011).

Receptores de Hormonas esteroideas.

Los receptores de hormonas esteroideas fueron los primeros miembros identificados de la superfamilia de receptores nucleares, una clase de factores de transcripción cuya actividad está regulada por pequeñas moléculas liposolubles. A esta familia pertenecen los RE, RP, receptores de andrógenos (RA) y de glucocorticoides (RG) entre otros.

Estos receptores se pueden encontrar en la membrana celular, en el citoplasma o en el núcleo de las células. Habitualmente en el citoplasma se encuentran asociados a chaperonas de la familia de las *heat shock proteins*, proteínas de estrés térmico (Hsp70 y 90) en ausencia de ligando. Al interactuar el ligando con el receptor, éste sufre un cambio conformacional que permite la disociación de las chaperonas y la homo o heterodimerización del receptor a la vez que se expone una señal de localización nuclear (NLS) que permite la traslocación del complejo ligando-proteína al núcleo, modificando la expresión de genes con elementos de respuesta a hormonas (HRE) (Beato and Sánchez-Pacheco 1996).

Los receptores de hormonas comparten una estructura modular, formada por varios dominios funcionales independientes característicos de todos ellos:

- La región amino-terminal, es el dominio más variable dentro de esta familia de receptores. Interactúa con diferentes componentes o proteínas de la maquinaria transcripcional (transactivación).
- El dominio de unión a ADN (DBD: *DNA binding domain*) se encuentra muy conservado entre los miembros de esta familia, y está formado por dos motivos de “dedos de zinc” involucrados en la interacción proteína – ADN (en los denominados elementos de respuesta a hormonas) como en la interacción proteína- proteína.
- La región bisagra o *Hinge*, controla el movimiento del receptor hacia el núcleo, ya que en este dominio se encuentra la NLS.
- El dominio de unión a ligando (LBD: *Ligand binding domain*) se localiza en la región carboxi-terminal, y es el menos conservado entre los receptores. El LBD puede contener la NLS, aminoácidos de unión a chaperonas, y motivos involucrados en la dimerización.

Receptor de estrógenos.

Se han descrito en humanos dos isoformas para el RE, alfa (α) y beta (β) que difieren en peso molecular y están codificados por diferentes genes (Kuiper et al. 1997). La isoforma α tiene un peso molecular de 67 kDa y fue la primera descrita (Koike et al. 1987). Luego se describió la segunda isoforma, la β , con un peso molecular de 54 kDa (Kuiper et al. 1996) (**Fig. 1-5**).

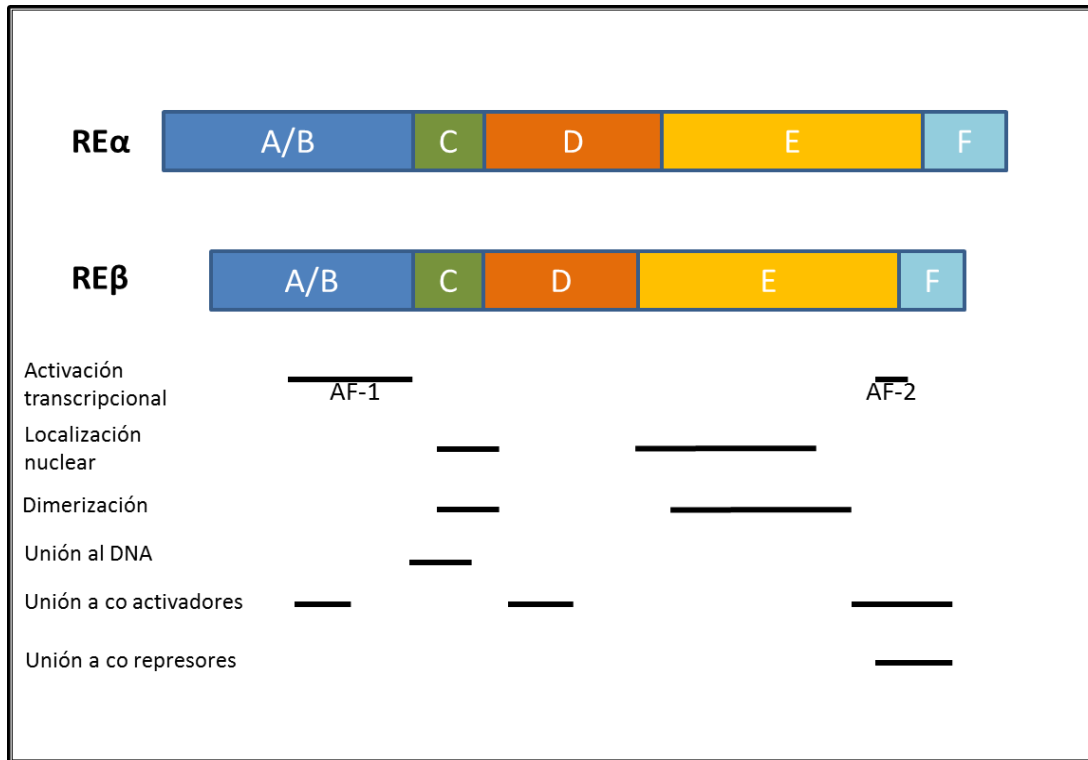


Figura 1-5. Isoformas α y β del RE. En este esquema se observan los dominios de ambas isoformas del RE. El dominio A/B es el que tiene la función transcripcional; el dominio C tiene tanto funciones de unión al ADN como de dimerización luego de la activación por ligando; el dominio D es el dominio bisagra; el E corresponde al dominio de unión al ligando y por último el F es el dominio que participa en el reconocimiento de ligandos agonistas y antagonistas (Klinge 2000).

Ambas isoformas comparten los siguientes dominios:

- El dominio A/B, amino terminal, es el más variable, siendo de menor tamaño en la isoforma de bajo peso molecular. Tiene funciones de transactivación: contiene la secuencia AF-1, que actúa como un activador de transcripción independiente de ligando, y que puede tener un efecto sinérgico con AF-2.
- El dominio C de unión al ADN.
- El dominio D o bisagra, que participa en la dimerización del receptor en respuesta a la unión del ligando.
- El dominio E, de unión a ligando, que además contiene la secuencia AF-2, que tiene función de activador de la transcripción dependiente de ligando.
- El dominio F, propio de estos receptores (ausente en el resto de los miembros de esta familia), cuya función no está bien determinada, pero se cree que está implicada en el reconocimiento de agonistas y antagonistas (Klinge 2000).

Los dos tipos de RE se expresan ampliamente en varios tejidos aunque presentan un patrón diferencial de expresión. El RE α es la isoforma que predomina en útero y mama, mientras que el RE β se encuentra mayormente expresado en próstata.

Mecanismo de acción de los estrógenos.

Los efectos mediados por estrógenos pueden ser genómicos o no genómicos. Entre los genómicos, se han descrito 3 vías principales de activación de la expresión génica mediada por el complejo RE α -ligando (**Figura 1-6**):

- **La vía clásica:** al unir su ligando, el RE α sufre un cambio conformacional (Jensen 1991), que permite su dimerización y traslocación al núcleo. Una vez en el núcleo de las células se une a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) con alta afinidad y modula la expresión de sus genes blanco. La interacción con la maquinaria basal de transcripción puede ser **directa**, o puede estar modulada por otros factores, coactivadores o correpresores (dependiendo de si el ligando es agonista o antagonista) y en este caso, la activación de la transcripción sería **indirecta**.

- **La vía no-clásica:** es dependiente de ligando pero la interacción entre el receptor y el ADN es mediada por otros factores de transcripción, tales como AP-1, SP-1, etc., y por lo tanto también se la denomina vía independiente de ERE. AP-1 es un complejo de transcripción compuesto por homodímeros c-fos, c-jun o heterodímeros c-fos/c-jun u otros de esta familia (Angel and Karin 1991). En este contexto, el complejo AP-1 es activado por interacción con RE, con el que interactúa a la vez que se une con su elemento de respuesta (*AP-1 response element, AP-1 RE*).
- **La vía ligando-independiente:** se han descrito mecanismos por los cuales se puede activar esta vía sin que el receptor interactúe con su ligando natural ni sus derivados, y por lo tanto se la denomina vía de activación ligando independiente del RE α (VanHook 2010).

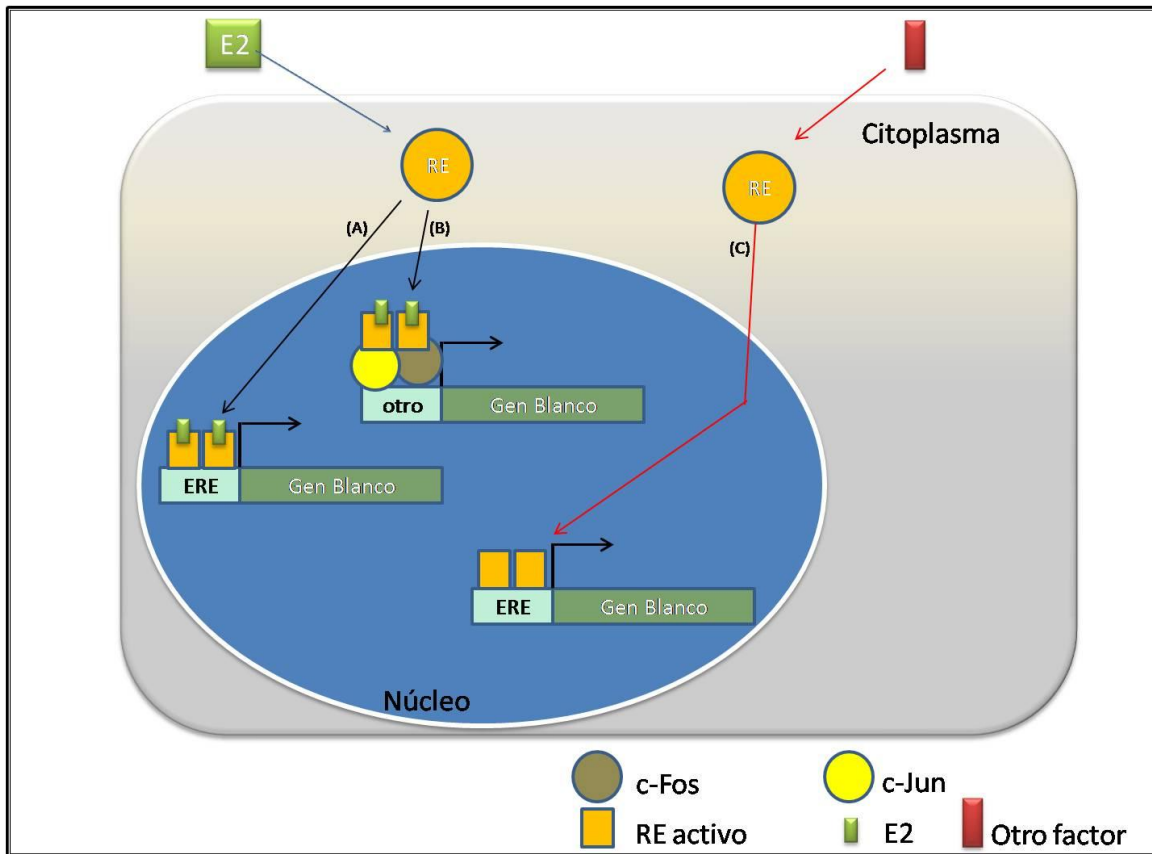


Figura 1-6. Tres vías principales de acción del RE. (A) Vía clásica de activación: al unirse al ligando, el RE dimeriza y trasloca al núcleo, donde se une a su elemento de respuesta en los genes blanco y promueve su transcripción. (B) vía no clásica de activación: la interacción con el ADN luego de la unión del ligando al RE es independiente de EREs, y está mediada por otros factores de transcripción y sus correspondientes elementos de respuesta. Existe una tercer vía de activación, independiente del ligando canónico (C).

Clasificación de terapias endocrinas.

Luego del diagnóstico, las decisiones terapéuticas se toman en base al estadio del tumor, y otros factores patológicos como la expresión de receptores hormonales. Como tratamiento de primera línea se utilizan procedimientos quirúrgicos. En segunda instancia, se pueden aplicar terapia de rayos, quimioterapia u hormono terapia.

Los tumores mamarios en su gran mayoría expresan $RE\alpha$ y es por ello que la terapia hormonal mayormente utilizada involucra moléculas que tienen como blanco a este receptor, utilizando dos estrategias: bloquear la síntesis de estradiol (E_2) o bloquear el receptor con antiestrógenos. El Tamoxifeno (un modulador selectivo del $RE\alpha$, o SERM por su sigla en inglés) es la droga con más aplicación en la actualidad y lo que hace es antagonizar la acción del $RE\alpha$, aunque posee efectos agonistas en otros órganos, como el útero. Por otro lado, existen los denominados moduladores selectivos negativos (SERD por su sigla en inglés) como el ICI 182.780 el cual posee los mismos efectos que el Tamoxifeno pero sin su agonismo parcial en otros tejidos. Su acción se ejerce a través de varios mecanismos como el bloqueo de la dimerización y traslocación al núcleo, con su consecuente degradación del receptor (Howell 2006).

Se sabe que el RP es regulado por E_2 (King et al. 2004), y en el laboratorio hemos demostrado el rol del RP en el crecimiento tumoral (Lanari et al. 2009). Por esto, es posible plantear una terapia dirigida al RP. Los moduladores del RP (PRM) se clasifican en tres grupos: tipo I, tipo II y tipo III. Los PRM tipo I se comportan sólo como antagonistas y previenen el pegado del complejo RP-antagonista al ADN (ej. Onapristona) (Afhüppe et al. 2009). Los PRM tipo II permiten el pegado del complejo RP-antagonista al ADN. Muestran potencial agonista cuando se estimula la vía de PKA *in vitro*. Muestran cierta actividad agonista de manera tejido y especie específica (ej. Mifepritona, MFP o RU-486). Los antagonistas tipo III inducen el pegado del RP al sitio PRE (elemento de respuesta a progestágenos) y tienen actividad puramente antagonista (ej. ZK 230211)(Afhüppe et al. 2010).

Resistencia a la terapia endocrina.

Inicialmente, los carcinomas mamarios responden en su mayoría a los tratamientos endocrinos. Sin embargo, luego de un período de respuesta, pueden desarrollar resistencia, un fenómeno que se denomina resistencia adquirida, aunque existen tumores que no responden desde el inicio del tratamiento y se los denomina resistentes constitutivos.

Este fenómeno ha sido estudiado intensamente en los últimos años, y se cree que es el resultado de un cambio en el fenotipo de las células tumorales, las cuales escapan a su dependencia hormonal. Actualmente, la terapia hormonal más utilizada es el tratamiento con el antiestrógeno Tamoxifeno, y si bien las terapias actuales funcionan desde el inicio en el 90% de los casos, eventualmente ocurre la progresión hacia tumores hormono-independientes (Gonzalez-Angulo et al. 2007; Dixon 2014). Es por esto que dilucidar los mecanismos por los cuales los tumores sobrepasan la dependencia hormonal es un área de mucho interés.

MicroRNAs (miRNAs).

Los microRNAs o miRNAs, son pequeñas moléculas pertenecientes a la familia del ARN no codificantes, los cuales ejercen su acción regulatoria post transcripcional a través de un mecanismo de interferencia.

Estas moléculas son codificadas por RNAs policistrónicos, y a estos mRNAs precursores se los denomina pri-miRNAs. Los pri-RNAs poseen estructuras secundarias en forma de *loop*, y cada *loop* corresponde a un miRNA. Este mensajero es procesado por una RNAsa llamada Drosha que formando un complejo con la proteína DGCR8, reconoce estas estructuras en horquilla y las cliva, para dar lugar a una segunda molécula intermediaria llamada pre-miRNA, de un tamaño aproximado de 70 nucleótidos y que aún mantiene la estructura secundaria. Estos intermediarios son exportados fuera del núcleo por medio de la exportina 5 y son reconocidos por una enzima llamada Dicer, la cual media el último paso de procesamiento para dar el heterodímero miRNA:miRNA* maduro, de unos 20-22 nucleótidos de tamaño. El miRNA es reconocido por el complejo RISC, al cual se incorpora y funciona como hebra guía para el reconocimiento de los RNAs mensajeros que tiene como blanco, los cuales serán reprimidos a nivel traduccional o se verá afectada su estabilidad, con su consecuente degradación (Gurtan and Sharp 2013). El mecanismo regulatorio por el cual tendrá su efecto suele estar determinado por el nivel de complementariedad de bases entre la secuencia del miRNA y el potencial gen blanco (**Figura 1-7**).

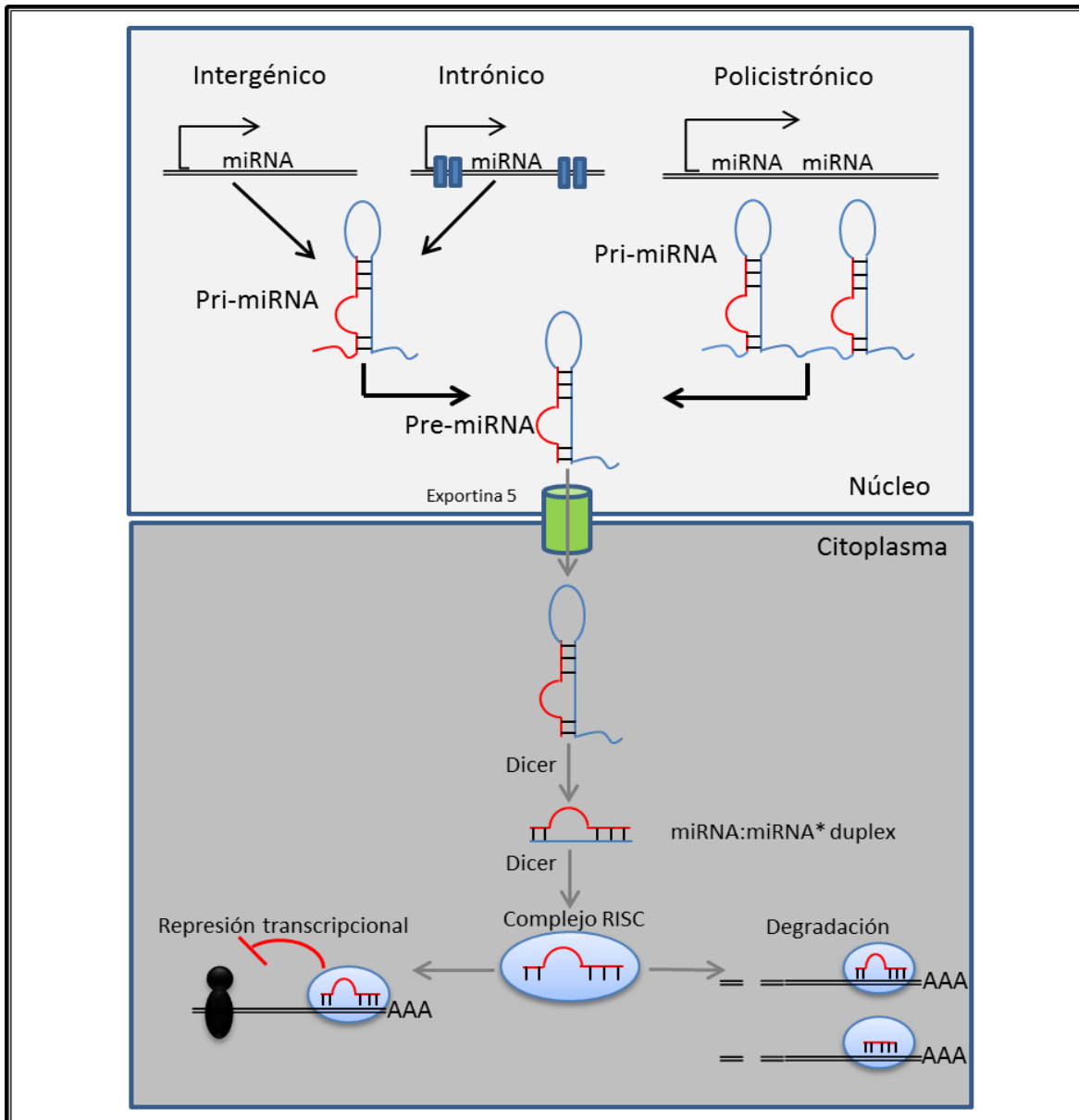


Figura 1-7. Biogénesis de miRNAs. Los miRNAs se transcriben como ARNs (tanto mono como policistrónicos) denominados pri-miRNAs los cuales poseen hebillas, cada una de las cuales representa un miRNA. Estas estructuras son reconocidas por la RNasa Drosha, la cual cliva al pri-miRNA en sucesivos pre-miRNAs, estos últimos son exportados al citoplasma para continuar su maduración. La enzima Dicer genera segmentos doble cadena que dan lugar a pequeños dúplex de 22 nucleótidos, que luego son reconocidos por el complejo RISC, el cual utiliza una de las hebras como guía para ejercer la función de represión de los miRNAs maduros (van Rooij 2011).

El reconocimiento de los mensajeros dentro de la red regulatoria de un miRNA se produce por complementariedad con secuencias ubicadas en la región 3' UTR de los mRNAs blancos. En animales, luego de la interacción con el blanco, si bien puede ocurrir la degradación del mensajero, mayormente se da la represión traduccional (Bartel 2009) lo cual eventualmente llevará a la represión transcripcional a través de mecanismos epigenéticos (Kusenda and Mraz 2006).

Dado su mecanismo de acción, los métodos de predicción de genes blanco se basan en la complementariedad de las bases que componen el miRNA, con alguna región del mensajero. Si bien la longitud promedio de estas moléculas es de 22 nucleótidos, se ha identificado lo que se conoce como región semilla, una región conservada de 7 nucleótidos hacia el extremo 5' del miRNA lo que determina la especificidad por su blanco (Friedman et al. 2009).

En los últimos años se han demostrado mecanismos regulatorios mediados por miRNAs en numerosos procesos, desde el metabolismo de lípidos (Wilfred et al. 2007), desarrollo de tejidos específicos (Lagos-Quintana et al. 2002) hasta su desregulación en patologías como cáncer de pulmón (Nasser et al. 2008), leucemias (Hershkovitz Rokah et al. 2012) y cáncer de mama (Jiang et al. 2010; Png et al. 2011), como así también en procesos asociados a estas patologías, como las metástasis (Valastyan and Weinberg 2010; Zhao et al. 2012) y la recurrencia de los tumores (Zhou et al. 2012).

Quizás el mayor interés que han generado estas moléculas es su potencial aplicación como marcadores en la clínica (Wang et al. 2010). Han sido identificadas en circulación y se las ha correlacionado tanto con el *clinical outcome* (Yan et al. 2008; Svoboda et al. 2012), como con la resistencia a las terapias químicas (Wang et al. 2012) y endócrinas (Rao et al. 2011).

miRNAs de interés en cáncer y en la regulación de la expresión de receptores hormonales.

El estudio de los miRNAs llevó a sugerir funciones de los mismos en las distintas etapas de progresión del cáncer. Por ejemplo, el miR-1 ha sido catalogado como supresor tumoral en cáncer de próstata dado que regula genes relacionados con proliferación y se ha observado que se encuentra sub expresado en tumores primarios de cáncer de próstata (Hudson et al. 2011).

Además de estar implicados en distintos procesos biológicos, muchos miRNAs están relacionados con los receptores hormonales. Por ejemplo, el tratamiento con progesterona en líneas celulares puede inducir la expresión del miR-29 (Cochrane et al. 2012), el cual tiene como blanco genes que también son transcritos por el RP, dando como resultado una regulación muy fina a nivel tanto transcripcional como traduccional de genes inducidos por hormonas. El RP también puede ser susceptible a la regulación por miRNAs, por ejemplo el miR-513a-5p que lo tiene como blanco (Cochrane et al. 2012).

La sobre expresión de miRNAs también puede tener efectos proliferativos sobre células RE+ (Di Leva et al. 2010) y este receptor también puede ser regulado por ejemplo por el miR-206 entre otros (Guttilla et al. 2012).

El papel del mir-31 en la regulación del cáncer de mama es controvertido. Ha sido postulado como regulador negativo de la metástasis, dado que tiene como blancos a muchos genes implicados en este proceso (Augoff et al. 2012). En estudios realizados por el grupo del Dr. Weinberg se logró determinar que el miR-31 al ser inducido puede causar la regresión de metástasis pulmonares de cáncer de mama pero no en tumores primarios, proponiendo la sobre expresión aguda de esta molécula como terapia anti metastásica (Valastyan et al. 2011). En otro trabajo, demostraron que al inhibir la expresión de miR-31 en células que no tienen capacidad metastásica, éstas se volvían más agresivas al liberar la represión de una cohorte de genes implicados en invasión y metástasis, en particular los genes de integrina $\alpha 5$, Radixin y RhoA (Valastyan et al. 2009b; Valastyan et al. 2009a). Todas estas evidencias indican que el miR-31 podría ser un factor clave implicado en el proceso de invasión, con un evidente rol como supresor metastásico. Sin embargo, este último trabajo publicado en la revista Cell fue retractado en Abril 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25879117>). El trabajo de Zheng y colaboradores, muestra una correlación positiva entre la expresión de este miRNA y metástasis, en cáncer cervical (Zheng et al. 2015) y Meng y colaboradores demostraron una asociación positiva entre la expresión de

miR-31 y la presencia de metástasis en nódulos linfáticos de pacientes con adenocarcinomas en pulmón (Meng et al. 2013). En cáncer de mama, un estudio realizado por Yan y colaboradores encontró una menor expresión de miR-31 en tumores de mama al ser comparados con mama normal, indicando que este miR no se asociaría con la progresión tumoral (Yan et al. 2008). Sin embargo, otros estudios asocian la expresión de mir-31 con quimiorresistencia y progresión tumoral (Lu et al. 2012; Lv et al. 2014). Por lo tanto, resulta evidente que el miR-31 podría estar regulado en procesos asociados al cáncer de mama, aunque su rol en la progresión tumoral sigue siendo objeto de estudio.

Por otra parte, es común encontrar el miR-155 amplificado en numerosos cánceres, incluyendo el de mama, y por esto se lo ha clasificado como un OncomiR, es decir un miRNA con funciones de oncogén, por regular negativamente supresores tumorales, como *suppressor of cytokine signaling 1* (socs1) (Jiang et al. 2010), o la proteína supresora tumoral TP53IN1 en células RE+ como las MCF-7 (Zhang et al. 2013). La expresión ectópica de miR-155 induce la supervivencia y la evasión de la apoptosis de las células tumorales, haciendo estas células resistentes a la quimioterapia (Kong et al. 2010).

Si bien las funciones de algunos miRNAs parecen estar dilucidadas, quizás uno de los mayores potenciales para aplicación es el uso de estas moléculas como marcadores séricos. El miR-222 por ejemplo, se encuentra elevado en suero de pacientes con cáncer colorrectal (Ma et al. 2012a). Este mismo miR, en cáncer de mama, se encuentra asociado a la resistencia a tratamientos con SERDs como el Fulvestrant. En un trabajo publicado por Rao y colaboradores, se observó que células con resistencia adquirida a anti estrógenos, había una sobre expresión del miR-222, y su sobre expresión logra desregular vías de señalización asociadas con resistencia como la vía de β catenina (Rao et al. 2011).

Otros miRNAs tienen funciones de supresores tumorales. Por ejemplo, el miR-335 aumenta su expresión en tumores con niveles alterados de Rb1, y cooperan con la vía de p53 frente a daño al DNA (Scarola et al. 2010). En cáncer de mama, es frecuente encontrar silenciado por diversos mecanismos epigenético, confirmando su rol como supresor tumoral (Png et al. 2011). El miR-16, regulado por progestágenos y factores de crecimiento en cáncer de mama, es considerado un supresor tumoral dado que tiene como blanco a la ciclina E (Rivas et al. 2012).

Estos miRNAs son unos pocos ejemplos de las diversas funciones que pueden tener y remarcan el interés por su estudio y sus potenciales aplicaciones, no sólo como marcadores sino como blancos terapéuticos.

Hipótesis

Como ya hemos mencionado, existen mecanismos de activación ligando independiente que involucran a los receptores de hormonas esteroides. En trabajos anteriores del laboratorio se demostró que el FGF2 es capaz de activar al RP y así estimular el crecimiento tumoral hormono independiente (Cerliani et al. 2011). En concordancia, se demostró que el estroma tumoral de los tumores HI expresaban mayores niveles de FGF2 que los tumores HD indicando que el estroma participa en la adquisición de la hormono-independencia (Giulianelli et al. 2008). Teniendo en cuenta que además hemos descrito que la interacción entre el RE α y el RP es imprescindible para gatillar la expresión de genes claves de la proliferación celular como *Ciclina D1* y *c-MYC* inducidos por progestágenos (Giulianelli et al. 2012), postulamos que el RE α también participa junto con el RP en el crecimiento tumoral mediado por FGF2 y que este mecanismo participa en la adquisición de la hormono-independencia/resistencia endocrina.

Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, nos propusimos examinar el papel del RE α en el crecimiento tumoral mediado por FGF2 en células de cáncer de mama humano y en carcinomas mamarios murinos con distinto grado de dependencia hormonal.

Objetivos específicos:



Estudiar si FGF2 involucra a la vía del RE α en la estimulación de la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama humanas con expresión de receptores hormonales.

- a) Evaluar si la proliferación celular inducida por FGF2 es inhibida con antiestrógenos o por el bloqueo en la expresión del RE α .
- b) Estudiar la activación del RE α por FGF2 y las vías de señalización involucradas.
- c) Evaluar la expresión de los genes endógenos sensibles a RE α como *c-MYC* y *pS2*.
- d) Evaluar la interacción del RE α , activado por FGF2, con sus elementos de respuesta sobre el promotor de *pS2* mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).
- e) Generar una línea celular a partir de células MCF-7 con sobre expresión de una variante del FGFR-2 con una mutación puntual que provoca la dimerización constitutiva y consecuentemente su activación (R2CA) y evaluar la activación de RE α y su capacidad de sobrepasar el requerimiento de estrógenos para crecer *in vivo*.



En el modelo experimental de carcinomas mamarios murinos con distinto grado de dependencia hormonal, evaluar el grado de activación del RE α y su expresión/actividad en tumores tratados con antiestrógenos/inhibidores de FGFR.



Analizar un *array* de expresión de miRNAs a partir tumores en distintos estadios de transición hacia la hormono independencia y resistencia endócrina buscando candidatos que puedan explicar mecanismos que participen de la activación de FGF2-FGFR.

PARTE II

Materiales y métodos

Líneas celulares:

Las líneas MCF-7 y T47D fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y se las mantuvo en cultivo con medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% V/V. En el caso de las células MCF-7, se suplementó el medio con insulina recombinante humana (0,01 mg/ml). Se utilizaron repiques no mayores a 20 desde que las células llegaron al laboratorio.

Obtención de líneas celulares transfectadas establemente:

Se realizó una curva de supervivencia para el antibiótico neomicina y se identificó la dosis letal 50 para cada línea celular. Se transfectaron las células, utilizando el reactivo comercial Lipofectamina 2000 siguiendo el protocolo provisto por el fabricante (Invitrogen), con un vector pcDNA3 vacío, o con uno llevando el inserto correspondiente al gen de FGFR2 con una mutación puntual que genera la dimerización del receptor con la consecuente activación constitutiva (Robertson et al. 1998). Se seleccionaron las células con una concentración igual a la dosis letal 50 y una vez seleccionadas se las mantuvo con el 50% de esta concentración de antibiótico de selección. Se ensayó periódicamente un análisis de la sobre expresión del gen de interés para corroborar la presencia del mismo.

En el caso de los ensayos de silenciamiento de genes, se sembraron las células en placas de 12 o 96 pocillos con diferentes *siRNAs* para el RE α humano (ESR1 8 y ESR1 10, QIAGEN), utilizando como control un *siRNA* no específico (SI03650318, QIAGEN). Para estos experimentos se utilizó HiPerFect *transfection reagent* (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Animales

Se utilizaron ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c de dos meses de edad, provenientes del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, ratones *nu/nu* (*background Swiss*) provenientes de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de La Plata y ratones NSG (Los parentales fueron obtenidos de la empresa Jackson Labs (EEUU); la colonia fue desarrollada por integrantes del

laboratorio), mantenidos en racks ventilados con agua y comida *ad libitum*, con un cronograma de doce horas de luz y doce de oscuridad. Todos los procedimientos se realizaron según la guía del NIH para uso de Animales de Laboratorio (Gonder and Laber 2007).

Tumores utilizados:

Tumor C4-HD

El tumor C4-HD fue así llamado porque provenía del grupo C y la caja 4 del experimento donde se reportó inicialmente que el MPA originaba carcinomas mamarios en ratones de la cepa BALB/c, o sea en un principio se llamó C4 (Lanari et al. 1986). Se transplantó a ratones tratados con MPA, creció muy lentamente y luego se mantuvo por pasajes seriados como se explicó anteriormente. Luego de varios pasajes *in vivo* este tumor comenzó a crecer en los animales no tratados con MPA, se lo llamó C4-HI y se descongeló un pasaje primitivo al que se llamó C4-HD. Cuando se comenzaron los cultivos primarios de C4-HD, en el año 1990 se re inocularon las células adheridas al plástico para comprobar que se trataba de células representativas del comportamiento HD y para distinguir este tumor del anterior se lo llamó CC4-HD (la primer C viene de cultivo). Una vez cada dos años aproximadamente se vuelve a descongelar un pasaje primitivo. Presentan ambos un cariotipo cuasi-diploide con 4 marcadores característicos bien estudiados, expresan altos niveles de RE α y RP (Dran et al. 1995), tienen una mutación puntual en p53 (Fabris et al. 2005) y expresan ERRB2 (Balañá et al. 2001). Las células epiteliales purificadas de cultivos primarios son estimuladas con progesterona (Pg) o MPA, e inhibidas con 17 β -estradiol (E₂) o con anti-progestágenos (Dran et al. 1995). FGFs, HRG o TNF α estimulan su proliferación (Lamb et al. 1999; Balañá et al. 2001), mientras que el IGF 1 e IGF 2 sólo producen una potenciación de la estimulación inducida por MPA (Elizalde et al. 1998). TGF β 1, 2 y 3 ejercen efectos inhibitorios (Elizalde et al. 1990) y EGF no estimula la proliferación celular (Lanari et al. 1989).

Tumor C4-HI

Presenta un patrón de crecimiento HI e inhibe su crecimiento con el tratamiento con antiprogestágenos. Se mantiene por pasajes singenéticos en hembras vírgenes BALB/c en ausencia de MPA. Se originó a partir del tumor C4-HD. Los tumores C4-HI también expresan altos niveles de RE α y RP, pero adquirieron un cariotipo poliploide. Curiosamente, *in vitro*, tiene los mismos requerimientos para proliferar que las células C4-HD (Giulianelli et al. 2008).

Tumor C4-HIR

Mantiene un patrón de crecimiento HI. Estos tumores fueron desarrollados por la Dra. Victoria Wargon y se obtuvieron por presión de selección sobre un tumor C4-HI tratados con MFP (Wargon et al. 2009). Se mantienen por pasajes singenéticos en ratones BALB/c con el aporte del anti progestágeno en forma de pellet subcutáneo (sc).

Trasplantes tumorales:

El trasplante tumoral se realiza de rutina utilizando un trócar en el que se coloca un trozo de tumor de 2-3 mm³ en forma sc en el flanco inguinal derecho del animal. En el caso de los tumores HD, se inyecta también en forma sc 0.1 ml de MPA depot (20 mg: Medrosterona, Gador, Argentina) en el flanco inguinal izquierdo. Como control de hormono dependencia se mantiene un animal por pasaje sin tratar con el progestágeno. De la misma manera se realizan los pasajes de los tumores HI, con la diferencia que no se inyecta el depot de MPA. Los tumores C4-HIR son de crecimiento hormono independiente y se los mantiene de rutina con el aporte de antiprogestágenos (MFP en forma de pellet sc) para mantener la presión de selección.

Ensayos in vivo

Los ensayos *in vivo* se realizaron en el Bioterio del IByME. Los animales se mantuvieron siguiendo las normas mencionadas anteriormente, con un régimen lumínico de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, con acceso a comida y agua *ad libitum*. Las células fueron crecidas en medio DMEM:F12 suplementado con 10% SFB. En el caso de las células transfectadas se las mantuvo con antibiótico hasta el momento de inocularlas.

Se inocularon 5×10^6 células por ratón, resuspendidas en 75-100 μ l de Matrigel de alta densidad (BD Matrigel Matrix High Concentration) en forma sc en el flanco derecho del animal. En el caso de los ensayos realizados con células MCF-7 *wild type*, a los ratones se les implantó un *pellet* de E_2 (0,5 mg por *pellet*, reemplazado cada 30 días) una semana antes de ser inoculados con las células. Se midió el crecimiento con calibre Vernier.

Obtención de extractos proteicos totales:

Se utilizaron al menos dos métodos de extracción. Para extractos totales se utilizó *buffer* RIPA (ver anexo de buffers y soluciones) suplementado con inhibidores de proteasas. Brevemente, se lavaron las células con PBS 1X durante 5 minutos en agitación, luego se descartó y se agregó volumen suficiente de buffer para cubrir la superficie de la placa. Se incubó en agitación durante 10 minutos en hielo. Se rastrilló la placa y se recolectó el sobrenadante en un tubo eppendorf. Se incubó el volumen obtenido en hielo durante 10 minutos. En los casos en que fue necesario, se aplicaron 3 rondas de 15 segundos de sonicado. Posteriormente se centrifugó la muestra 15-20 minutos a 10000-13000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio, el cual se alicuotó y se guardó a -80°C hasta su utilización. Alternativamente, para curvas de estimulación a tiempos cortos, se realizó la extracción utilizando el *buffer* desnaturante que se iba a utilizar para sembrar en geles de poliacrilamida, diluido a su concentración de trabajo con PBS, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recolectó el sobrenadante, se incubó en baño termostático a 100°C durante 15 minutos y se centrifugó 15-20 minutos a 10000-13000 rpm, a 4°C. Se guardaron las muestras a -80°C hasta su utilización. La concentración total de proteína fue cuantificada utilizando el método de Lowry (Lowry et al. 1951), para el caso de los extractos con *buffer* RIPA.

Western blot:

Se sembraron 50-100 μg de proteínas totales por calle y se resolvieron en geles de poliacrilamida (8-12%, dependiendo de la proteína evaluada), y se corrió un marcador de peso molecular en cada gel ensayado. Se diluyó el volumen adecuado de muestra con cantidad suficiente de *buffer* desnaturalizante (*cracking buffer* 4X) para luego calentar en baño térmico a 100°C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó durante 75-90 minutos a 40 mA constantes o hasta obtener la resolución adecuada tomando como referencia las bandas coloreadas del marcador de peso molecular. Las proteínas fueron transferidas durante una hora a 100V a membranas de nitrocelulosa (Hybond-c, Amersham, UK). Se bloquearon las membranas una hora a temperatura ambiente en agitación con 5% leche descremada en TBS-Tween. Se incubó la membrana toda la noche a 4°C usando la dilución apropiada de anticuerpo.

Para revelar las proteínas se utilizó el reactivo comercial luminol (Sigma). Las bandas fueron capturadas por exposición a placas radiográficas (CL-XPosure film, Thermo Scientific) durante 10 segundos a 10 minutos, en relación a la intensidad de quimioluminiscencia observada. Se cuantificaron las bandas utilizando el *freeware* ImageJ.

Inmunohistoquímica:

Las muestras de los tumores de los ensayos *in vivo* fueron fijadas en formol 4% en PBS 1X y posteriormente incluidas en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 a 10 μm los cuales fueron adheridos a vidrios portaobjetos. El protocolo utilizado para la técnica fue el siguiente: en primera instancia, se desparafinaron los cortes con xilol para luego rehidratarlos con concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100%, 95%, 80% y 70%) durante 10 minutos por cada dilución. Luego de tres lavados de 10 minutos con agua destilada, se realizó la recaptura antigénica con buffer citrato/ácido cítrico, durante 1 hora a 55°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se lavó dos veces con agua destilada. Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con una dilución de 10% peróxido de hidrógeno en agua, durante 10 minutos, para luego lavar 10 minutos con agua destilada. Después de dos lavados adicionales con PBS 1X, se incubó con solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, y luego se incubó el anticuerpo toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados con PBS de 10 minutos, y

luego se incubó el anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 1 hora. Para revelar, se utilizó el complejo ABC, preparado según las indicaciones del fabricante (Vector Labs). Los vidrios se lavaron varias veces con PBS y se revelaron bajo el microscopio con un *kit* de DAKO (K3468), basado en la reacción con 3-3' diaminobenzidina y H₂O₂. La reacción se detuvo con H₂O destilada y los núcleos se tiñeron utilizando hematoxilina durante 20 segundos, y lavando con agua posteriormente, durante 5 minutos. Se deshidrataron los cortes con etanol 96% durante 10 minutos, etanol 100% durante 10 minutos y xilol durante 10 minutos. Los vidrios fueron montados en medio sintético (DPX, Fluka). Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario en algunos cortes.

Inmunofluorescencia:

Se sembraron células (tanto líneas celulares como cultivos primarios) en cubreobjetos circulares de 16 milímetros de diámetro. Las células fueron fijadas con etanol 70% v/v a -20°C durante 1 hora. Se lavó el fijador con PBS 1X tres veces durante 10 minutos, y luego se bloqueó con una solución de SFB 10% en PBS, durante una hora. Los anticuerpos primarios fueron incubados toda la noche a 4°C en una cámara húmeda, utilizando una dilución 1:50-1:100 de anticuerpo en PBS 1X. Posteriormente se lavó el anticuerpo primario 3 veces con PBS 1X, y se incubó el anticuerpo secundario diluido en PBS (1:100), acoplado a fluoresceína o a *texas red*, según el caso. Para las inmunomarcaciones, luego de lavar 3 veces con PBS el anticuerpo primario, se utilizó yoduro de propidio para marcar el núcleo (solución 1µg/ml). Los cubreobjetos se montaron con VectaShield (Vector) en portaobjetos sin carga, y sellados con esmalte.

Array de miRNAs:

Se utilizó el *array Rodent microRNA array v2.0* (Taqman) que incluye 375 miRNAs conocidos de ratón y 6 controles internos, tomados de la versión 10 de la base de datos miRBase. Se utilizó el procedimiento descrito por el fabricante. Brevemente, se realizaron extractos de ARN total de muestras de tumores de las diferentes variantes de la familia C4, con el *kit* mirVana Paris, mencionado

más adelante. Se sintetizó ADNc a partir de estos extractos, utilizando el High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems) y se procedió a cargar este ADNc en el cartucho A del *array*. Se midió la amplificación de los miRNAs en el equipo 7900HT system de Applied Biosystems, y los resultados se procesaron con el *software* SDS, de la misma compañía.

Medición de miRNAs:

Se extrajeron ARNs pequeños totales de las muestras de tumor o de cultivos celulares, utilizando el *kit* mirVana PARIS (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante. La cuantificación de la expresión de los miRNAs de interés fue realizada por PCR en tiempo real, utilizando el método descrito por Chen y colaboradores (Chen et al. 2005). Brevemente en una primera instancia de retro transcripción, se utilizó un *primer* específico para los miRNAs de interés, que incluía una secuencia (*loop*) conocida y universal. Este *primer loop* contiene en su extremo 3' cuatro bases complementarias al extremo 3' del miR de interés, y a través del apareamiento de esta secuencia es que se consigue la elongación del miRNA maduro. El producto final de la reacción de síntesis de DNA es un oligonucleótido de alrededor de 60 pares de bases que sirve como templado para la amplificación por PCR. La PCR en tiempo real se realizó utilizando un *primer forward* con la misma secuencia del miRNA (*primer* específico) y un *primer reverse* con secuencia complementaria a una región del *loop* (*primer* universal). Se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para la cuantificación relativa de las muestras amplificadas. Todos los primers utilizados se describen en el apéndice número 3.

Medición de genes por PCR en tiempo real:

Se extrajo ARN total, utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Cantidades equivalentes de RNA total se utilizaron para realizar la retro transcripción usando el siguiente protocolo:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	16	30:00

2	42	30:00
3	85	05:00
Se mantiene a 8 °C hasta guardar las muestras		

Se tomaron 2 µl del producto de retro transcripción y se corrió la PCR en tiempo real, utilizando el reactivo Sybr Mix (invitrogen), según especificaciones del fabricante. Se utilizó el siguiente protocolo para todas las corridas de PCR que se presentan en esta tesis:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	50	2:00
2	95	10:00
3	95	00:15
4	57	00:15
5	60	01:00
40 ciclos totales desde paso 3		
Luego curva de disociación (de 65 a 95°C en incrementos de 0.5)		

Se utilizó el equipo CFX96 modelo C1000 Touch de Bio Rad para todas las corridas. Al igual que para el análisis de miRNAs, se analizaron los resultados por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para la cuantificación relativa de las muestras amplificadas (Livak and Schmittgen 2001). Como en la técnica anterior, todos los *primers* utilizados se encuentran en el anexo 3.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP):

Para los ensayos de ChIP se utilizó el *kit HighCell# Chip kit* (Diagenode) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se partió de dos placas de 150 mm² con células en un 80% de confluencia, las cuales fueron ayunadas durante 24 horas, para luego realizar los tratamientos correspondientes. Al finalizar los tratamientos, se agregó 810 µl de formaldehído al volumen de tratamiento (15 ml) para obtener una concentración final de 1% v/v y se incubó durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Para detener la reacción de entrecruzamiento se agregó 1.125 ml de glicina 1.25 M y se incubó durante 5 minutos. A partir de este paso, se continuó la extracción de ADN en hielo. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las placas dos veces con PBS 1X frío (4°C). Se agregó 1 ml de *buffer* L1 a cada placa y se incubó durante 10 minutos, luego de los cuales se levantaron las células utilizando un rastrillo, y se recolectó el material en un tubo *ependorf*. Se centrifugó 5 minutos a 1600 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Al *pellet* obtenido se le agregaron 200 µl de *buffer* de disrupción (*Shearing buffer*) con inhibidores de proteasas. Se le aplicaron 30 minutos de sonicación en rondas de 30 segundos ON/30 segundos OFF a la máxima potencia (Bioruptor UCD-200 X, Diagenode). Al mismo tiempo que se procesaba la muestra, se comenzó con la incubación del anticuerpo con las *beads* magnéticas a ser utilizadas en pasos posteriores: se las lavó con *buffer* C1 dos veces y se las incubó al menos 2 horas con el anticuerpo correspondiente en una concentración de 35-40 µg/ml. Al material sonificado se lo llevó a volumen con *buffer* C1 en relación al número de reacciones de inmunoprecipitación a realizar (300 µl por tubo). Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y del sobrenadante se tomaron 10 µl como control sin inmunoprecipitar y el resto se dividió en el número de tubos adecuado. Este material se incubó con las *beads* acopladas a los anticuerpos durante toda la noche a 4°C en agitación.

Luego de la incubación, se concentró el inmunoprecipitado utilizando un imán y luego se lavó con el *buffer* C1. Al *pellet* obtenido se lo incubó con 100 µl de *buffer* DIB con proteinasa K, y se prepararon los tubos con el input, combinando 9.5 µl de muestra con 90.5 µl de DIB con proteinasa K. Se incubó durante 40 minutos a 55°C en un baño térmico y luego a 100°C durante 10 minutos. Se concentraron las *beads* con el imán, y el sobrenadante se recuperó, siendo éste el ADN purificado e inmunoprecipitado. Se lo guardó a -20°C hasta su uso.

Ensayos de incorporación de timidina tritiada:

Se cultivaron las líneas celulares en placas de 96 pocillos durante 24 horas con medio 10% SFB. Luego se arrestaron con medio 1% SFB depletado en hormonas esteroides (SFBch) durante 24 horas, después de las cuales se trataron las células con medio 1% SFBch con los respectivos factores y/o hormonas durante 48 horas, renovando los tratamientos cada 24 horas. Durante las últimas 18-24 horas de incubación, se aplicó un pulso de 0.4 μCi de ^3H -timidina (NEN, actividad específica 20 Ci/mmol) en cada *well*. Todos los tratamientos se realizaron por octuplicado y cada ensayo fue realizado al menos 3 veces. Para su cuantificación, los cultivos se levantaron con tripsina durante 15 minutos y cosechados en un cosechador de células, la radiactividad incorporada se midió en un contador de centelleo beta durante un minuto.

Ensayos de proliferación por conteo celular:

Se sembraron 4×10^4 células por pocillo en una placa de 12 hoyos en 10% SFB. Luego se las arrestó durante 24 horas con medio suplementado con 2% SFBch y se las trató durante 5 días con las hormonas o factores a las concentraciones indicadas en la sección de resultados. Para el conteo, se levantaron las células con tripsina 0.25% con 0.2% de EDTA, y se estimó el número de células utilizando una cámara de *Neubauer*.

Análisis estadístico:

Tanto para los ensayos de recuento celular y proliferación como para WB se utilizó un ANOVA de una vía para comparar múltiples grupos y luego se compararon distintos grupos entre sí utilizando el *test* de *Tukey*. En los casos en que solo existían dos grupos, se utilizó la prueba “t” de *Student* para evaluar diferencias significativas entre medias. Para las curvas de crecimiento se analizó si las pendientes eran significativamente diferentes. En todos los casos se utilizó el *GraphPad Prism* (versión 4.0 para Windows, GraphPad Software Inc.). El nivel de significancia estadística se expresó con

asteriscos siendo *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado a menos que se especifique lo contrario.

PARTE III

Resultados

CAPÍTULO I

FGF2 y RE α

1.1- La estimulación de la proliferación celular con FGF2 es inhibida por el tratamiento con un antiestrógeno o por silenciamiento del RE α .

En trabajos previos del laboratorio demostramos que el FGF2 estimula la proliferación celular de células del modelo de cáncer de mama murino inducido por MPA, y en células de cáncer de mama humano T47D (Cerliani et al. 2011). Con el fin de investigar el rol del RE α en la proliferación celular inducida por FGF2, utilizamos células humanas T47D y MCF-7 en presencia del antiestrógeno puro ICI 182.780 (ICI). En primera instancia se evaluó la proliferación por incorporación de timidina tritiada. Como se puede observar en la **Figura 3-1 A y B**, el FGF2 estimuló la proliferación de células MCF-7 y T47D. Se comparó el efecto del FGF2 con el inducido por E₂ y en el caso de la línea celular MCF-7 el efecto estimulador del FGF2 fue incluso mayor que el inducido por el E₂ ($p < 0.001$). El tratamiento con el ICI, el cual antagoniza con el ligando canónico y por ende impide su función, revirtió la estimulación inducida por E₂ como era esperable. Por otra parte, el antagonista estrogénico también revirtió la estimulación inducida por FGF2 de manera dosis dependiente, lo cual podría sugerir un *cross-talk* entre ambas vías de señalización. En este punto es importante destacar que las células MCF-7 resultaron más sensibles a ICI que las T47D dado que las primeras tienen un comportamiento estrogénico dependiente *in vivo* e *in vitro*, y es por esto que su respuesta al bloqueo de la acción del E₂ es muy importante. En el caso de las T47D su mayor resistencia al tratamiento con ICI podría deberse a que en este modelo la vía de los progestágenos y el RP toma mayor relevancia. Por esto decidimos utilizar concentraciones un orden de magnitud menor en MCF-7 cuando se las trató con ICI en los ensayos subsiguientes.

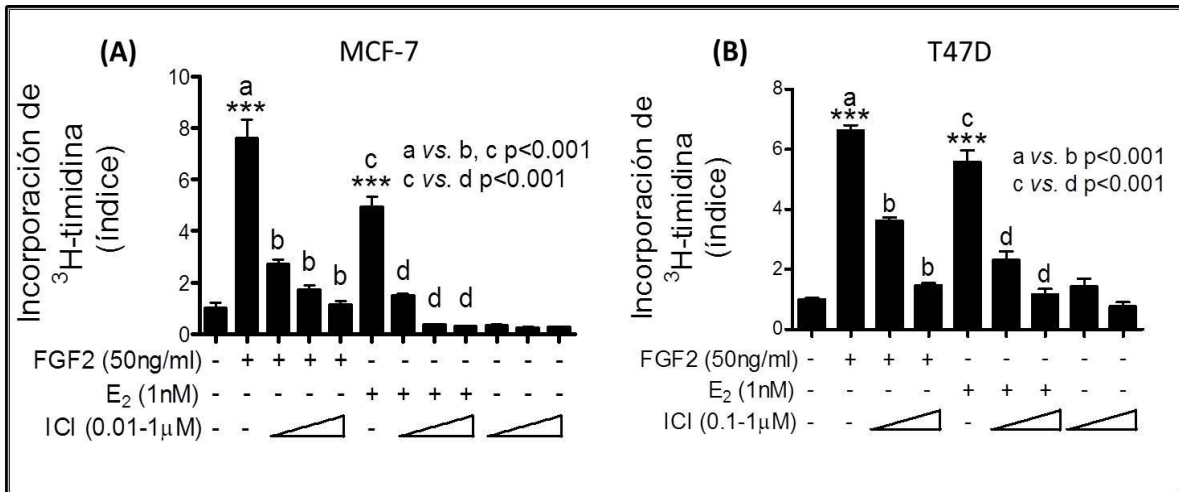


Figura 3-1. Papel del RE α en la estimulación de la proliferación celular inducida por FGF2 en células MCF-7 y T47D evaluado por incorporación de timidina tritiada: Efecto de un antiestrógeno. Se sembraron 3000 células por pocillo tanto de MCF-7 (A) como de T47D (B) en placas de 96 con medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB. Luego de 24 horas, se arretaron las células en medio con 1% SFBch durante 24 horas. Posteriormente se comenzaron los tratamientos de 48 horas de duración con las concentraciones indicadas en la figura y se agregó ³H-timidina en las últimas 18 horas del experimento. Los resultados se expresan en índice de cpm exp/cpm control ($x \pm ES$).

Para confirmar que es el RE α el involucrado en el *cross-talk* con FGF2, se realizaron experimentos para inhibir la expresión endógena de este receptor en ambas líneas celulares, utilizando dos *siRNAs* específicos del RE α (Apéndice 3). Como se observa en la **Figura 3-2**, el silenciamiento del RE α en las células MCF-7 evitó que las células proliferaran ante el estímulo mitogénico inducido por el FGF2. El *siRNA* control no modificó la estimulación inducida por el FGF2. Estudios de WB confirmaron la disminución en la expresión del RE α en células transfectadas con los *siRNAs* (panel inferior, **Figura 3-2**). Ambos estudios apuntan a un rol del RE α en la proliferación mediada por FGF2. Si comparamos los efectos inducidos en ambas líneas celulares, es importante destacar que en las células T47D en las cuales el silenciamiento del RE α fue más contundente que en las MCF-7, el efecto del silenciamiento es sólo parcial. Estos resultados están de acuerdo con los anteriores mostrando que el RE α cumple un papel más importante mediando el efecto del FGF2 en la línea MCF-7 que en la T47D.

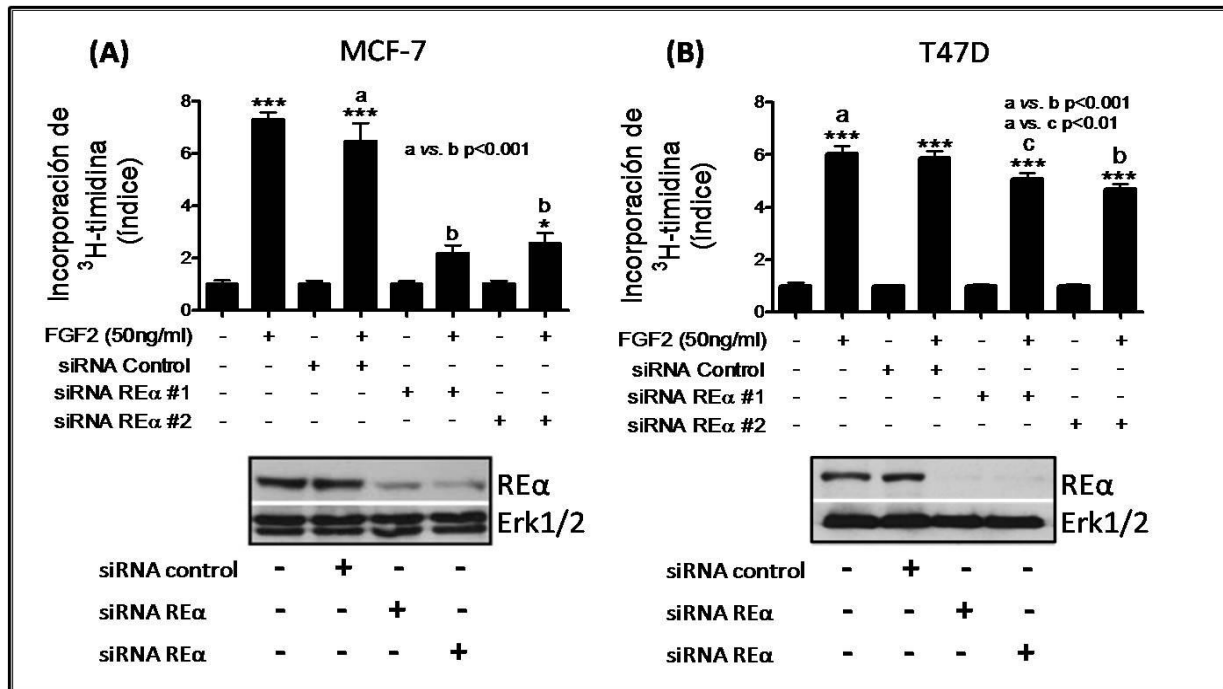


Figura 3-2. Papel del REα en la estimulación de la proliferación celular inducida por FGF2 en células MCF-7 y T47D evaluado por incorporación de timidina tritiada: Bloqueo de la expresión del REα mediante *siRNAs* específicos. Se sembraron aproximadamente 3000 células MCF-7 o T47D por pocillo en placa de 96 en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB. Luego de 24 horas, las células se transfectaron con los *siRNAs* correspondientes, durante 6 horas y luego se arrestarton durante 24 horas en medio DMEM/F12 suplementado con 1% SFBch. Se trataron las células con FGF2 durante 48 horas y se agregó ³H-timidina luego de 24 horas de comenzado el tratamiento. Los resultados se expresan en índice de cpm exp/cpm control ($x \pm DS$). En el panel inferior se muestran los ensayos utilizados para corroborar el silenciamiento del REα. Brevemente, se transfectaron las células con los *siRNAs* correspondientes, utilizando el reactivo HiPerfect *transfection reagent*. Luego de 48 horas se realizaron extractos totales de proteínas y se analizó la expresión de REα por WB.

Los resultados observados utilizando técnicas de incorporación de ^3H -timidina se validaron realizando recuentos celulares. Asimismo se comparó el efecto inhibitorio inducido por el ICI con el efecto inducido por inhibidores de FGFR-2. En experimentos anteriores hemos investigado el efecto del inhibidor PD sobre la proliferación celular inducida por FGF2 en la línea T47D (Giulianelli et al. 2008; Cerliani et al. 2011). En esta tesis utilizamos además el inhibidor BGJ, específico de FGFRs y con un IC50 menor que el PD lo que lo hace un inhibidor más potente en particular del FGFR-1 y 2. Como se observa en la **Figura 3-3**, el FGF2 indujo un aumento en el número de células en ambas líneas celulares, efecto que fue inhibido por ambos antagonistas de FGFR-2, así como también con el antiestrógeno ICI, apuntando una vez más a la interacción entre ambos *pathways*.

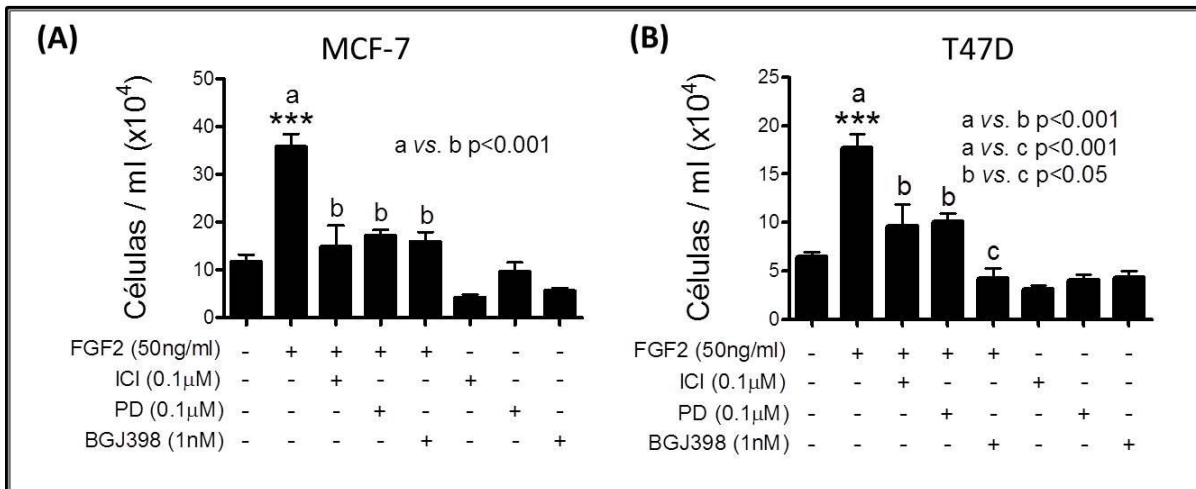


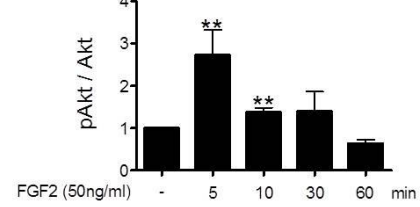
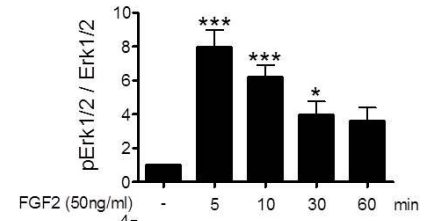
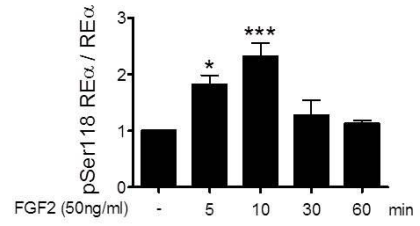
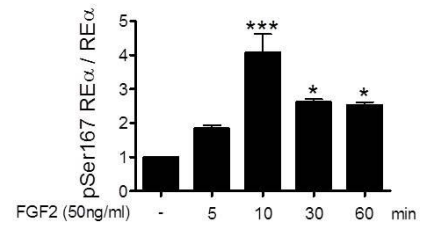
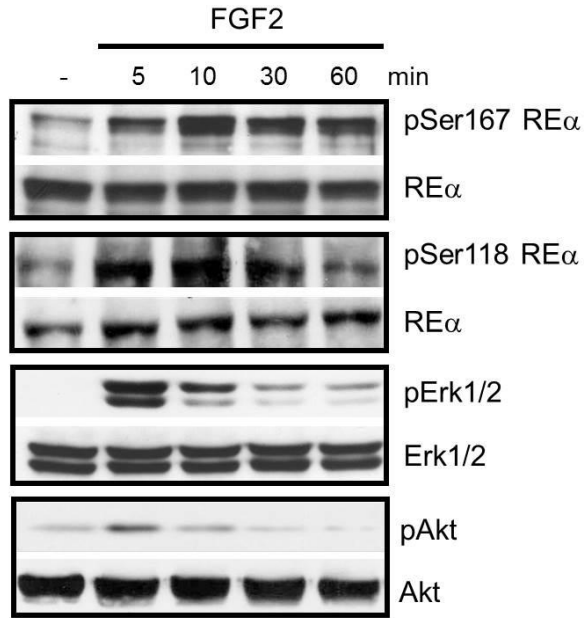
Figura 3-3. Papel del REα en la estimulación de la proliferación celular inducida por FGF2 en células MCF-7 y T47D evaluado por recuento celular. Se sembraron 40000 células en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB por pocillo, en placas de 12 hoyos. Luego de 24 horas se ayunaron las células con DMEM/F12 con 1% SFBch. Pasadas 24 horas de arresto, se trataron durante 7 días, renovando el medio cada 48 horas, con los tratamientos indicados. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se cuantificó utilizando la cámara de *Neubauer*. Los resultados se expresan $x \pm DS$. Se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes.

1.2- FGF2 activa al RE α .

Habiendo observado una inhibición en la estimulación con FGF2 luego de bloquear al RE α , evaluamos la activación del receptor midiendo su fosforilación por WB, como también el estado de activación de las vías de Erk1/2 y Akt luego del estímulo con el FGF2. Para esto se obtuvieron extractos proteicos totales de cultivos en monocapa tanto de células MCF-7 como T47D, tratadas con FGF2 y se evaluó dentro de la hora de tratamiento la fosforilación del RE α mediante la detección de dos residuos fosforilados, las serinas 118 (Murphy et al. 2006) y 167 (Arnold et al. 1994), asociadas a la activación de este receptor. Como se observa en la **Figura 3-4 A y B**, a los 5 minutos se induce la fosforilación del receptor, modificación que se mantiene en las células MCF-7 a lo largo del tratamiento, y que decae en las células T47D luego de aproximadamente 30 minutos de estímulo con FGF2. En ambos casos el efecto de fosforilación en el residuo 167 es ligeramente más prolongado que en la serina 118.

(A)

MCF-7



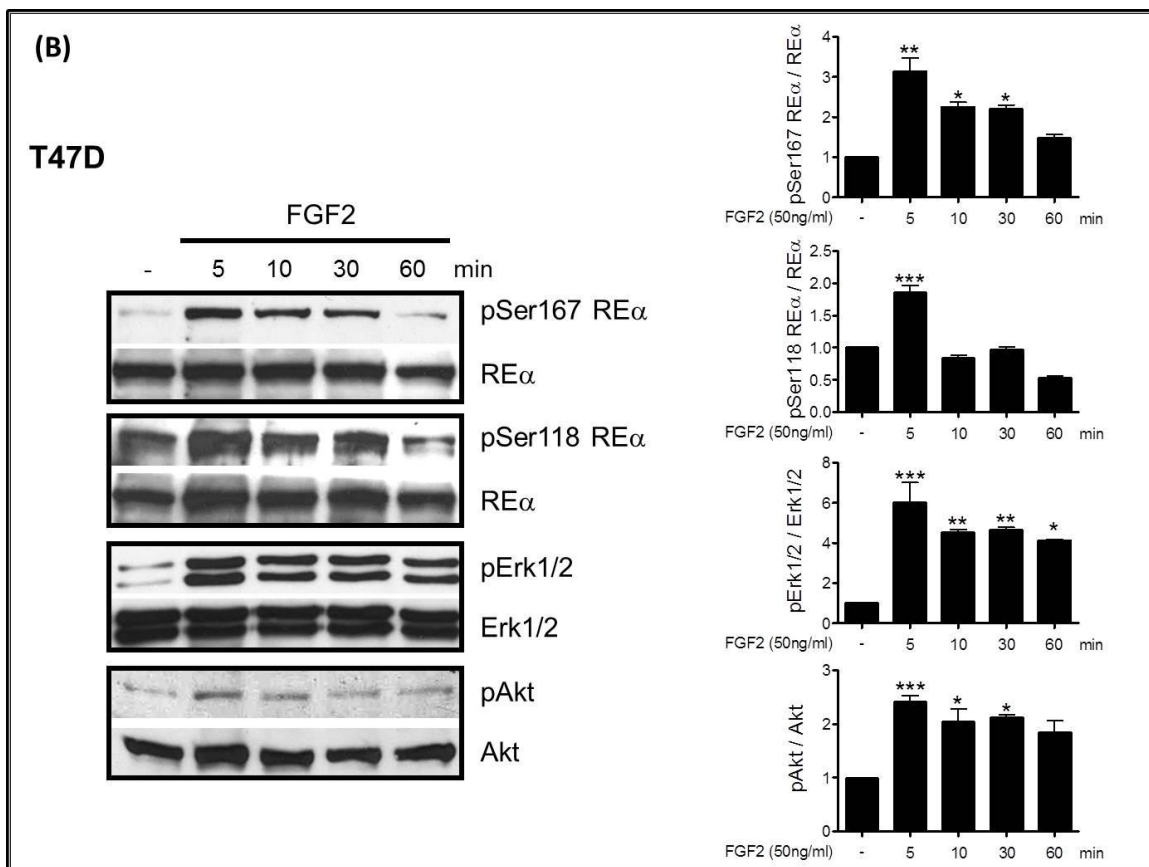


Figura 3-4. Fosforilación del RE α y activación de vías de señalización en células tratadas con FGF2. Se sembraron células MCF-7 (A) o T47D (B) en placas de 60 mm de diámetro y se utilizaron al alcanzar el 90% de confluencia. Se arrestaron las células en medio solo durante 24 horas. Luego se trató con FGF2 (50 ng/ml), y se extrajeron las proteínas utilizando *buffer* RIPA con inhibidores de proteasas. Como método alternativo, se utilizó el *buffer* de siembra directamente para extraer las proteínas. Para todos los casos se sembraron 100 μ g de proteínas totales por calle. En el método alternativo, se realizó un recuento de células previo a la siembra y se sembró el mismo volumen en cada calle. El WB fue cuantificado utilizando el método de densitometría. Se muestra un experimento representativo de tres.

En conjunto con la fosforilación del RE α , se analizó la activación de las vías de señalización de las MAPK Erk1/2 y de PI3K/Akt, las cuales se activan por receptores tipo tirosina quinasa, entre ellos los FGFRs al unir factores de crecimiento. Ambas vías resultaron estimuladas luego del tratamiento con FGF2, siguiendo una cinética similar a la del RE α (**Figura 3-4 A y B**). En la línea MCF-7 la activación del RE α es posterior a la activación de las MAPK y Akt, mientras que en las células T47D ocurre a tiempos muy tempranos, ya a los 5 minutos se encuentran en su máximo estado de activación.

Para determinar si luego de la fosforilación el RE α era funcional a nivel transcripcional, se midió la inducción de una construcción reportera bajo el control del sitio de respuesta a estrógenos (ERE), el cual representa la secuencia canónica con la cual el receptor interactúa en la región promotora de genes regulados en respuesta a la señalización por esta vía. Para esto, se transfectaron las células con dicha construcción, y luego se trataron con FGF2, ICI o PD o combinaciones de los anteriores, durante 24 horas. Luego se midió la actividad luciferasa como medida de la expresión del gen reportero. En la **Figura 3-5** se muestra la inducción de dicho gen para cada tratamiento respecto del control. Como control positivo se utilizó E₂, el cual induce el sistema, corroborando su funcionalidad. Como puede observarse también, el FGF2 induce la expresión del gen reportero, lo cual se revierte tanto por el ICI como por el inhibidor específico de los FGFRs, el PD. Estos resultados comprueban que el RE α , luego de ser activado indirectamente por FGF2, puede unirse a su elemento de respuesta e inducir la expresión de genes, evidencia a favor de la comunicación entre estas dos vías de señalización. Es interesante destacar que la estimulación inducida por FGF2 es similar en magnitud a la inducida por el ligando natural del RE α , y si bien en las células T47D la inhibición por ICI parecería ser mayor que en las células MCF-7, en las T47D se usó un orden de magnitud mayor de ICI teniendo en cuenta los experimentos mostrados previamente.

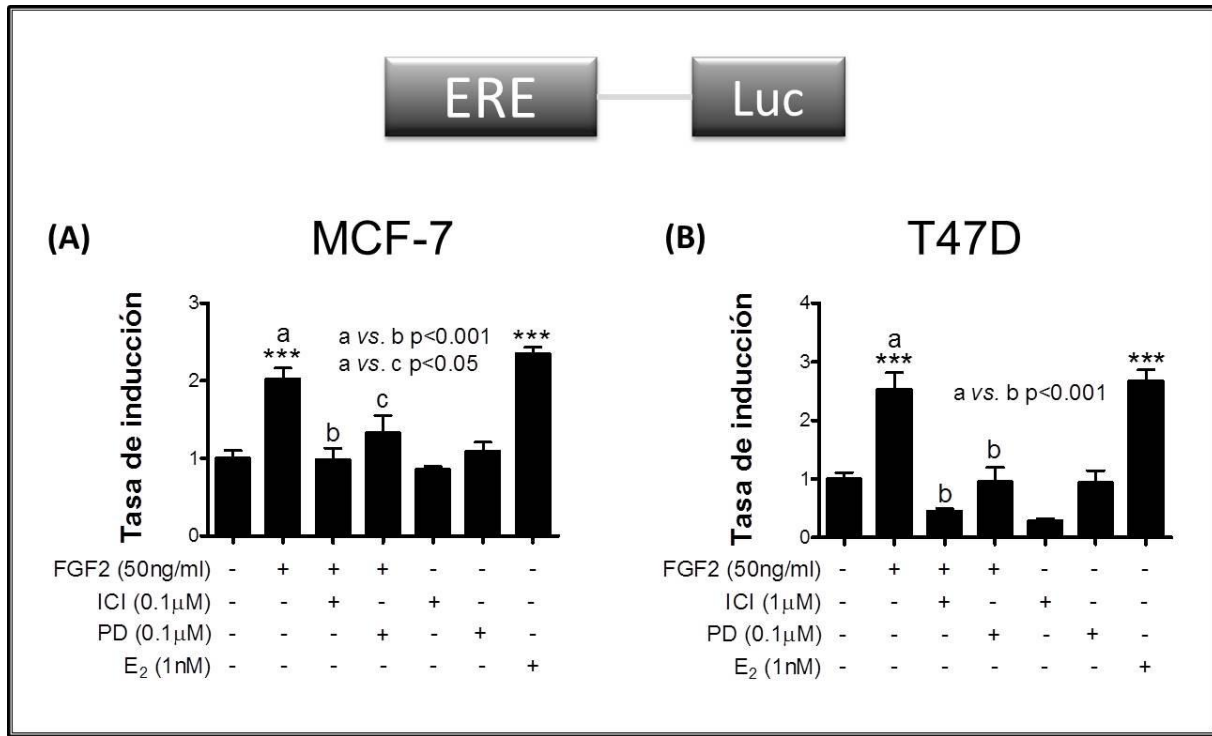


Figura 3-5. Expresión de un gen reportero inducido por el tratamiento con FGF2. Células MCF-7 y T47D se sembraron en placas de 24 pocillos, y se trasfectaron con la construcción reportera ERE-Luc. Los cultivos se arrestartaron en medio con 1% SFBch y se trataron durante 24 horas con las soluciones que se detallan en la Figura. Posteriormente, se lisaron las células y se midió la actividad Luciferasa utilizando un *Kit* comercial en un Luminómetro. Los resultados se muestran respecto al Control sin tratamientos. Se muestra la cuantificación de un experimento representativo de tres.

1.3- Determinación de los niveles de transcripción de genes modulados por el RE α .

Si bien el ensayo anterior demostraba la capacidad del RE α de interactuar con su elemento de respuesta luego de la activación por FGF2, quisimos profundizar en el estudio de la activación de esta vía. Para esto, nos propusimos evaluar la respuesta sobre genes endógenos en ambas líneas celulares. Se examinó la expresión de genes blanco de acción de RE α como *c-MYC* (Miller et al. 1996; Petz and Nardulli 2014) y *pS2* (Barkhem et al. 2002), luego del tratamiento con FGF2. Como se puede observar en la siguiente figura, ambos genes resultaron sobre expresados al tratar las células por 60 minutos con FGF2. Además, en ambas líneas dicha estimulación se revirtió por el tratamiento con antiestrógeno ICI. Como control positivo se utilizó la inducción con el ligando natural del receptor de estrógenos, el E₂.

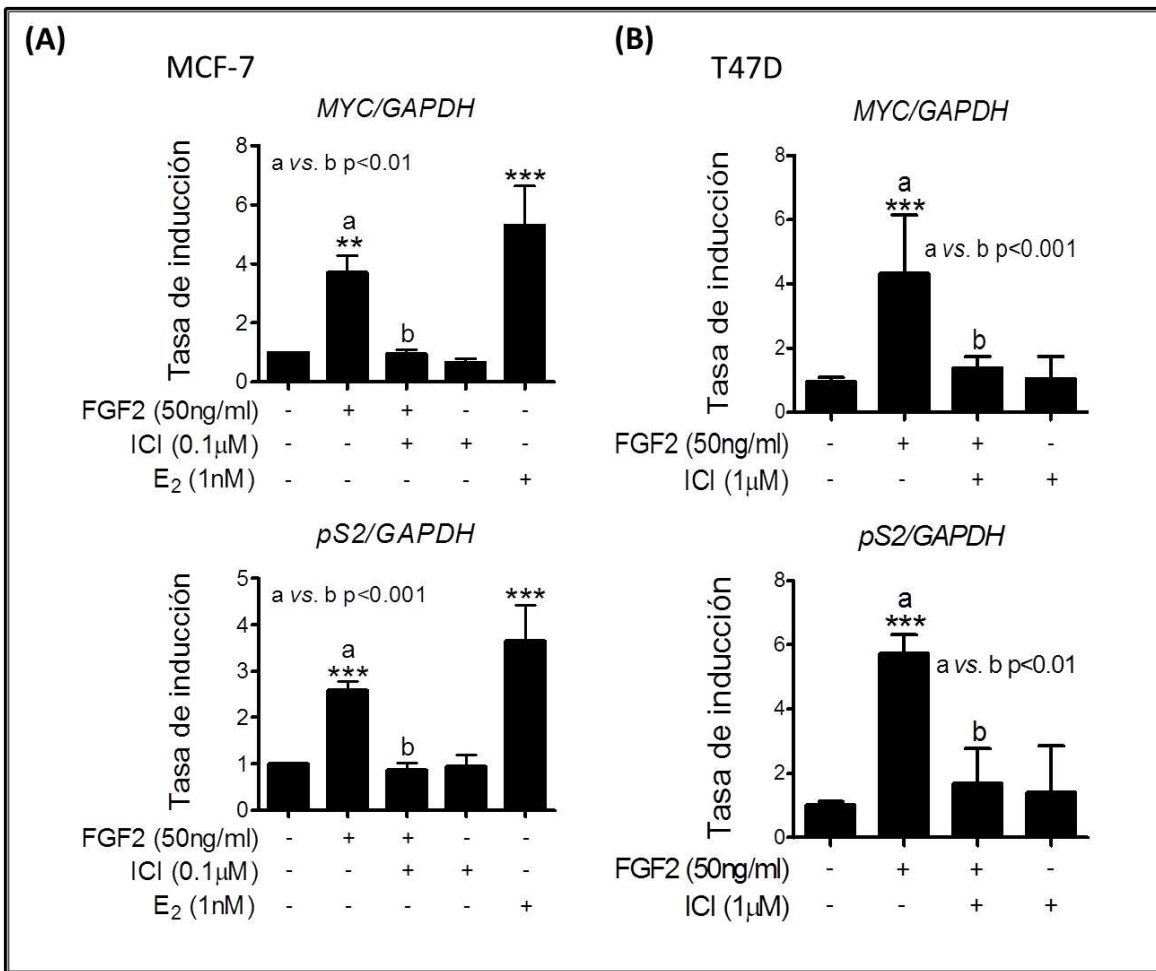


Figura 3-6. Expresión de genes modulados por la actividad del RE α . Se realizaron los extractos de ARN total con el reactivo Trizol tanto para MCF-7 (A) como para T47D (B), siguiendo las indicaciones del fabricante. Cantidades iguales de ARN de partida se utilizaron para la reacción de retro transcripción, siguiendo el protocolo consignado en la sección de materiales y métodos. 1 μ l del producto de retro transcripción se utilizó para medir la expresión de los genes de interés. Cada muestra se midió por duplicado. Se utilizó *GAPDH* como gen *housekeeping*.

Teniendo en cuenta las evidencias presentadas en las secciones anteriores, los resultados indicarían que no sólo RE α es fosforilado, sino que además posee total funcionalidad para activar genes río abajo luego del tratamiento con FGF2, demostrando su funcionalidad y su participación en la proliferación celular inducida por el factor de crecimiento.

1.4- Estudios sobre el promotor de un gen endógeno regulado por la vía del receptor de estrógenos.

Habiendo determinado no sólo la inducción de la proliferación por FGF2 sino también la activación ligando independiente del RE α y la consecuente inducción de genes río abajo, se prosiguió a evaluar la interacción del RE α con el promotor del gen *pS2*. Utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (*ChIP*), se midió la ocupación de dos sitios ERE descritos en el promotor proximal (**Figura 3-7**) de dicho gen, luego de la incubación con FGF2. Como se puede observar en la **Figura 3-7**, el FGF2 induce el reclutamiento del receptor al elemento de respuesta en ese promotor, en ambas líneas celulares utilizadas. Además, se evaluó el reclutamiento de FOXA1, un factor pionero relacionado con el RE α (Carroll et al. 2005), el cual se sabe que es necesario para la interacción del RE α con el ADN. En concordancia con lo anterior, se observó un aumento de la interacción de FOXA1 con el ADN en esa región.

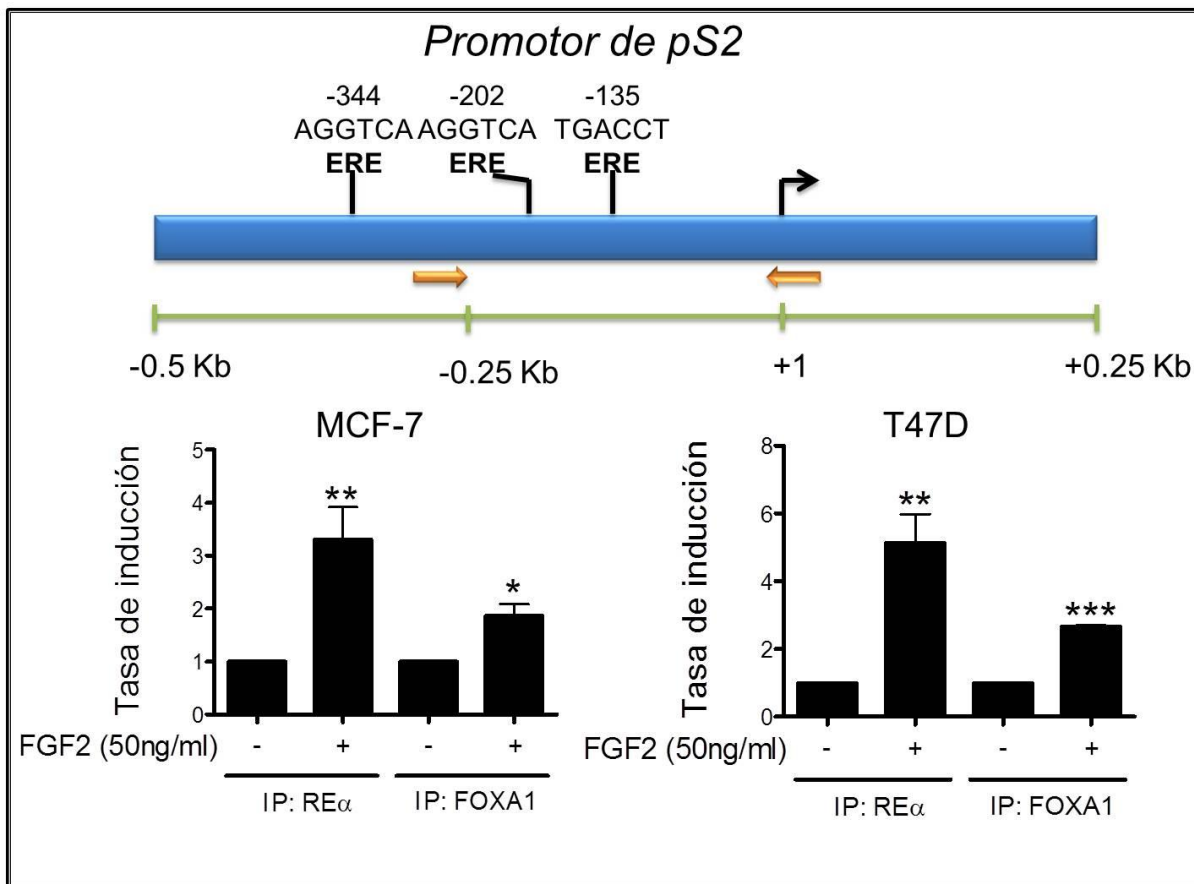


Figura 3-7. Reclutamiento del RE α al promotor de pS2 luego del estímulo con FGF2. Se sembraron células en placas de 150 mm² y se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB. Habiendo alcanzado una confluencia de 80-90%, se arrestarton los cultivos con medio suplementado con 1% SFBch. Luego se trataron las células con FGF2 en una concentración de 50 ng/ml, durante 45 minutos. Se realizó la inmunoprecipitación y la extracción de ADN utilizando el *kit* de Diagenode, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron 2 μ l de ADN inmuno precipitados por replica para cuantificar por *PCR* en tiempo real cuan representada estaba la secuencia del promotor amplificada. Los *primers* descritos en la el apéndice 3 se indican con las flechas rojas en la figura. Los resultados se presentan como tasa de inducción respecto del control sin tratamiento. Se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes.

Las evidencias hasta el momento presentadas indicarían que el RE α puede ser activado de manera ligando independiente por el FGF2, y que es funcional luego de su activación, ocupando elementos de respuesta en genes claves modulados por esta vía. Asimismo, el FGF2 puede inducir el reclutamiento de factores pioneros como el FOXA1. Además, el efecto del factor de crecimiento puede

ser revertido por antiestrógenos, sugiriendo una vez más la interrelación entre ambas vías de señalización.

1.5- Generación de una línea celular con sobre expresión de una versión constitutivamente activa del FGFR-2.

Habiendo evaluado la activación ligando independiente del RE α a través del FGF2, se decidió evaluar la posible activación del RE α en células transfectadas de forma estable con una variante de FGFR-2 constitutivamente activo. Para ello se transfectó la línea celular MCF-7 con una variante del FGFR-2 portando una mutación que provoca la dimerización constitutiva y por ende activación del receptor (Robertson et al. 1998). A este modelo lo denominamos MCF-7-R2CA o R2CA. En primera instancia constatamos la sobre expresión del transgen en dichas células, comparándolas contra una línea transfectada con el vector vacío (MCF-7 vacío o Vacío). Como se muestra en la **Figura 3-8**, se observó sobre expresión de FGFR-2 en las células R2CA. Anteriormente, como parte de la tesis doctoral del Dr. Cerliani se había realizado un abordaje similar sobre la línea T47D para evaluar la interacción entre la vía de FGFR y el RP. En esta ocasión elegimos a la línea MCF-7 para estos experimentos ya que en estas células el RP es dependiente de la activación del RE α .

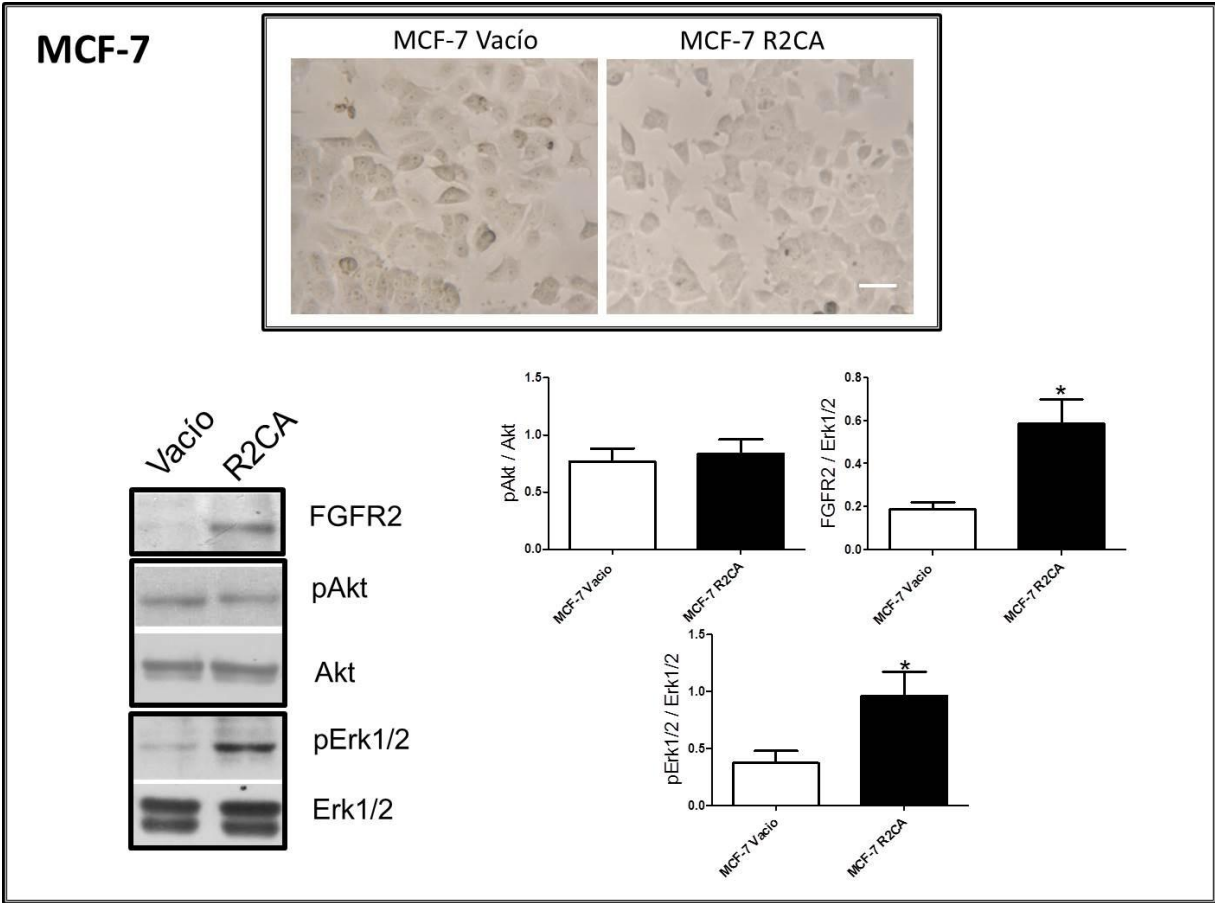


Figura 3-8. Análisis de la expresión de proteínas en el modelo R2CA. Se realizaron extractos proteicos de las líneas transfectadas con el vector vacío o con el vector R2CA. Se corrieron 100 µg de proteínas totales por calles en geles de poliacrilamida al 10%. Se analizó la expresión del FGFR-2, y la activación de las vías de señalización de Erk1/2 y PI3K/Akt. Se muestra un ensayo representativo. Las cuantificaciones representan la media de al menos 3 muestras independientes ($X \pm ES$). En el panel superior se muestra una fotografía en microscopio invertido de células MCF-7 vacío y R2CA en cultivo en monocapa (tamaño de la barra: 50 µm).

Habiendo corroborado la sobre expresión del FGFR-2 mutante, decidimos evaluar si de hecho existía una activación de las vías clásicas río abajo de los receptores de tirosina quinasa. Es claro en la **Figura 3-4** que los niveles basales de RE α activado en la línea MCF-7 wt son muy bajos y que el mismo se activa en presencia de E₂ o FGF2 debido a la activación de Erks y Akt. Por lo tanto se evaluó la activación basal de estas vías en las células R2CA en comparación a la línea con el vector vacío. Para esto ensayamos la activación de Erk1/2 y Akt midiendo la fosforilación de estas proteínas por WB. Como se puede observar en la **Figura 3-8**, si bien no se evidenció una activación de Akt, sí se pudo observar un aumento en la fosforilación de Erk al comparar ambas líneas celulares en condiciones basales. Para indagar si el RE α participaba en la señalización mediada por el R2CA, se midió su estado de fosforilación en condiciones basales (**Figura 3-9**). Si bien no se observó una mayor proporción de RE α fosforilado en el mutante con respecto al RE α total, la cantidad total de RE α fosforilado por célula sería mayor ya que también se observó un aumento de RE α total. Es interesante remarcar que se midió la expresión de RP, un gen que en el modelo MCF-7 es inducible por E₂ a través de su receptor, y como se ve en la **Figura 3-9**, la línea transfectada expresa basalmente este receptor, lo cual indicaría que el RE α estaría activo.

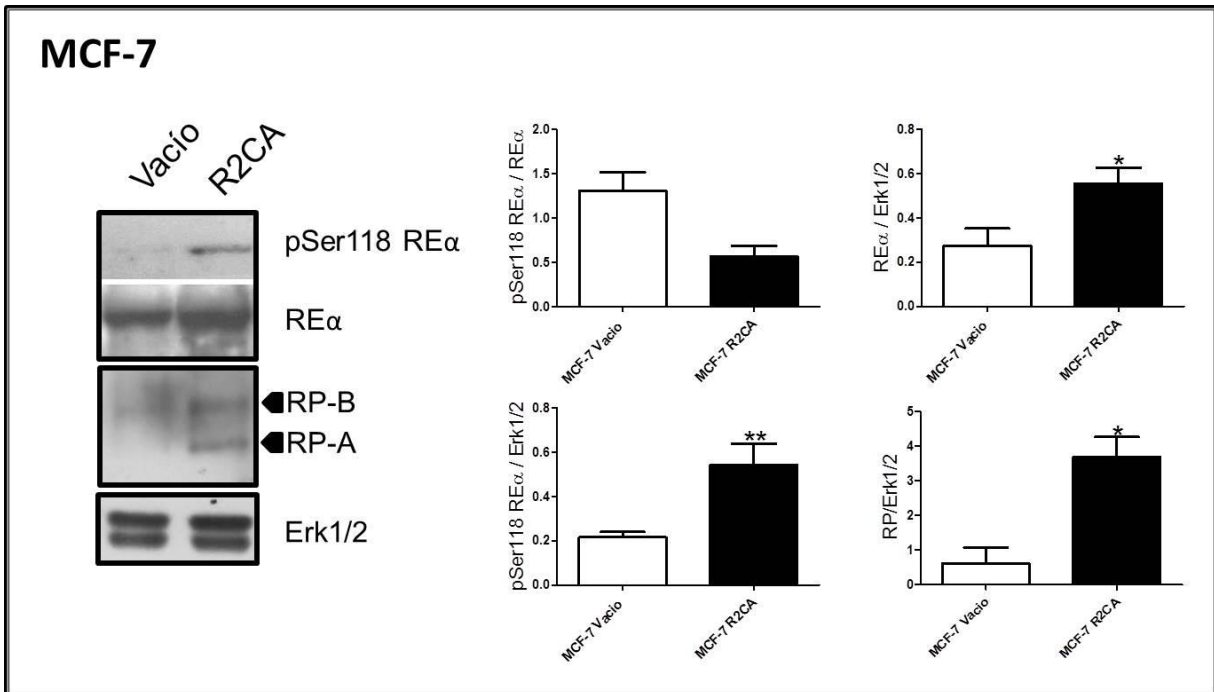


Figura 3-9. Activación de receptores hormonales en el modelo R2CA. Se midió la activación en estado basal de RE α y RP en el modelo mutante. Para esto se corrieron 100 μ g de proteínas totales en gels de poliácridamida al 10% y se reveló contra la serina 118 de RE α , contra RE α total y RP total. Se muestra un ensayo representativo. Las cuantificaciones representan la media de al menos tres ensayos independientes ($X \pm ES$). Erk1/2 se utilizó como control de carga.

1.6-Expresión de FGFR-2, receptores hormonales y factores de interés en células MCF-7-R2CA.

Los resultados de WB indicaban que el RE α estaría activo. Para corroborarlo, analizamos la expresión y localización sub celular de los receptores hormonales por otras técnicas. Como se observa en la **Figura 3-10** y en concordancia con lo obtenido por WB, el modelo R2CA basalmente expresa RP y de localización nuclear. Esto apuntaría a un RE α activado, teniendo en cuenta que en las mismas condiciones, las células transfectadas con el vector vacío sólo expresan RP al incubarlas con E₂. Al analizar la fosforilación del RP, encontramos que existe una fosforilación basal en el modelo R2CA, en concordancia con la activación del RE α , un efecto comparable al tratamiento de las células control con E₂. Al evaluar la fosforilación basal del RE α , pudimos observar una mayor marcación para la serina 118 en las R2CA, comparable con las células control estimuladas con E₂, apoyando los resultados observados por WB.

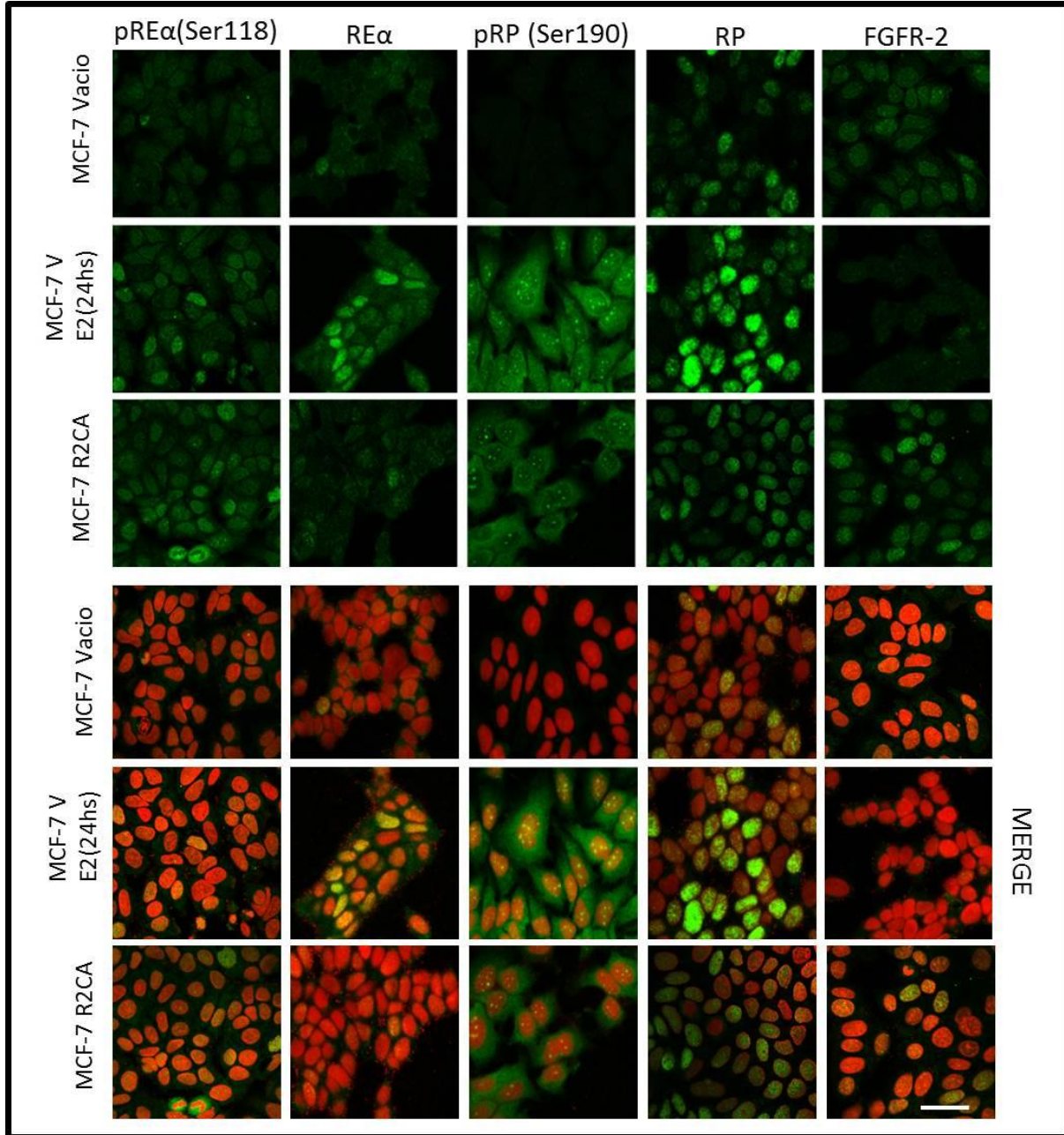


Figura 3-10. Inmunofluorescencia de células R2CA. Se sembraron células transfectadas tanto con el vector vacío como con la variante mutante en vidrios cubreobjetos de 12 mm de diámetro sobre el fondo de los pocillos de una placa de 24 hoyos. Luego de 24 horas se arrestaron con medio DMEM:F12 con 1%SFbch. Se realizaron tratamientos con E₂ durante 24 horas para luego fijar las células con etanol al 70% en frío (-20°C). Se siguió el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos para las inmunomarcaciones. Verde: marca específica; Rojo: Ioduro de propidio (núcleos). Tamaño de la barra: 50 μ m.

1.7-Expresión de genes regulados por RE α en el modelo MCF-7 con el gen mutante.

Para evaluar la activación de la señalización río abajo del RE α evaluamos la expresión de un gen que se activa luego del tratamiento con E₂ y como vimos anteriormente, también con FGF2, *pS2*. Al medir la expresión por qPCR pudimos observar que en estado basal había mayor expresión de *pS2* en el modelo R2CA con respecto a las células con el vector vacío, indicando que la vía del RE α podría estar activa.

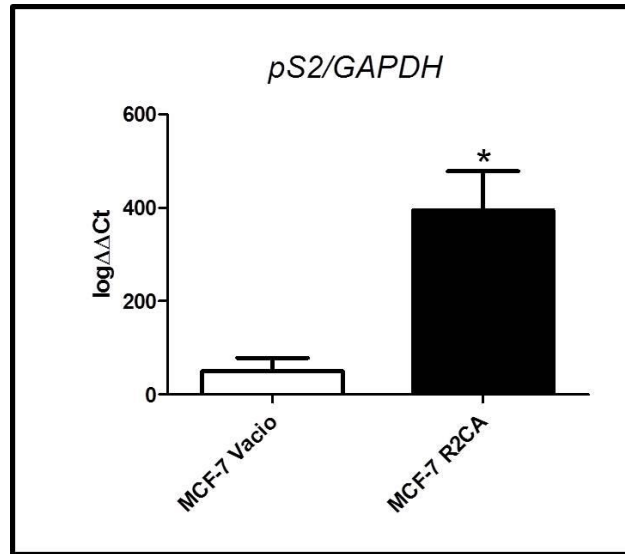


Figura 3-11. Expresión de *pS2* en el modelo R2CA. Se evaluó la expresión del gen *pS2* por PCR cuantitativa. Se realizaron extractos de ARN total en condiciones de arresto celular, y se analizó la expresión de *pS2*. Se muestra la cuantificación de un experimento con 4 muestras obtenidas de forma independiente ($X \pm ES$).

1.8-Proliferación en el modelo R2CA.

A continuación, evaluamos si la activación del FGFR-2 en el modelo R2CA tenía efectos sobre la proliferación celular, dado que en la **Figura 3-8** se observó que la vía de las MAPK se activaba, la cual está vinculada a la proliferación y supervivencia celular. Para esto se evaluó la proliferación por recuento celular utilizando una cámara de *Neubauer* y se estimó el número de células por ml. Como se puede observar en la **Figura 3-12**, las células transfectadas tuvieron una mayor tasa de proliferación en condiciones basales que las células control (a vs. b $p < 0.05$). Es interesante destacar que mientras la proliferación de las células con vector vacío responden positivamente al estímulo proliferativo del E_2 y del FGF2, las MCF-7 R2CA no muestran la misma respuesta ante los mismos estímulos, dada su mayor tasa proliferativa en condiciones basales. Si bien la falta de respuesta es evidencia de que basalmente están estimuladas, las R2CA pueden ser inhibidas al ser tratadas con el inhibidor específico de FGFRs, el BGJ como así también con el ICI, apuntando nuevamente al vínculo entre ambas vías de señalización. Interesantemente, responden también a la inhibición por el antiprogéstágeno MFP, indicando que el RP también participa en la proliferación de la cepa mutante.

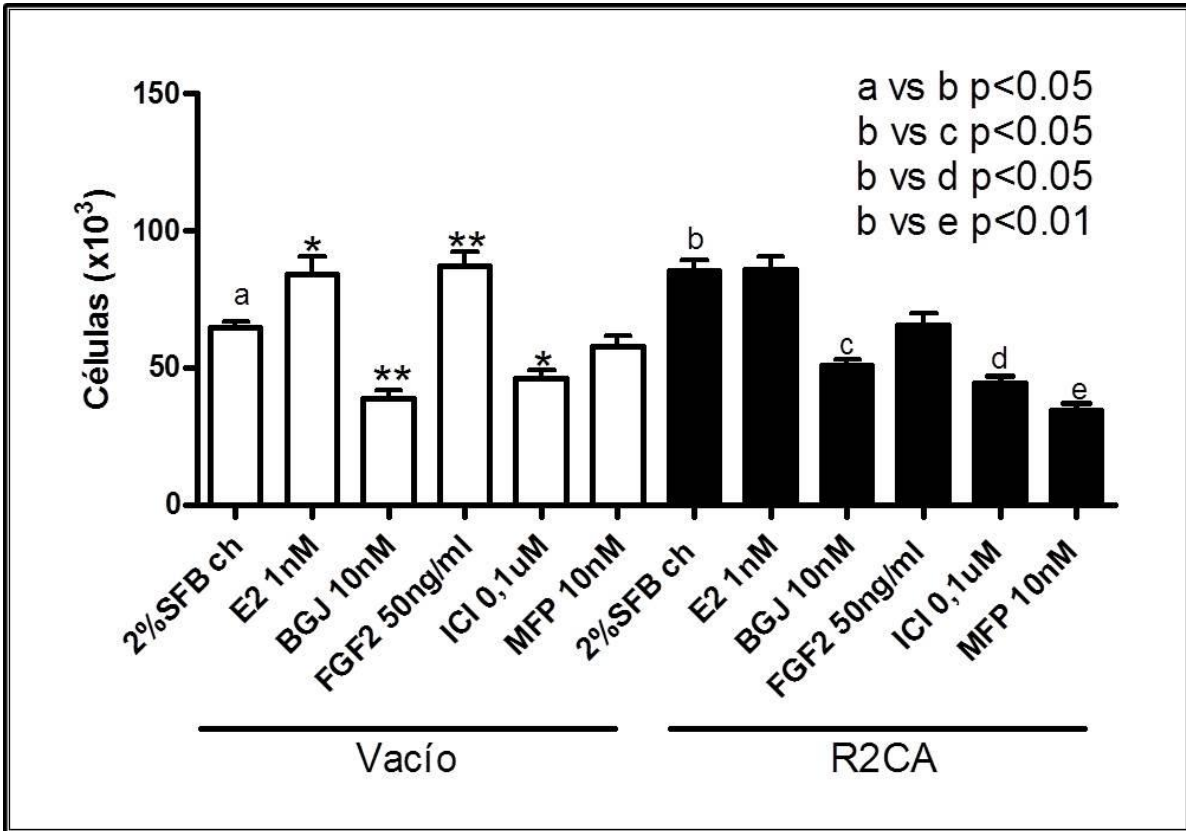


Figura 3-12. Proliferación celular en el modelo R2CA evaluada por conteo de células. Se sembraron 40000 células de ambos tipos en placas de 12 pocillos. Se arrestartaron durante 24 horas con DMEM:F12 con 2% SFBch y luego se trataron durante 5 días con los factores y hormonas correspondientes. Al finalizar el tratamiento, se tripsinizó cada hoyo por separado, se centrifugó y se resuspendieron las células en 1 ml de PBS 1X. Se contó en cámara de Neubauer y se comparó la media del total de células para cada tratamiento y entre líneas celulares. Se muestra la cuantificación de un experimento representativo ($X \pm ES$).

1.9-Crecimiento *in vivo* del modelo R2CA.

Luego de haber corroborado la activación basal de las vías de señalización de Erk1/2, el aumento en la expresión del RE α , la inducción del RP y pS2, y haber demostrado una mayor tasa de proliferación de las células R2CA, se analizó el crecimiento *in vivo* de esta línea celular en ratones inmunosuprimidos. Se inocularon 5 millones de células en forma sc en ratones *nu/nu* o NSG, tanto de MCF-7 con el vector control como de las R2CA. Cabe destacar que las células con el vector control se comportan como las wt y necesitan el aporte exógeno de E₂ para establecerse como xenotransplante. Como se puede observar en la **Figura 3-13**, las R2CA logran establecerse como xenotransplante pero su crecimiento se detiene al alcanzar un tamaño de 25-30 mm². Como control positivo se inocularon las células wt con aporte de E₂. Cabe aclarar que las células control sin E₂ no crecen *in vivo* (dato no mostrado).

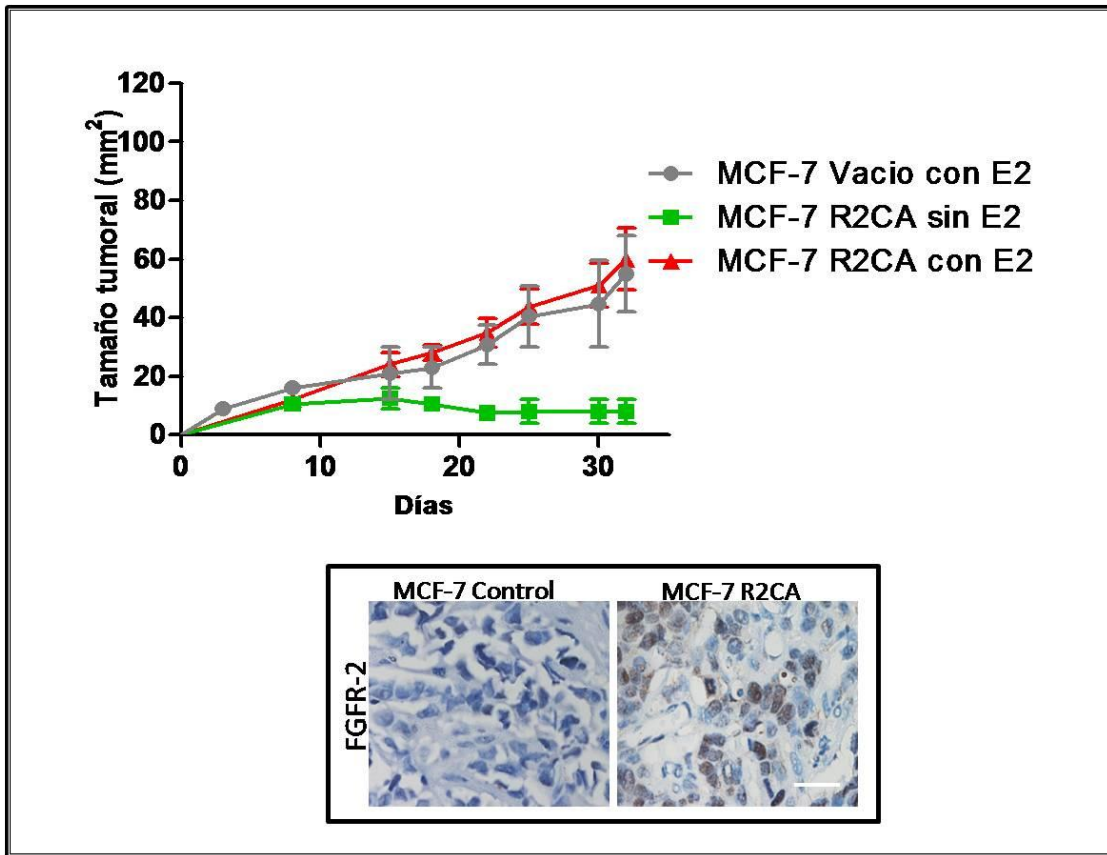


Figura 3-13. Crecimiento de xenotransplantes de líneas celulares MCF-7 y MCF-7 R2CA. Se inocularon 5 millones de células por animal, en el flanco derecho y de forma sc, con 100 μ l de matrigel de alta densidad. Los ratones inoculados con células MCF-7 control (vector vacío) fueron tratados con E_2 (pellet 5 mg). Se monitoreó el crecimiento día por medio, midiendo largo y ancho. En el panel inferior izquierdo se muestra un análisis por inmunohistoquímica de la expresión del FGFR-2 en tumores wt (que se comportan igual que las MCF-7 con el vector vacío) y R2CA. La barra blanca indica 50 μ m.

En el panel inferior de la **Figura 3-13**, se puede observar que el efecto del R2CA es suficiente para el establecimiento del tumor, pero no genera tumores hormono independientes. Al tratar los tumores R2CA con E₂, se obtiene un crecimiento sostenido, similar al de las células control con la hormona.

Habiendo establecido el modelo *in vivo*, en una segunda instancia se inocularon MCF-7 R2CA en ratones y se decidió ensayar su sensibilidad a antiestrógenos y antiprogestágenos. En la **Figura 3-14** se observa que tanto el tratamiento con Fulvestrant (ICI 182.780) como con MFP, provoca una regresión parcial del tumor, indicando que si bien el establecimiento de la línea es mediado por el R2CA, el crecimiento depende aun de la señalización por receptores hormonales.

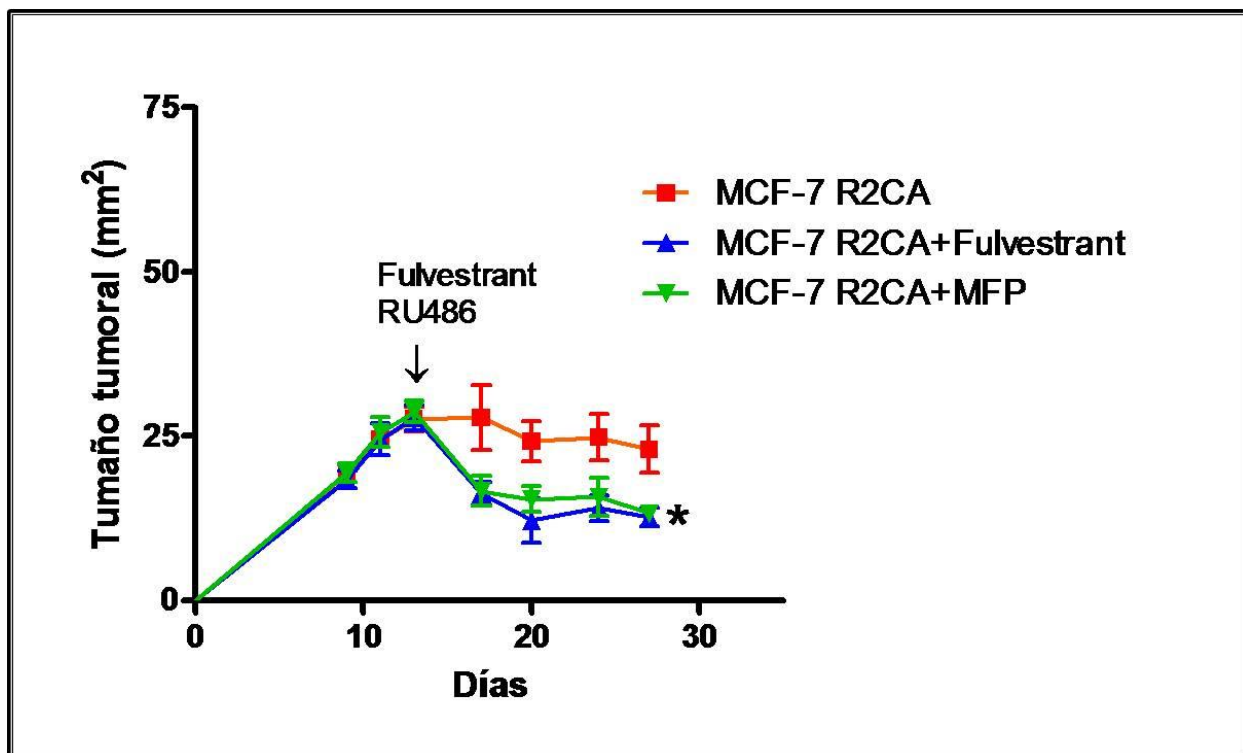


Figura 3-14. Crecimiento de R2CA en presencia de Fulvestrant y MFP. Se inocularon células R2CA en el flanco derecho de animales inmunosuprimidos. Se monitoreó el crecimiento tumoral hasta que se alcanzó un tamaño promedio de 25 mm² y se comenzó el tratamiento con Fulvestrant (inyección semanal de 5 mg en 100 µl por ratón) o con MFP (pellet de 6 mg, se cambia cada 15 días). Se siguió el crecimiento por medición con calibre vernier, día por medio hasta el momento de sacrificio de los animales.

1.10-Estudios histológicos del modelo de xenotransplantes de R2CA.

Con el material biológico obtenido de los ensayos *in vivo* anteriores, evaluamos la histopatología de los tumores control o R2CA. El tumor control es un carcinoma ductal infiltrante semi diferenciado ya que presenta estructuras en forma de túbulos en baja proporción. Posee un alto grado nuclear (GN = 3, con al menos tres tamaños nucleares), un grado histológico entre 2 y 3, y grado mitótico alto. Presenta un leve grado de necrosis y tiene bordes “pujantes” lo cual es un criterio de benignidad. A nivel citológico, se observan nucléolos evidentes, cromatina laxa con células de morfología homogénea.

En el caso del tumor R2CA también es un carcinoma ductal infiltrante, semidiferenciado de cromatina laxa y con nucléolos evidentes. Sin embargo, presenta un grado histológico mayor (3) aunque igual grado nuclear y mitótico que el control. Se diferencia del control en que posee características asociadas a un tumor más invasivo. Como se puede ver en la **Figura 3-15**, el tumor logró invadir el tejido graso circundante y mostrar infiltración perineural (**Fig. 3-15** panel **b**). Al suplementar el crecimiento del R2CA con E₂, sus características se vuelven indistinguibles del tumor control con E₂, con bordes pujantes y no tan invasivo como el R2CA sin hormona. El grado nuclear sigue siendo 3 y el tumor parece tener el mismo grado de diferenciación que el *wild type*.

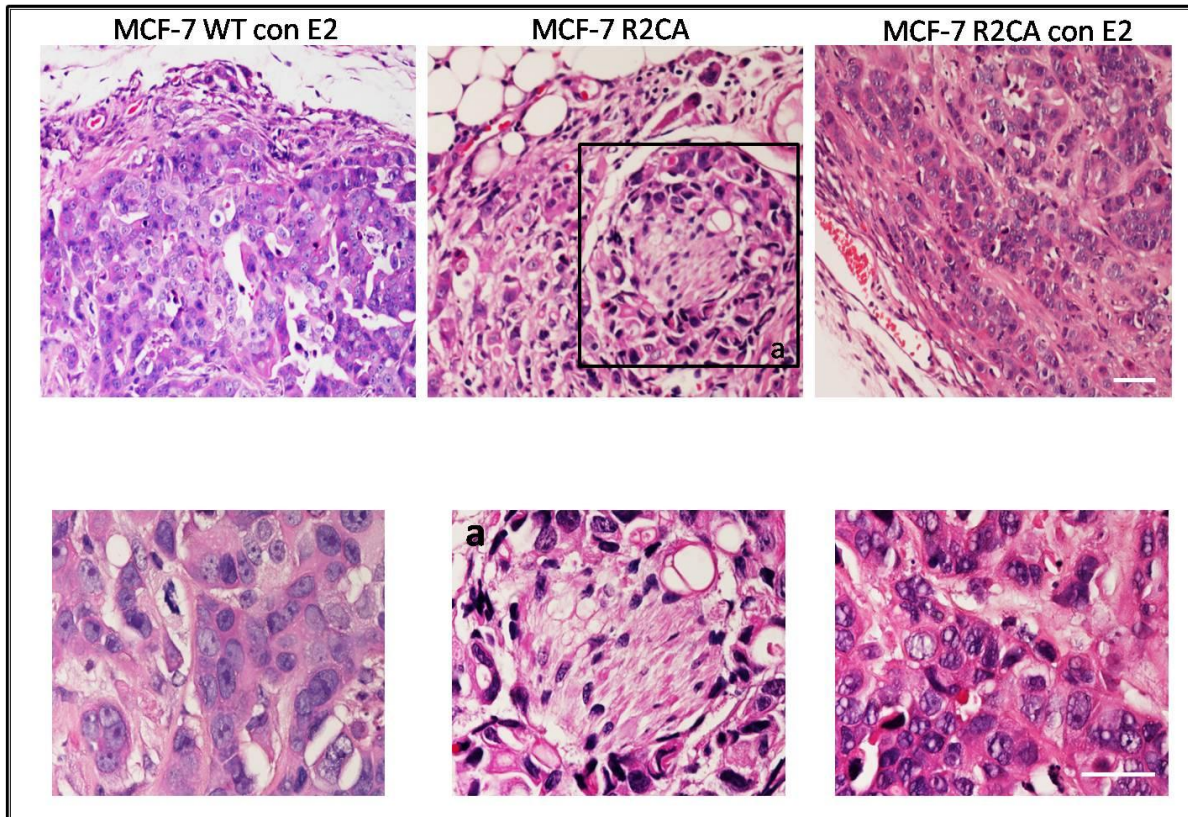


Figura 3-15. Estudio histopatológico de los tumores R2CA. De los experimentos anteriores se tomaron muestras tumorales y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes con micrótopo para luego teñirlos con hematoxilina y eosina y analizar su histología al microscopio óptico. En el panel izquierdo se observa una microfotografía del tumor control creciendo con E₂. En el panel central se observa el tumor R2CA creciendo sin aporte de hormona mostrando una infiltración perineural (a). En el panel de la derecha se observa el tumor R2CA creciendo con el aporte de E₂ (tamaño de la barra: 50 μm).

1.11-Receptores hormonales en el modelo *in vivo* de R2CA.

Posteriormente, se analizó la expresión de los receptores hormonales en los tumores R2CA. Dado que la línea wt no crece en ausencia de E_2 no es posible realizar comparaciones entre líneas creciendo sin el aporte hormonal. Como se observa en la **Figura 3-16**, el $RE\alpha$ se encuentra altamente expresado en estos tumores y se encuentra activado, lo que se evidencia asimismo por la alta expresión de RP. En el caso de los tumores control, tratados con E_2 , se muestran dos tiempos de exposición a la DAB para revelar los receptores hormonales. Al revelar los casos de los tumores R2CA, la marca fue tan intensa que hubo que cortarla y al mismo tiempo de incubación no se evidenció marca en los controles, por lo que fue necesario cambiar el tiempo de revelado para poner en evidencia que los tumores MCF-7 creciendo con estradiol expresan tanto $RE\alpha$ y RP. En todos los casos, a la izquierda se muestra el tumor en condiciones comparables con el resto de las imágenes, y a la derecha una exposición mayor, para revelar la marca específica. También evaluamos la expresión de c-MYC, y si bien es un ensayo preliminar, observamos que tanto en los tumores control (tratados con E_2) como en los R2CA (con o sin hormona) se observó marcación positiva.

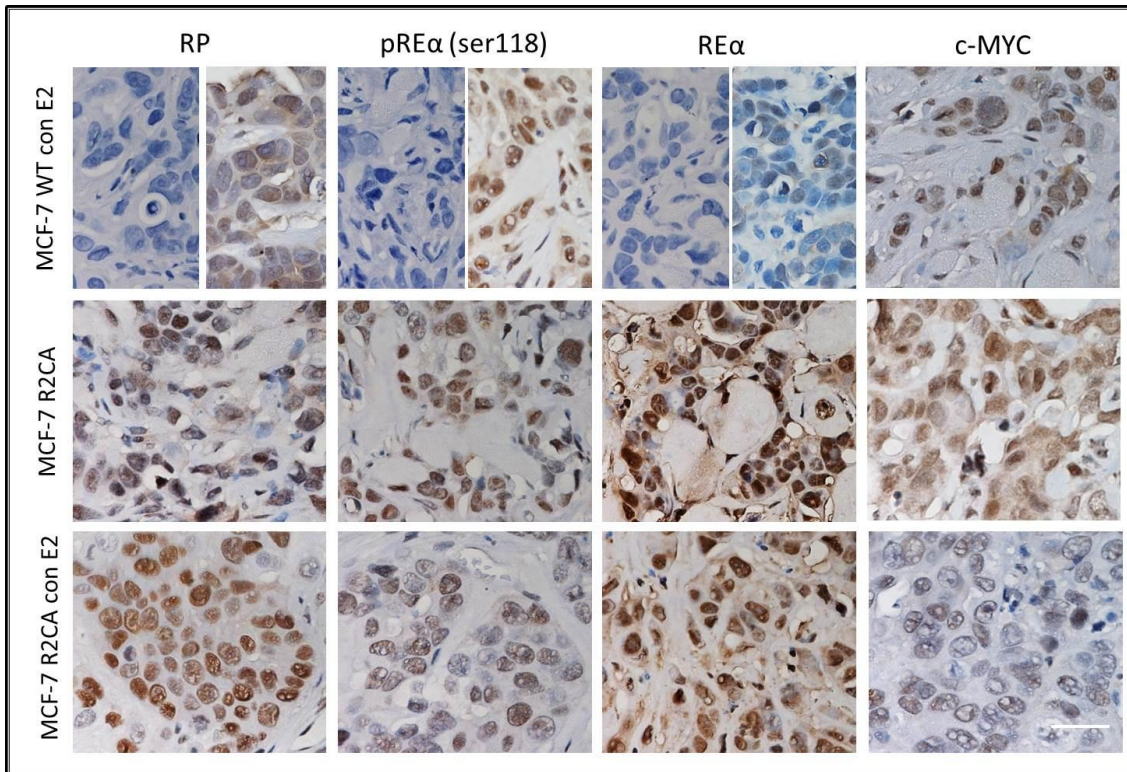


Figura 3-16. Expresión de receptores hormonales en el modelo R2CA creciendo en ratones *nu/nu*. Se tomaron muestras de los tumores R2CA y control creciendo en ratones inmunosuprimidos y se las incluyó en parafina. Se realizaron cortes de 10 μm y se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para RP y RE α . Se ensayó también c-MYC, una proteína cuya expresión está regulada por RE α . En los primeros tres paneles de la fila superior se muestra a la izquierda la inmunomarcación lograda en las mismas condiciones que el resto de las microfotografías donde se observa mayor marca en los tumores R2CA. En el panel derecho, se muestra una exposición más larga a la diaminobenzidina para corroborar la expresión de los receptores en estos tumores. La barra blanca indica 50 μm .

1.12- Crecimiento *in vivo* de tumores del modelo C4 tratados con un inhibidor de FGFRs.

Para analizar la respuesta de los tumores C4 a inhibidores de la vía de FGF, se transplantaron tumores C4-HI en forma sc al flanco derecho de ratones BALB/c. Cuando alcanzaron un tamaño tumoral de 25 mm² se los trató con BGJ398 (Sellek Chem). Como se puede observar en la **Figura 3-17**, el tratamiento con BGJ indujo una pequeña disminución del crecimiento tumoral. Anteriormente se habían realizado experimentos utilizando el inhibidor PD 173074 (Pfizer), que también indujo una reducción parcial del crecimiento tumoral (Giulianelli et al. 2008). El tratamiento con Fulvestrant (ICI182.780), inhibió el crecimiento tumoral, indicando que en el tumor HI, la vía del RE α cumple un rol preponderante en el crecimiento hormono independiente.

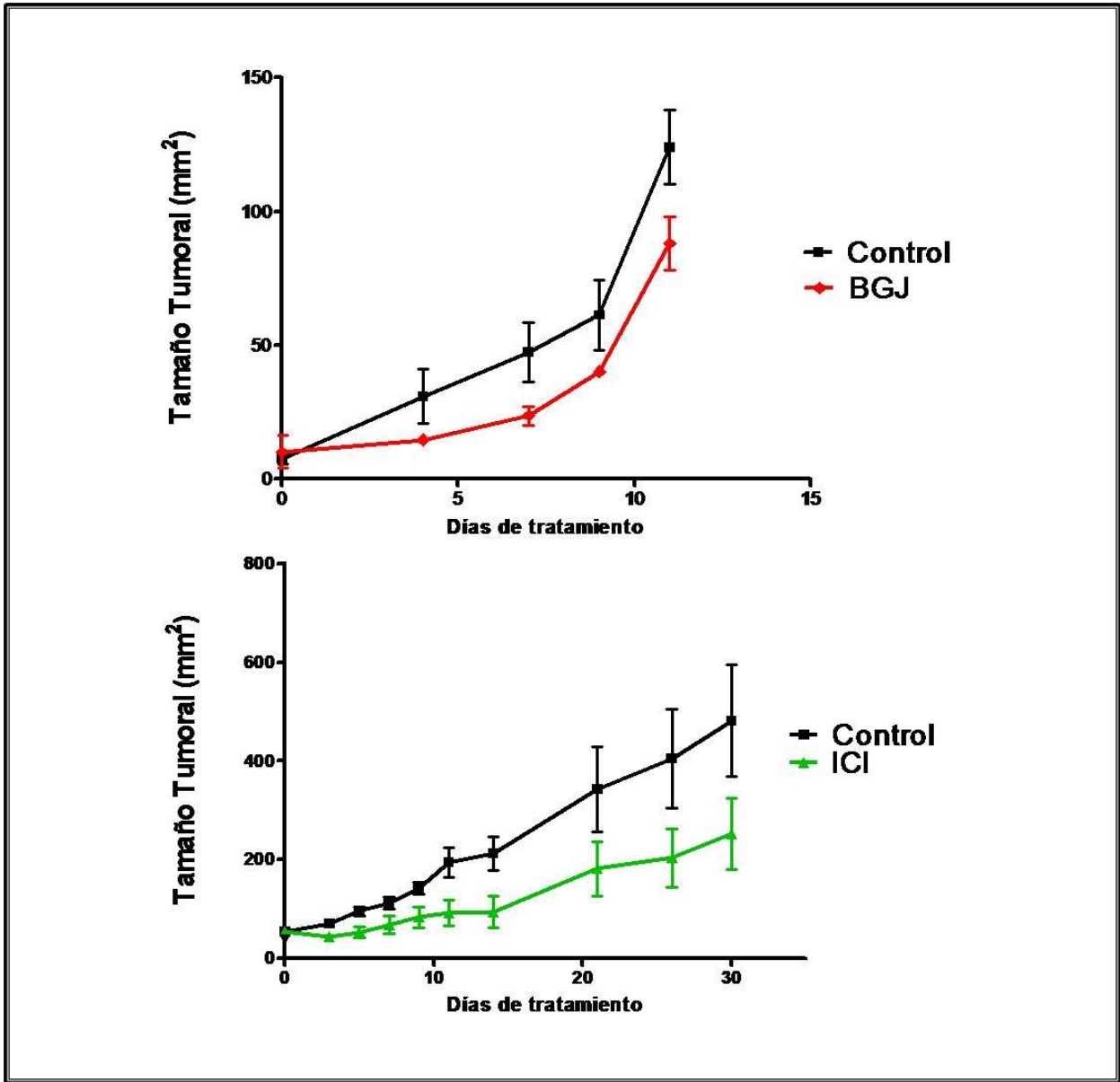


Figura 3-17. Crecimiento *in vivo* de tumores C4-HI tratados con Fulvestrant y BGJ398. Se transplantaron trozos de 2-3 mm² al flanco derecho de animales BALB/c utilizando un trocar de calibre apropiado. Luego del establecimiento del trasplante, se comenzó el tratamiento cuando el tumor alcanzó los 25 mm². Se utilizó una dosis de 18mg/kg/día para el BGJ mediante inyecciones diarias y una inyección semanal de 5 mg en 100 µl por ratón de Fulvestrant (ICI 182.780). El tejido fue incluido en parafina y luego utilizado en posteriores ensayos.

1.13- Los inhibidores de FGFR bloquean la activación del RE α sin embargo en los tumores HI sólo bloquean parcialmente el crecimiento.

Se decidió evaluar la activación del RE α en la familia de tumores murinos C4. Esta familia posee variantes tumorales hormono dependientes (C4-HD) y hormono independientes (C4-HI). Previamente se demostró que FGF2 tiene un efecto similar, al menos temporal, de estimular el crecimiento del tumor C4-HD (Giulianelli et al. 2008). Se tomaron cortes incluidos en parafina de esos experimentos y se midió la presencia de las fosforilaciones en las serinas 118 y 167 del RE α . Como se puede observar en la **Figura 3-18**, al tratar los tumores HD (luego de haber removido el MPA) con FGF2, se ve un aumento en la fosforilación de RE α . En el tumor HI se observó fosforilación basal del receptor, que se revierte con el PD 173074 (no se muestra en la figura), el inhibidor específico de los FGFRs que inhibe parcialmente el crecimiento tumoral (Giulianelli et al. 2008), o con BGJ (**Figura 3-18**). Esto indicaría una regulación cruzada entre la vía de señalización de FGF2 y sus receptores con la del RE α en este modelo, en concordancia con lo observado en las líneas celulares humanas.

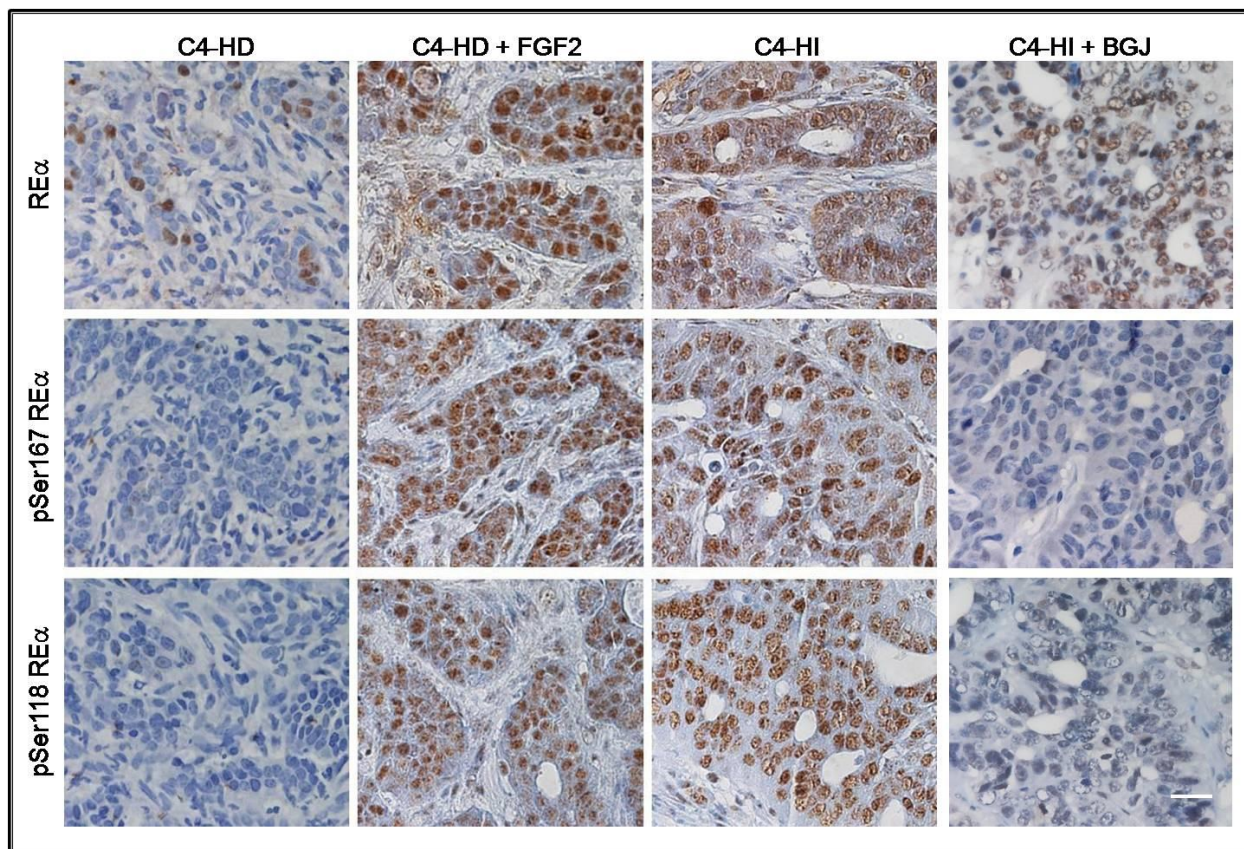


Figura 3-18. Expresión de RE α y pRE α en tumores de la familia C4 creciendo con FGF2 o tratados con el inhibidor de FGFR-2. Se tomaron cortes de tumores incluidos en parafina de 5-10 μ m y se realizaron inmunomarcaciones para las serinas 118 y 167 del RE α como así también para el receptor total. Se midió la marcación en C4-HD sin MPA (se retiró el MPA luego de establecido el tumor y por 48 horas) y en C4-HD sin MPA con tratamiento con FGF2 (50 μ g/dosis/animal). En C4-HI y C4-HI tratado con BGJ, un inhibidor de los FGFRs. Los cortes fueron expuestos a la solución reveladora durante el mismo tiempo. Se tomaron microfotografías con un microscopio E800 acoplado a una cámara Nikon en campos al azar. La barra en la foto inferior izquierda del panel indica 50 μ m.

Los resultados en el modelo C4 sugieren que el FGF2 podría ser uno de los factores que contribuyen al crecimiento hormono independiente en las variantes HI de la familia. Sin embargo, la participación del RE activado en la proliferación celular de los tumores HI sería menos relevante que la del RP, como ocurría en células T47D (**figura 3-1**).

CAPÍTULO II

miRNAs y Cáncer

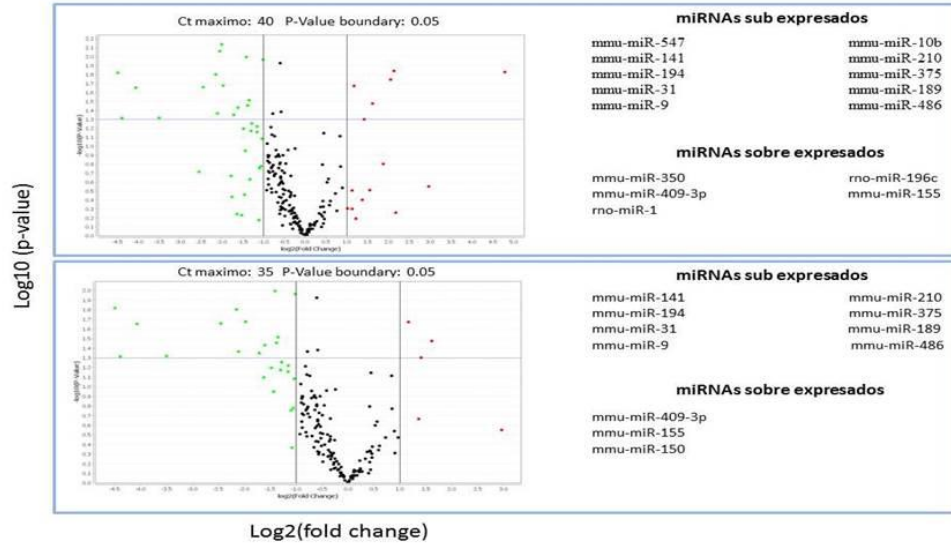
2.1-Análisis de un *microarray* de los miRNAs mejor caracterizados en ratón.

En trabajos anteriores del laboratorio, habíamos analizado el transcriptoma de los tumores de la familia C4, e identificamos al FGFR-2 como un gen sobre expresado en tumores C4-HI en comparación con los C4-HD (Giulianelli et al. 2011). Por otro lado, hemos explorado mecanismos de regulación epigenética en relación a la expresión de receptores hormonales y resistencia endocrina (Wargon et al. 2011). En este trabajo de tesis, decidimos evaluar potenciales mecanismos de regulación en la interacción entre la vía de FGF y la de RE α , mediados por miRNAs.

Para esto, se analizó la expresión de miRNAs en la familia de tumores C4. Se utilizaron 4 grupos de tumores: C4-HD crecidos con MPA a los cuales luego de establecidos se les retiró la hormona durante 48 horas (a los cuales llamaremos C4-HD sin MPA), C4-HD crecidos con MPA (de aquí en más C4-HD), C4-HI y C4-HIR (una variante de crecimiento independiente de hormonas, que fue seleccionada para la resistencia al antiprogéstágeno MFP). Como se mostró en la **Figura 3-18**, los tumores HI tienen basalmente activada la vía del RE α , presuntamente por FGF2 entre otros, por lo tanto decidimos evaluar diferencias en la expresión de miRNAs que pudieran estar relacionados con el eje FGF2-FGFRs. Se realizaron extractos de ARN total, utilizando un método que optimiza la extracción de ARNs pequeños, entre los cuales se encuentran los miRNAs. Cada grupo estaba compuesto por tres muestras independientes de las variantes tumorales. Se utilizó el *kit TaqMan Rodent Microarray A*, el cual consta de 375 miRNAs caracterizados y 5 controles internos. Básicamente se trata de una *Real Time* PCR en emulsión multiplex, modificada para amplificar moléculas pequeñas. Luego de correr la PCR, se analizaron los resultados utilizando el *software DataAssit 2.0*, que permite utilizar el método de cuantificación del $\Delta\Delta$ Ct para múltiples grupos y múltiples genes. Se utilizó el ARN pequeño ribosomal U6 como gen de referencia y también *GAPDH*, un gen de referencia ampliamente utilizado y que al ser evaluado en las mismas condiciones, logró reproducir los resultados obtenidos con el ARN pequeño. A continuación se pueden observar las tablas para la comparación entre pares posibles de grupos de tumores, siguiendo el modelo de progresión tumoral que dio lugar a las variantes de la familia. En primera instancia se tomó como ciclo máximo umbral el ciclo número 40, como condición permisiva para el análisis. Luego se utilizó un Ct máximo de 35 para eliminar la posibilidad de falsos positivos por incluir Cts tan altos.

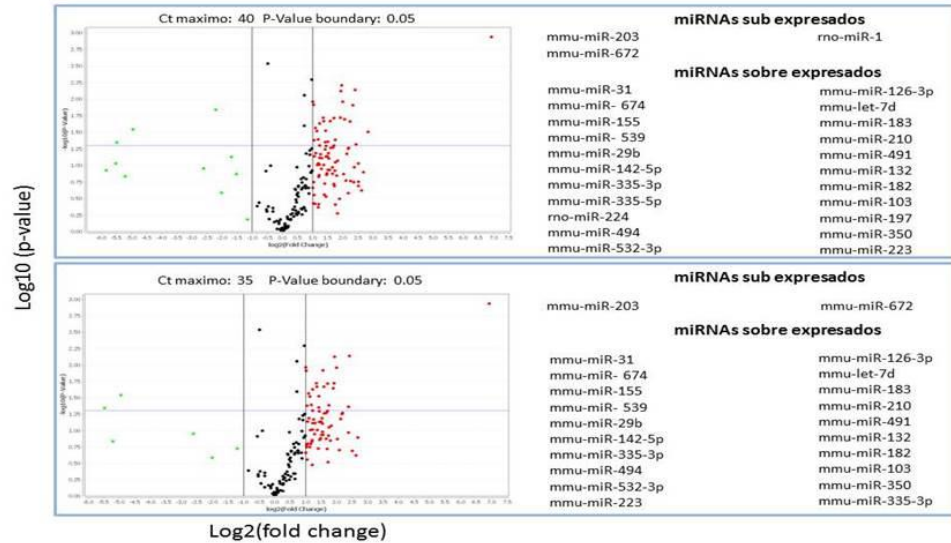
(A)

C4-HD con MPA vs C4-HD sin MPA



(B)

C4-HI vs C4-HD con MPA



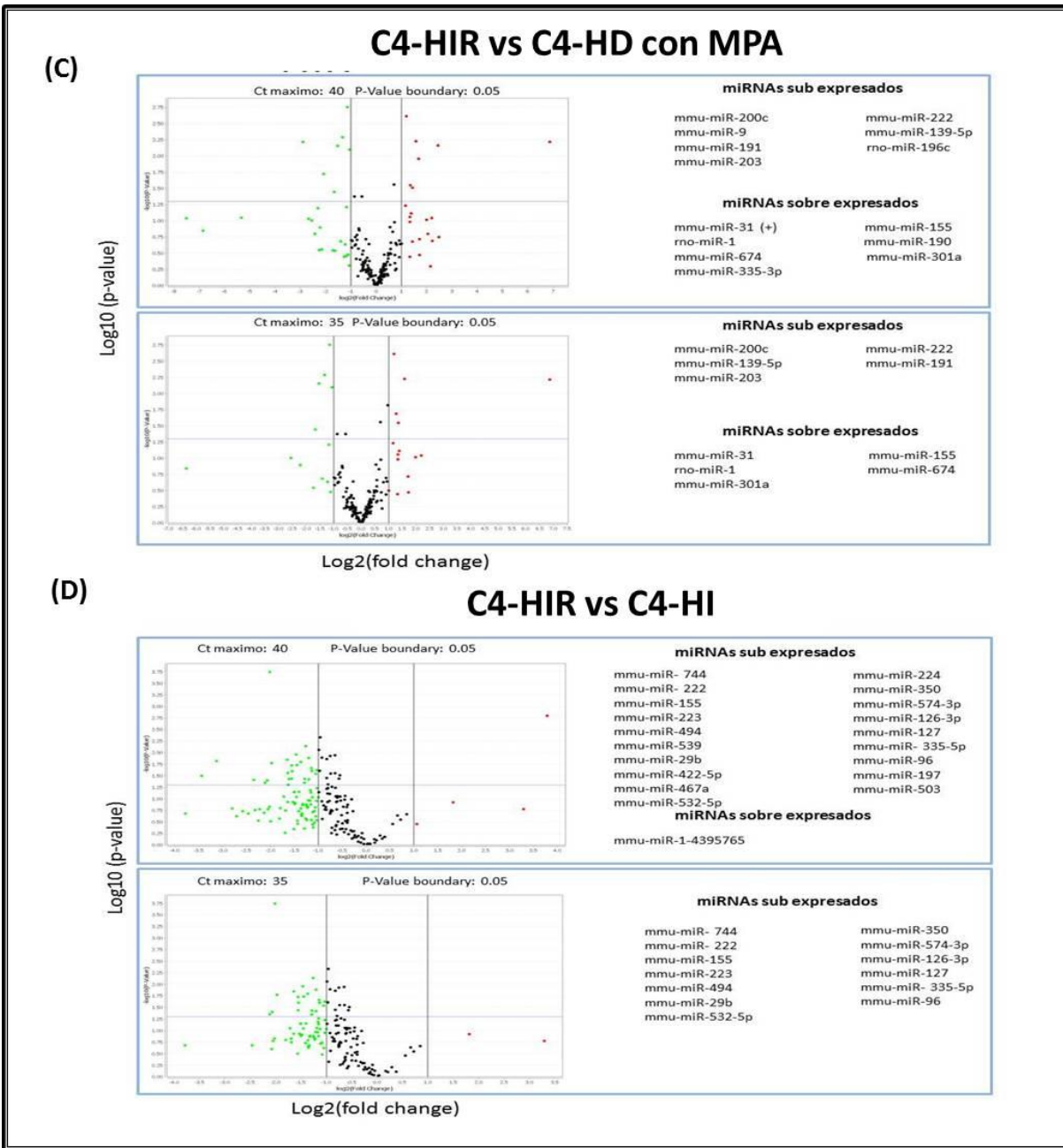


Figura 4-1. Análisis de los perfiles de expresión de miRNAs en tumores del modelo C4. Se realizó el análisis de la expresión de los 375 miRNAs incluidos en el array. Utilizando el software *Data assist v2.0*, se computaron todos los miRNAs que resultaron significativamente sobre o sub expresados. En un segundo análisis, se modificaron los valores de Ct máximos para evitar falsos positivos. Se muestra en **(A)** la expresión diferencial entre C4-HD con y sin MPA, en **(B)** C4-HI vs C4-HD con MPA, en **(C)** C4-HIR vs C4-HD con MPA y por último en **(D)** C4-HIR vs C4-HI.

En la **Figura 4-1** se muestra el análisis de la comparación entre grupos, siguiendo la progresión tumoral dentro de la familia C4. Se tuvieron en cuenta los miRNAs en el cuadrante superior izquierdo como sobre expresados, y en el cuadrante superior derecho como sub expresados, respondiendo a un *p value* menor a 0,05 y a un aumento de al menos 4 veces respecto del grupo de referencia (en todas las comparaciones, el grupo de referencia era el grupo anotado luego del “vs” en cada figura). A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos.

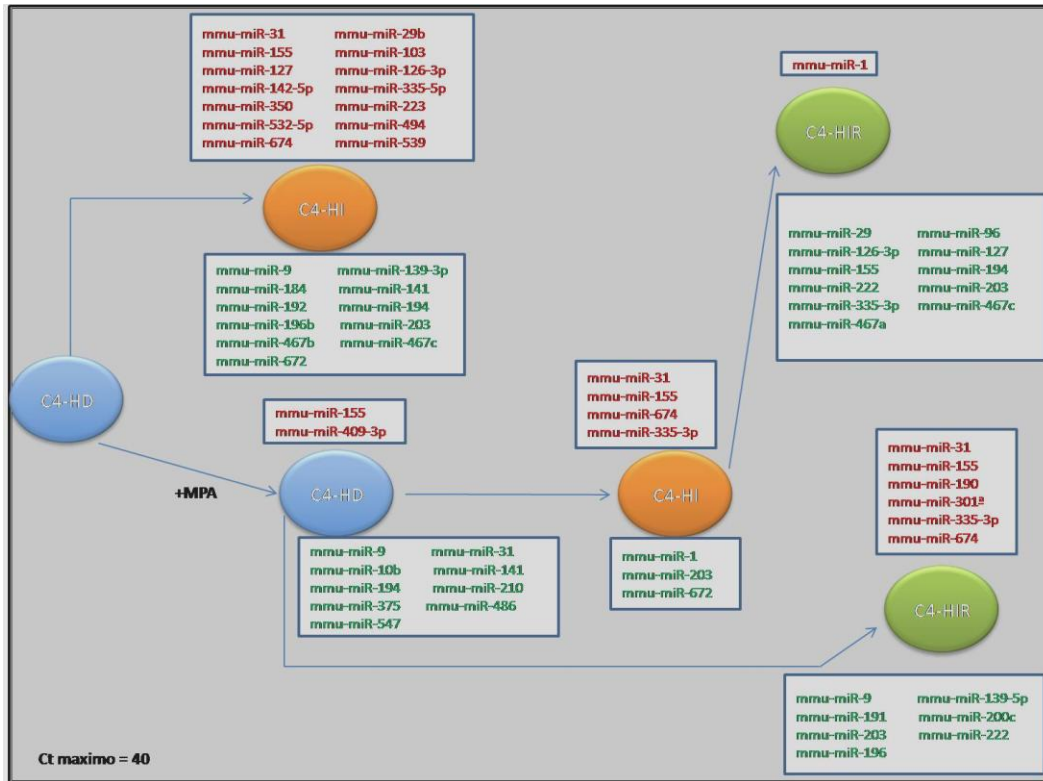


Figura 4-2. Resumen de los resultados obtenidos del análisis de miRNAs para variantes tumorales de la familia C4. Se tomaron los miRNAs sobre y sub expresados siguiendo los criterios establecidos para el análisis, destacados en el texto. En rojo se observan los candidatos sobre expresados en cada comparación y en verde los sub expresados. La base de cada flecha indica el grupo usado como referencia y la punta de la flecha indica el grupo con sobre o sub expresión de miRNAs. El cuadro resume los resultados obtenidos para un Ct máximo de 40 ciclos. Los cuadros incluyen la comparación de C4-HI vs C4-HD sin MPA, no mostrado en la figura anterior.

2.2-Identificación de posibles genes diana para los miRNAs diferencialmente expresados en las variantes tumorales y comparación con el transcriptoma de los tumores C4.

Luego de haber identificado los miRs con expresión diferencial entre los distintos grupos de tumores, se analizaron los potenciales genes blancos. Para esto, se utilizó la base de datos miRecords (www.miRecords.org, actualmente en <http://mirecords.umn.edu/miRecords/>). Esta base de datos combina los resultados obtenidos para genes blanco usando 6 algoritmos tomados de otras bases. Cada algoritmo difiere en el grado de homología de secuencia entre la región semilla y el potencial *blanco o diana* que se exige para computar un determinado gen como blanco, y la región del gen en que ocurre la

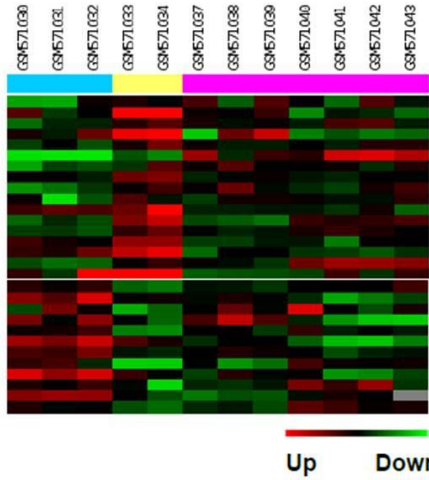
homología, siendo más relevante el extremo 3'UTR de los mensajeros. De esta manera, el sitio miRecords permite filtrar resultados teniendo en cuenta el número de algoritmos que predicen el par miRNA-gen diana.

Se tomaron como posibles blancos los genes predichos por al menos 4 algoritmos distintos, y en los casos en que no fue posible, se tomaron los genes que respondían a 3 algoritmos.

Habiendo obtenido estas listas de genes, se realizó un segundo análisis en el que se combinaron las listas de genes y se obtuvieron los candidatos potencialmente regulados por más de un miRNA sobre o sub expresado en cada comparación, presumiendo que un mensajero blanco de más de un miRNA tiene mayor probabilidad de estar regulado por estas moléculas. En la **Tabla 1**, anexada al final de la tesis, se muestra una de las listas obtenidas al comparar C4-HIR vs. C4-HI, luego de filtrar los resultados siguiendo los criterios anteriores. Hasta este punto, contábamos con listas de genes potencialmente regulados por miRNAs en el modelo C4, y decidimos cruzar estos datos con los obtenidos previamente en el laboratorio con un *microarray* de expresión génica, en el trabajo del Dr. Giulianelli anteriormente mencionado. En la **Figura 4-3** se muestran los mapas de color que combinan en el margen superior los distintos *clusters* de tumores, y en el margen derecho los *clusters* de los probables blancos agrupados por comparación de tumores en el *array* de miRNAs. Cabe aclarar que los genes que se listan son aquellos que se encontraban desregulados en los dos *arrays*. En la figura se ve entonces una matriz de doble entrada que indica qué gen está sobre o sub expresado según el *array* de expresión génica y si ese gen es potencialmente regulado por un miRNA diferencialmente expresado (sobre o sub expresado) en la variante tumoral.

(A)

C4-HD sin MPA vs C4-HD con MPA

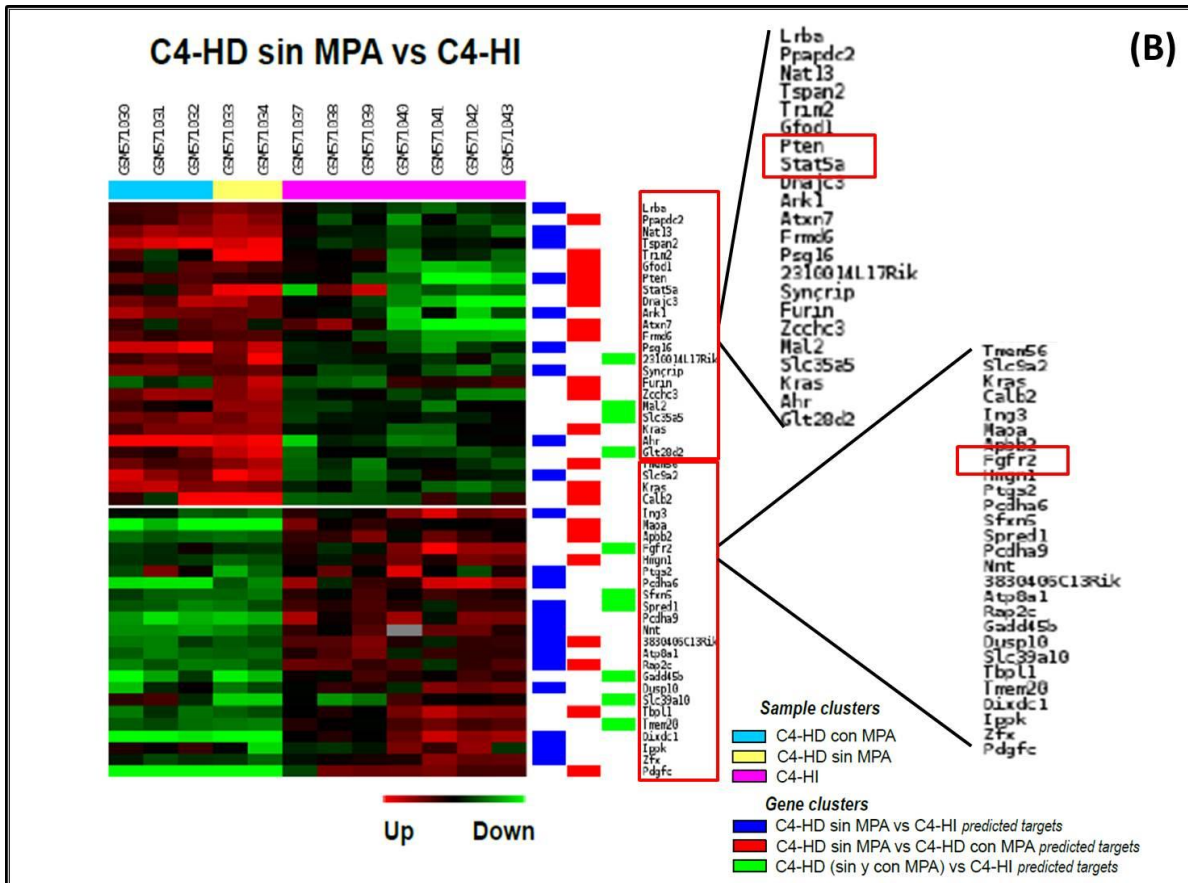


- Sample clusters**
- C4-HD con MPA
 - C4-HD sin MPA
 - C4-HI

- Gene clusters**
- C4-HD sin MPA vs C4-HI *predicted targets*
 - C4-HD sin MPA vs C4-HD con MPA *predicted targets*
 - C4-HD (sin y con MPA) vs C4-HI *predicted targets*

- Slco1a1
- Trim2
- 2510035018Rik
- Stat5a
- Stx1a
- Pcdha6
- March1
- Plekha2
- Pknox1
- Syt9
- 2510014L17Rik
- Furin
- Exec8
- Mal2
- Glt28d2
- Zfp238
- Calb2
- Dhfr
- Tnrc6b
- Ptgs2
- Nedd4
- Dhfr
- Aak1
- Creb1
- Slc39a1b
- Klf1b
- Ippk
- Slc12a8
- Htf2

- Slco1a1
- Trim2
- 2510035018Rik
- Stat5a
- Stx1a
- Pcdha6
- March1
- Plekha2
- Pknox1
- Syt9
- 2510014L17Rik
- Furin
- Exec8
- Mal2
- Glt28d2
- Zfp238
- Calb2
- Dhfr
- Tnrc6b
- Ptgs2
- Nedd4
- Dhfr
- Aak1
- Creb1
- Slc39a1b
- Klf1b
- Ippk
- Slc12a8
- Htf2



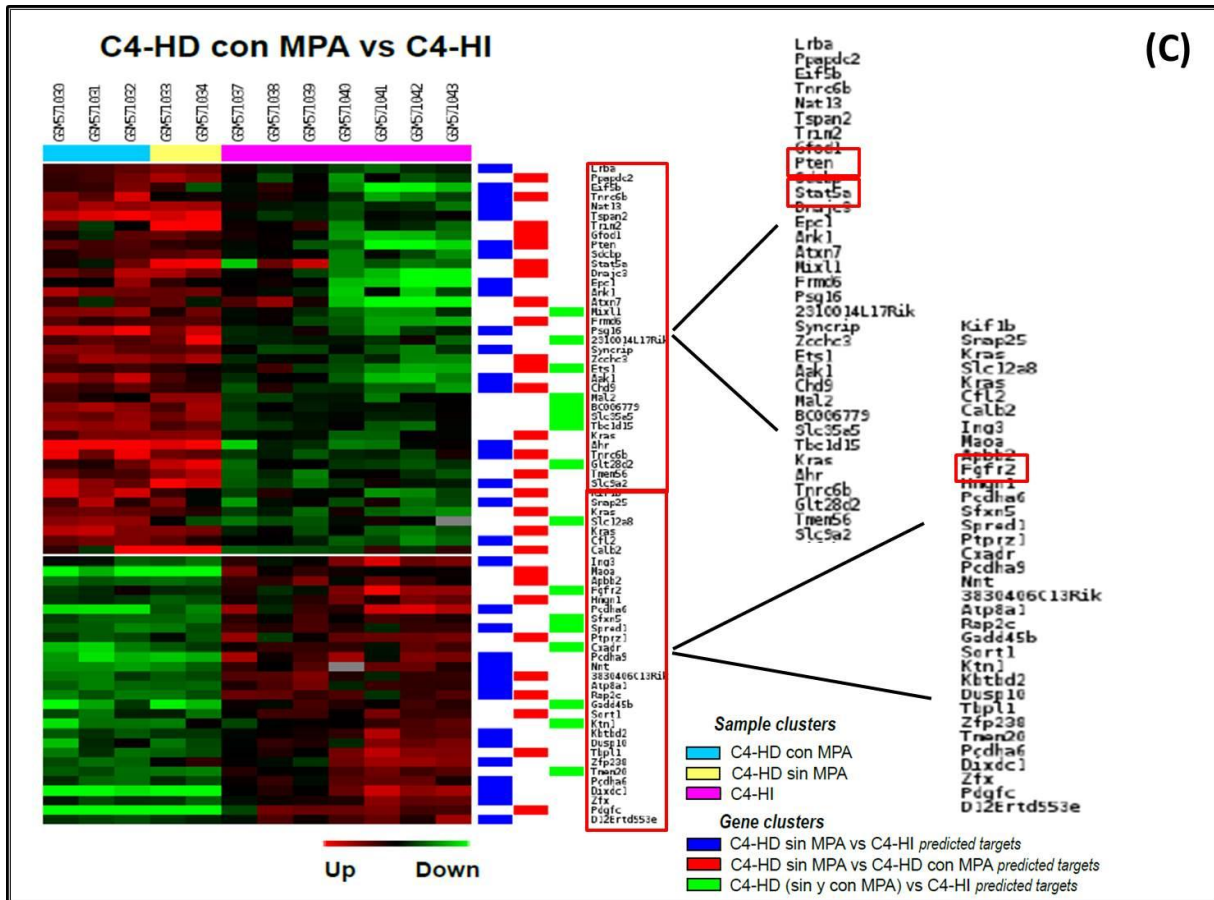


Figura 4-3. Mapas de color de genes regulados diferencialmente en variantes tumorales C4. En estos mapas de color se muestra el nivel de expresión de los genes mencionados a la derecha de cada mapa, en los grupos de tumores evaluados en el *array* de expresión (Giulianelli et al. 2011). La lista de genes en (A) proviene de la comparación entre C4-HD con MPA vs C4-HD sin MPA, en (B) de la comparación entre C4-HD sin MPA y C4-HI y en (C) de la comparación entre C4-HD con MPA y C4-HI. Las columnas azules, verdes y rojas indican el arreglo de esos genes en *clusters* en las comparaciones de miRNAs mencionadas en la sección 15 (ejemplo en tabla 1 del anexo). Las barras celestes, amarillas y lilas corresponden a los grupos de tumores que se analizaron en el *array* de expresión. Los recuadros rojos en la lista ampliada de genes indican proteínas de interés.

El análisis anterior condensa la información de todos los genes potencialmente regulados por miRNAs en la familia de tumores, que están diferencialmente expresados según el *microArray* de expresión. De todos los genes evaluados, se destaca como candidato clave el FGFR-2, el cual se encuentra sobre expresado en tumores C4-HI, lo que refuerza la hipótesis de que podría ser una de las vías involucradas en la adquisición de independencia hormonal.

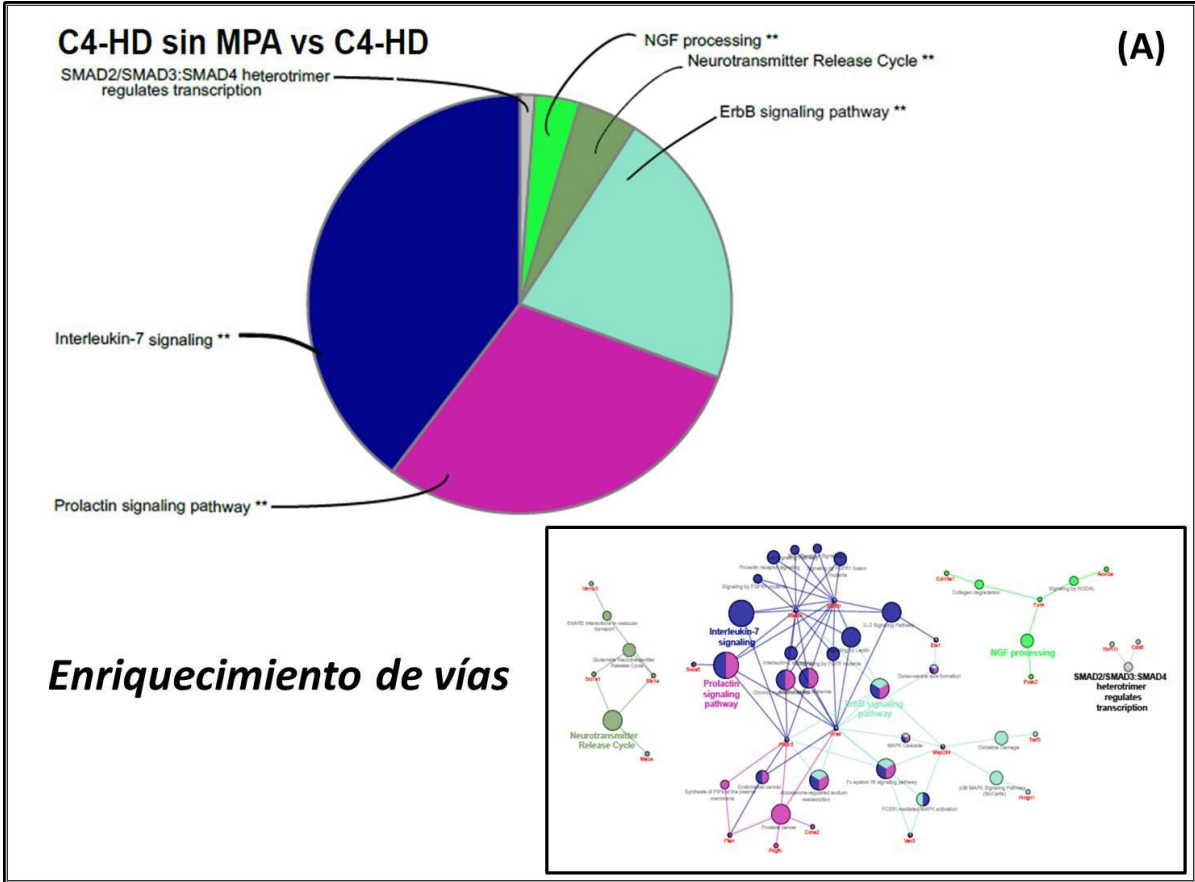
Al examinar las listas de genes y los posibles miRNAs reguladores, encontramos que el miR-674 tiene como blanco al FGFR-2, el cual es un miRNA sobre expresado en C4-HI al compararlo con C4-HD. Evidentemente existe otro mecanismo por el cual se mantiene esa sobre expresión del FGFR-2 en C4-HI.

En el análisis también se destacaron *STAT5A* y *PTEN*. *STAT5A* es un transductor de señales que se activa frente a la estimulación con diferentes citoquinas y factores de crecimiento, entre ellos el FGF2. En nuestro laboratorio ya habíamos estudiado a *STAT5* y observamos que puede formar parte de un complejo nuclear con FGFR-2 y RP, mediando la transcripción de genes regulados por progestágenos. Este resultado podría indicar que existe un mecanismo epigenético participando en dicha regulación. El miR-141 podría ser el miR involucrado en esta regulación, ya que *Stat5a* se encuentra en un clúster de genes regulados en la comparación de C4-HD con MPA vs sin MPA, y el miR-141 parece ser regulado negativamente al tratar a los tumores con MPA. Más aun, cuando se compara C4-HI con C4-HD, no hay diferencias en la expresión de miR-141, lo que podría implicar que este miRNA sigue participando en la regulación de *STAT5* en C4-HI.

Por su parte, *PTEN* es una fosfatasa involucrada en la regulación de la vía de Akt, y su función se encuentra alterada frecuentemente en tumores de mama. En el análisis del *array* encontramos a *PTEN* sobre expresado en tumores C4-HD y en un clúster de la comparación C4-HD con MPA vs sin MPA. Al evaluar los posibles miRNAs que podrían regular a *PTEN*, encontramos que tanto miR-141 como miR-29 tienen como posible blanco a *PTEN*. Lo interesante es que miR-141 se regula negativamente en C4-HD con MPA lo cual podría desreprimir a *PTEN* y explicar la sobreexpresión en C4-HD y a su vez miR-29 se sobre expresa en C4-HI lo cual podría explicar que *PTEN* se encuentre sub expresado en tumores C4-HI, aunque lo más probable es que estas moléculas sean parte de un esquema de regulación mucho más complejo.

2.3- Estudios de *Pathway Enrichment* en el modelo C4.

Luego de haber identificado posibles blancos regulados por miRNAs y diferencialmente expresados, si bien se destacaban genes estudiados extensivamente en cáncer de mama, realizamos un estudio global y no sesgado de las listas generadas en el análisis anterior utilizando el programa *Cytoscape*. Evaluamos qué vías de señalización se veían enriquecidas. Para este nuevo análisis se confeccionaron en cada comparación, listas únicas de genes blanco predichos para todos los miRNAs diferencialmente expresados, sin distinguir si estaban sobre o sub expresados. A esa lista única se la depuró y se eliminaron genes repetidos y secuencias anotadas sin función asignada utilizando las bases de datos *Gene Ontology*, *KEGG*, *Reactome* y *WikiPathways*. La **Figura 4-4** resume los resultados obtenidos.



C4-HD sin MPA vs C4-HI

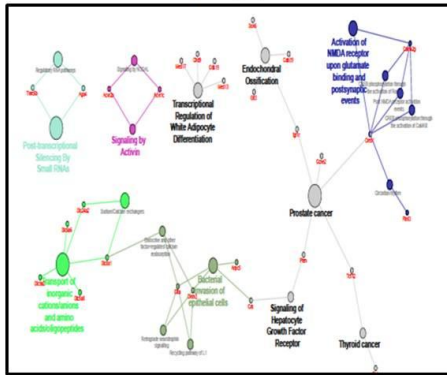
(B)

Activation of NMDA receptor upon glutamate binding and postsynaptic events .

Bacterial invasion of epithelial cells .

Signaling by Activin .

- CS/DS degradation
- Endochondral Ossification
- Signaling of Hepatocyte Growth Factor Receptor
- One Carbon Metabolism
- Prostate cancer
- Thyroid cancer
- Neurofascin interactions
- Transcriptional Regulation of White Adipocyte Differentiation
- Sphingolipid de novo biosynthesis
- Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides *
- Post-transcriptional Silencing By Small RNAs *



Enriquecimiento de vías

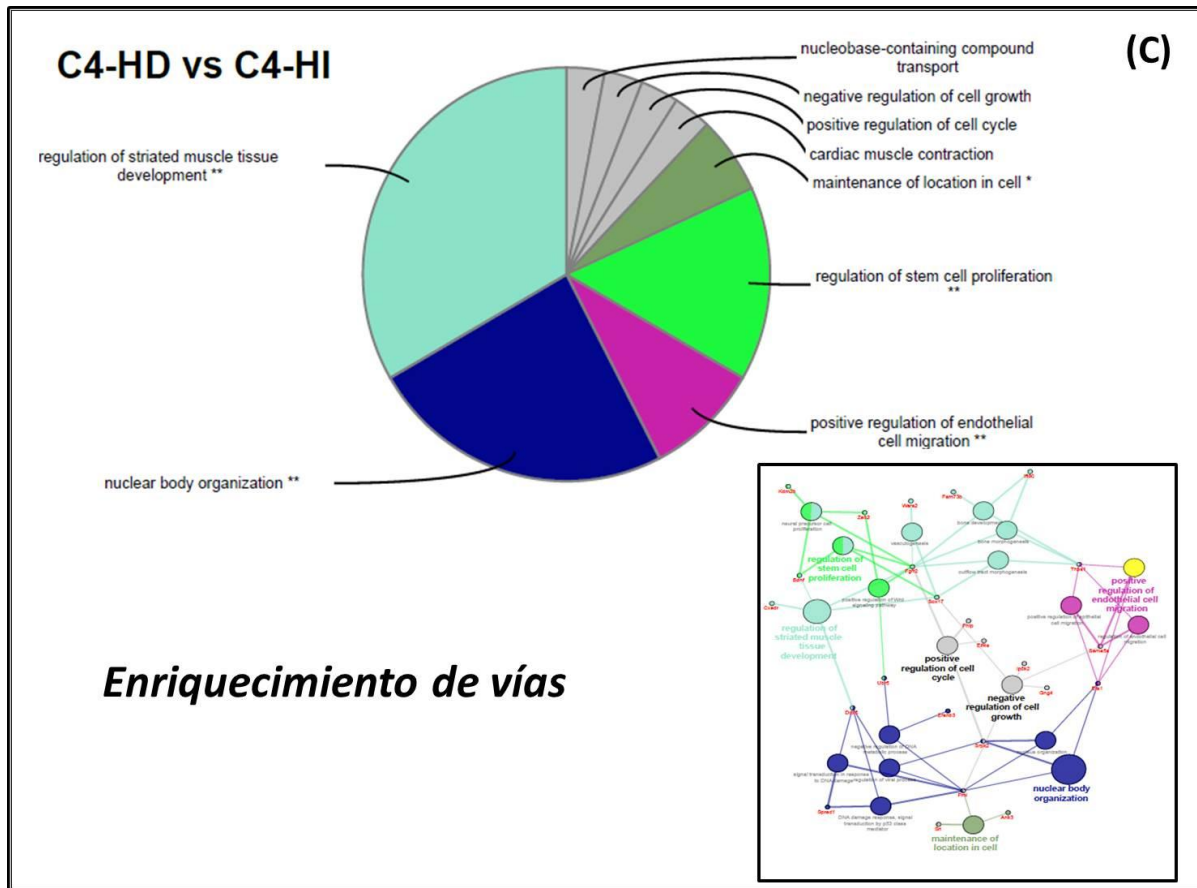


Figura 4-4. Análisis de enriquecimiento de vías en tumores de la familia C4. Se tabularon todos los posibles blancos correspondientes a los miRNAs sub o sobre expresados y se generó una lista única y sin genes repetidos para C4-HD sin MPA vs C4-HD (con MPA) **(A)**, C4-HD sin MPA vs C4-HI **(B)** y C4-HD (con MPA) vs C4-HI **(C)**. Con el *software Cytoscape* se interrogó a las bases de datos *Gene Ontology*, *KEGG*, *Reactome* y *WikiPathways* sobre los genes de las listas. En los gráficos de torta se observa qué porcentaje de genes potencialmente desregulados está vinculado con el *pathway* indicado para cada segmento. El recuadro es una representación de la red de genes y sus interrelaciones.

Al comparar C4-HD sin MPA vs C4-HD, se observó una desregulación en las vías de señalización de prolactina y ErbB. Se ha reportado que el tratamiento con MPA puede alterar la señalización de prolactina, mayormente en endometrio (Reis et al. 1999) y este análisis podría implicar a los miRNAs como posibles moléculas mediadoras de esta alteración en el modelo tumoral C4. Por otra parte, la vía de ErbB, relacionada con los genes de EGFR1 y Her2, es un tipo de señalización frecuentemente alterada en tumores mamarios.

Cuando se compara C4-HD sin MPA con C4-HI, se destaca que se ve alterada la señalización relacionada con el silenciamiento post transcripcional por ARNs pequeños, entre los cuales se encuentran los miRNAs. Este dato es interesante ya que al observar el análisis del *array* de miRNAs volcado en la **Figura 4-2**, se ve claramente que el pasaje de hormono dependencia a hormono independencia viene acompañado con la desregulación de pequeños ARNs, y esto se refleja en su conjunto como un mayor número de miRNAs diferencialmente expresados.

En el panel C de la **Figura 4-4** se observa la comparación entre C4-HD (con MPA) y C4-HI. Como se puede ver, si bien las vías más representadas no se relacionan con el cáncer de mama directamente, sí se destaca que habría una desregulación de genes implicados tanto positivamente como negativamente con la regulación del ciclo celular. Lo interesante de este hallazgo es el hecho de que los tumores HI de alguna manera se sobreponen a la necesidad de aporte exógeno al MPA, lo cual se refleja en un cambio en vías de señalización relacionadas con la progresión por el ciclo de división celular, la adquisición de fenotipos relacionados con la proliferación de células troncales y asimismo genes regulados en la migración de células endoteliales.

2.4-Expresión de miRNAs medida por *stem-loop* PCR.

A partir del análisis global de los datos, elegimos para su estudio más exhaustivo 3 miRNAs. En primera instancia, un miRNA sobresalió como candidato para la validación, el miR-1. Como se puede ver en el gráfico de regulación general, este miR es el único sobre expresado en C4-HIR respecto del C4-HI. Además, se eligieron el miR-31 (Itkin et al. 2012) y el miR-155, ya que existen evidencias que podrían estar regulados por FGF2 (Wolf et al. 2013). Más aun el miR-155 tiene como blanco al RE α .

Se realizaron extractos de tumores C4-HD con MPA, C4-HI y C4-HIR como se indicó en la sección de materiales y métodos. Se utilizaron al menos 6 tumores de cada variante. En primera instancia se analizó la expresión del miR-1. Como se puede observar en la **Figura 4-5**, si bien el *array* en su primer análisis marcaba una regulación positiva de la expresión de miR-1 en C4-HIR, no se pudo observar esa tendencia por *stem-loop* PCR, como consecuencia de la baja eficiencia de amplificación de este miRNA. Esto, sumado al hecho de que en el segundo análisis de los datos no se encontraron diferencias, apunta a que estábamos en la presencia de una amplificación espuria.

Posteriormente nos enfocamos en el análisis de la expresión del miR-31, y observamos que aumentó significativamente en los tumores C4-HI, y su expresión resultó aun mayor en los tumores resistentes a MFP que en el resto de la familia C4 (**Figura 4-5**).

Luego, al analizar el miR-155 observamos un patrón de sobre expresión que coincidía con el miR-31, con mayor expresión en el C4-HI y aún mayor en el C4-HIR.

También elegimos dos miRNAs del *array* el miR-335 que cumple funciones como anti metastásico en cáncer de mama (Negrini and Calin 2008), y el miR-222 que ha sido asociado con la resistencia a ICI (Rao et al. 2011) que se encontraban sub expresados en el tumor C4-HIR. Estos últimos dos miRNAs mostraron una alta variabilidad en las variantes tumorales por lo que no se hicieron más estudios (**Figura 4-5**).

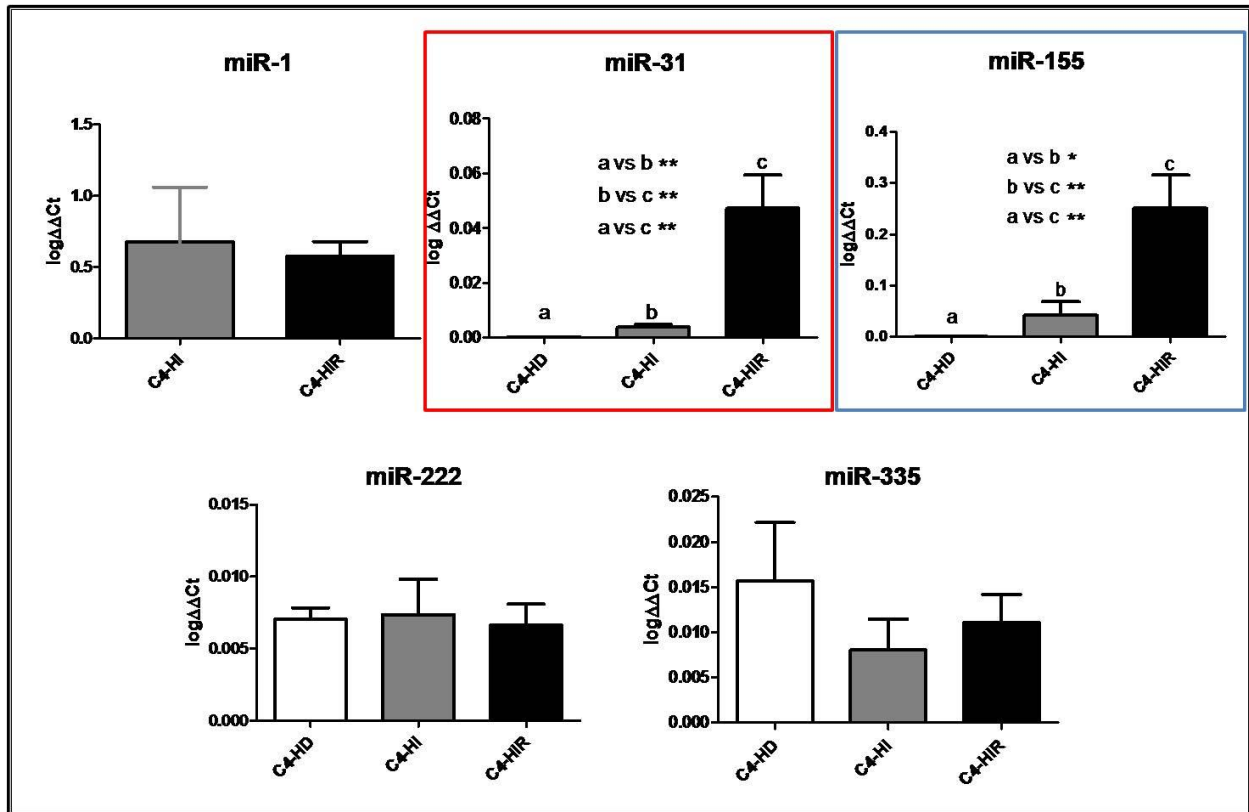


Figura 4-5. Expresión de miRNAs evaluado por *Stem-loop* PCR. Se realizaron extractos de tumores de las variantes de la familia C4, como se indica en la sección de materiales y métodos. Se utilizó el método del delta Ct para evaluar los resultados, usando tanto *U6* como *GAPDH* como genes de referencia. Se utilizaron 6 tumores por grupo. Se muestra la cuantificación de un experimento representativo de tres.

El análisis de expresión de estos miRNAs seleccionados por su rol en cáncer, si bien reflejan parcialmente los resultados obtenidos en el análisis del *array*, tienen un patrón de expresión que correlaciona con la progresión tumoral en la familia C4. Una de las aplicaciones más promisorias de estas moléculas es su utilización como marcadores. En base a los resultados obtenidos, tanto el miR-31 como el 155 podrían ser utilizados como indicadores de la progresión aunque esto debería corroborarse midiendo estas mismas moléculas en otras familias tumorales.

PARTE IV

Discusión

En esta tesis de doctorado se exploró el papel del FGF2 como activador de la vía del RE α . En antecedentes del laboratorio se había establecido que el FGF2 podría ser un factor paracrino que actuara mediando el crecimiento independiente de MPA en los tumores C4-HI (Giulianelli et al. 2008). Por otra parte, se comprobó que el FGFR-2 formaba parte de un complejo transcripcional con el RP, promoviendo la proliferación celular en células tumorales C4-HI y células de cáncer de mama humano T47D (Cerliani et al. 2011). En tercer lugar, se conoce el rol del RE α como inductor de la expresión del RP en células de cáncer de mama (Nardulli et al. 1988; Kastner et al. 1990) y en nuestro laboratorio hemos estudiado la interacción entre ambos receptores, necesaria para mediar la proliferación celular inducida por MPA (Giulianelli et al. 2012). Estos antecedentes nos llevaron a investigar si el FGF2 también era capaz de inducir la activación del RE α .

En la primera parte de esta tesis evaluamos los efectos proliferativos del FGF2 utilizando dos líneas celulares de cáncer de mama luminal, MCF-7 y T47D (Holliday and Speirs 2011). Ambas líneas celulares se estimulan con la administración exógena de E₂ o de FGF2 y este aumento de proliferación se revirtió inhibiendo la actividad o expresión del RE α .

Elegimos la línea celular MCF-7 ya que es un modelo ideal para estudiar al RE α *in vitro* e *in vivo*. Es una línea celular dependiente de E₂ para proliferar (Brooks et al. 1973), siendo entonces el modelo de referencia para el estudio del rol de los estrógenos en cáncer de mama (Brooks et al. 1973; Levenson and Jordan 1997). Por otra parte, teniendo en cuenta que la mayor parte de los estudios del laboratorio se realizaron con células T47D (Keydar et al. 1979), más dependiente de los RP, pero también estimulada por E₂, se eligió también esta línea celular para los estudios *in vitro*.

La proliferación celular se evaluó por incorporación de timidina tritiada luego de 48 horas de incubación mientras que para los experimentos de recuento celular se utilizaron incubaciones de al menos 5 días para confirmar los experimentos anteriores. Esta diferencia radica en que la incorporación de timidina es una medida indirecta del estado de proliferación celular, en cambio el conteo celular permite medir en forma directa cómo los tratamientos afectan la tasa de división, y para evidenciar el cambio en el número de células se hace necesario abarcar al menos un ciclo de división.

El ICI es un antiestrógeno puro, y su acción ha sido bien documentada tanto en ensayos clínicos como en el modelo MCF-7, en el que se observó un efecto dos veces mayor que el tamoxifeno en la inhibición del crecimiento celular (Robertson 2001). El efecto del ICI de inhibir la estimulación de la proliferación celular inducida por un factor de crecimiento ya fue observada en células MCF-7 (Ram et al. 1998; Zhang et al. 2005) o en las T47D. Por otra parte, la activación del RE α por factores proteicos como IGF-1 ha sido documentada en diversas líneas celulares, entre ellas MCF-7, y se ha demostrado además la inducción del RP mediada por activación de RE α (Aronica and Katzenellenbogen 1993; Hafner et al. 1996).

En particular, la activación de RE α por FGF2 había sido estudiada por Piotrowicz y colaboradores (Piotrowicz et al. 2001). En su trabajo, los autores observaron que la incubación con una isoforma de 24 kDa del FGF2 de células murinas 3T3 transfectadas con el RE α era capaz de activar al receptor y en ensayos de genes reporteros con luciferasa bajo el control de secuencias ERE en células MCF-7, encontraron que el RE α era activado por FGF2, mientras que el tratamiento con ICI en concentraciones de 1-10 nM era capaz de revertir dicha activación. En trabajos relacionados, los mismos autores demuestran que las isoformas de alto peso molecular de FGF2 son capaces de estimular la proliferación de células MCF-7 (Piotrowicz et al. 2001), aunque no evalúan el rol que el RE α tiene como mediador de esta respuesta. En el trabajo anteriormente mencionado, sugieren que la transactivación estaría mediada por el FGFR-1. A diferencia de este grupo, nosotros utilizamos específicamente la isoforma de FGF2 de 18 kDa que estimuló la proliferación tanto en MCF-7 como en T47D, de manera RE α dependiente, dado que el efecto fue bloqueado con ICI en concentraciones similares a las utilizadas en los trabajos mencionados. Los efectos específicos de las distintas isoformas de FGF2 en estos modelos es un tema que aborda actualmente el grupo de la Dra. C Lamb en nuestro laboratorio.

Para demostrar que el efecto observado era específico del RE α , silenciamos la expresión de este receptor. Utilizamos dos siRNAs diferentes contra el gen del RE α , de síntesis comercial, que han sido utilizados para demostrar efectos dependientes del RE α en otros mecanismos de señalización en MCF-7 (Mauro et al. 2014) y en T47D por MPA (Giulianelli et al. 2012). Ambos siRNAs tienen como blanco las variantes del transcripto del gen *ESR1* que codifica para el RE α , pero su secuencia es diferente y esto permite asegurar la especificidad del efecto observado.

Al utilizar estos siRNAs, con la consecuente disminución en la expresión del RE α , observamos que en MCF-7 se pierde la respuesta a FGF2, indicando que el RE α está involucrado en el mecanismo por el cual el FGF2 induce proliferación celular en dicha línea. En las células T47D, si bien ambos siRNAs regulan negativamente la expresión del RE α , parecerían tener un menor efecto de bloquear la estimulación inducida por FGF2 como se observó en las células MCF-7. Esto se ve reflejado también si comparamos los efectos que tuvo el ICI en las dos líneas. En MCF-7 0.1 μ M ICI ya inhibía por completo la estimulación de proliferación celular que induce el FGF2 mientras que en T47D es parcial la inhibición (ver Figuras 3-1 y 3-3). Esta diferencia en el rol del RE α en ambas líneas podría deberse a que en T47D el RP es el receptor hormonal más relevante en sus respuestas proliferativas y como hemos demostrado anteriormente en el laboratorio, el FGF2 promueve la formación de un complejo transcripcionalmente activo, con RP como factor de transcripción principal (Cerliani et al. 2011).

Se ha reportado que el FGF2 podría tener efectos independientes de sus receptores canónicos, por ejemplo uniéndose a integrinas estimulando la adhesión de células endoteliales (Murakami et al. 2008). Para corroborar que eran necesarios los FGFRs en este mecanismo, se utilizaron inhibidores de FGFRs. El PD173074 es un inhibidor desarrollado por Pfizer, y ha sido utilizado para estudios de inhibición de FGFRs en diversos modelos y patologías. Fue desarrollado como inhibidor del FGFR-1 y posee gran afinidad por éste [IC₅₀ de 25 nM (Mohammadi et al. 1998)] aunque también se ha demostrado que inhibe al FGFR-2 (Pardo et al. 2009) y al FGFR-3 (Trudel et al. 2004). La desventaja de este inhibidor es que además de tener como blanco a los FGFRs, también puede inhibir a otros receptores, como por ejemplo el VEGFR2, como demostró el trabajo de Mohammadi y colaboradores. Por otro lado, el BGJ398 a diferencia del PD173074, es un inhibidor específico de los FGFRs, en particular para FGFR-1, 2 y 3, teniendo un IC₅₀ 40 veces menor que para FGFR-4 y VEGFR2 (Guagnano et al. 2011), lo que lo hace una mejor herramienta para nuestro estudio. En trabajos previos en los que demostramos la interacción entre FGFR-2, RP y STAT5, ya habíamos utilizado el PD173074 en concentraciones de 100 nM (Cerliani et al. 2011), las mismas utilizadas en el trabajo de Pardo y colaboradores donde se utilizó para inhibir tanto a FGFR-1 como FGFR-2 (Pardo et al. 2009). En cuanto al BGJ398, fue utilizado en concentración un orden de magnitud por encima del IC₅₀ reportado, para poner en evidencia el efecto de la inhibición de los FGFRs, pero por debajo del IC₅₀ para VEGFR2.

Ambos inhibidores bloquearon la estimulación de la proliferación por FGF2, demostrando que los FGFRs estarían implicados en el mecanismo, y confirmando una vez más la interacción entre ambas vías. Encontramos que en MCF-7 no hubo diferencias significativas entre el PD y el BGJ, aunque sí en T47D, línea en la cual el BGJ mostró mayor eficacia, lo cual podría deberse a que en esta última el FGFR-2 juega un papel más importante en la respuesta a FGF2, y que en MCF-7 podría ser más preponderante la participación del FGFR1. Asimismo en la línea T47D, BGJ podría estar también bloqueando la acción proliferativa inducida por los RP que sabemos está mediada por el FGFR-2. Es en este punto en que decidimos evaluar la activación del RE α por FGF2 en relación a este mecanismo.

El RE α existe como un monómero asociado a proteínas chaperonas en el citosol, aunque está en continuo *shuttling* a través de la membrana nuclear. Al unirse a su ligando, transloca al núcleo y luego de dimerizar ejerce su función como factor de transcripción (Anbalagan and Rowan 2015). Existen numerosas modificaciones postraduccionales que sufre luego de su activación, siendo las fosforilaciones en serinas las más estudiadas, de las cuales 14 son las más relevantes (Le Romancer et al. 2011). En particular, las serinas 102, 104, 106, 112, 118 y 167 han sido extensivamente caracterizadas. Entre estas, la serina 118 es el sitio de fosforilación más estudiado del receptor. Ha sido relacionada predominantemente con la activación por la vía de las MAPK (Shah and Rowan 2005; Cheng et al. 2007) y algunos autores proponen a esta fosforilación como marcador pronóstico de respuesta a tamoxifeno (Kok et al. 2009). Por su parte la fosforilación de la serina 167 por la vía de PI3K/Akt se sabe que aumenta la interacción del RE α con el ADN y su interacción con el coactivador SRC-3 (Likhite et al. 2006). Asimismo el grupo de Yamashita y colaboradores asociaron a las serina 167 con un mejor respuesta a la terapia endocrina (Yamashita et al. 2005).

Habíamos comprobado que el RE α estaba involucrado en la respuesta proliferativa a FGF2, y que dependiendo del modelo variaba el grado de participación del mismo. Al evaluar por WB el estado de fosforilación del RE α de las células tratadas con FGF2, vimos que en el curso de una hora de tratamiento, la fosforilación en ambas serinas se alcanza a los 5 minutos, y al menos durante los primeros 30 minutos de tratamiento en la mayoría de los casos se mantiene, indicando indirectamente una activación mediada por el factor de crecimiento. Como control evaluamos la activación de MAPK y Akt quienes, como ya demostramos en el trabajo anterior de Cerliani y colaboradores, se activan por FGF2 a igual que STAT5. Al medir la fosforilación de las quinasas de la vía de MAPK y PI3K/Akt, vemos

que aumenta la fosforilación de ambas vías mencionadas, con una cinética de fosforilación similar a la de las serinas del RE α en concordancia con lo observado por Garmy-Susini y colaboradores en células endoteliales (Garmy-Susini et al. 2004). Como se observa en la **Figura 3-4**, la fosforilación de las serinas estudiadas decae a lo largo del tiempo, en algunos casos en el término de una hora. La dinámica de defosforilación no se encuentra del todo esclarecida, aunque existen evidencias indirectas: por ejemplo, el ácido okadaico es un inhibidor de serina treonina quinasas, y ha sido reportado que es capaz de estimular la transcripción mediada por RE α pero se desconocían las fosfatasas específicas responsables de esta estimulación (Power et al. 1991). Hace unos 10 años, se identificó la fosfatasa PP2A como responsable de la defosforilación del RE α , en particular para el sitio de la serina 118 (Lu et al. 2003). Además, se sabe que el mecanismo de regulación de la activación del RE α por esta fosfatasa es dual, dado que se sabe que también regula la estabilidad de mRNA del receptor, modificando la tasa de degradación del mismo (Keen et al. 2005). Una segunda fosfatasa, PP5, ha sido estudiada en el modelo MCF-7, y los autores del trabajo encontraron que podría ser otro candidato por el cual el RE α pierde su fosforilación en serina 118 (Ikeda et al. 2004).

Habiendo identificado quinasas activadas que podrían estar involucradas en la fosforilación de RE α , decidimos evaluar si el FGF2 estimulaba la transcripción de genes inducidos por estrógenos. Los genes respondedores a E₂ lo hacen a través de los elementos de respuesta a estrógenos, o sitios ERE, una secuencia consenso a la cual se recluta el RE α una vez inducido y media la activación de la transcripción (Klinge 2001). Su secuencia mínima fue identificada como un palíndromo perfecto de 13 pares de bases, con 3 bases espaciadoras variables, cuya secuencia es 5'GGTCAnnnTGACC3' (Klein-Hitpass et al. 1988). Estas 3 bases generan variantes, y esto modifica la afinidad del RE α por el ERE (Gruber et al. 2004). Se sabe además que las dos bases que flanquean la secuencia mínima pueden ser determinantes de la afinidad por ese sitio (Driscoll et al. 1998) y que las isoformas del RE difieren en su afinidad por las secuencias, no sólo por el ERE en sí mismo, sino también por la diferencia en su región N-terminal (Stack et al. 1988).

Para confirmar que la fosforilación del RE α por FGF2 determinaba la activación de éste, realizamos un ensayo de gen reportero con una construcción de luciferasa bajo la regulación de secuencias ERE. Otros autores habían estudiado la inducción de genes reporteros regulados por EREs ante estímulos con factores como SDF1 (Sauvé et al. 2009) o prolactina (González et al. 2009). En

nuestro trabajo observamos que el FGF2 indujo la expresión de luciferasa en ambas líneas celulares evaluadas, lo cual confirmaba que el RE α era capaz que reclutarse a un sitio canónico y promover la transcripción. Interesantemente el efecto de inducción fue revertido tanto con ICI como con PD, una vez más apuntando al rol fundamental que juega el RE α en este mecanismo de inducción ligando independiente. El grupo de Piotrowicz y colaboradores, al cual ya hemos mencionado, obtuvieron inducciones de hasta 5 a 6 veces de un gen reportero regulado por ERE, en células 3T3 estimuladas con una concentración 5 veces menor que la que nosotros utilizamos (Piotrowicz et al. 2001). De todas maneras, el efecto que ellos obtienen se lo atribuyen al FGFR-1 el cual posee una mayor afinidad por FGF2 que el FGFR-2, lo cual podría explicar las diferencias además de utilizar transfecciones de RE α ya que las células 3T3 no expresan receptores hormonales.

No obstante, las pruebas anteriores hacían evidente que el RE α era capaz de unirse a su elemento de respuesta en presencia de FGF2, pero todavía no esclarecía si este mecanismo de hecho activaba genes endógenos en ambas líneas celulares. Para contestar esta pregunta, evaluamos la expresión de genes endógenos que se sabe están regulados por el RE α .

El gen *c-MYC* es un factor de transcripción clave en la regulación del ciclo celular. El tratamiento con estradiol aumenta la expresión de dicho gen en líneas celulares como MCF-7 (Doisneau-Sixou et al. 2003). Por otro lado, *pS2* también conocido como *TFF1*, es un gen que fue identificado por su expresión diferencial en células tratadas con E₂ (Jakowlew et al. 1984). Si bien es un gen cuya función aún no está esclarecida, se lo considera un supresor tumoral dado que se encuentra alterado frecuentemente en tumores gástricos, por mecanismos de silenciamiento postraduccionales (Song 2013). Aun así, es un gen típicamente estudiado como *output* de una activación mediada por E₂ y su señalización. Teniendo en cuenta estos antecedentes, analizamos en los modelos T47D y MCF-7 la respuesta de estos genes ante el tratamiento con FGF2. En ambas líneas celulares, encontramos que el factor fue capaz de aumentar la expresión de ambos genes, obteniendo nuevamente la inhibición con ICI, poniendo en evidencia que el RE α era necesario como efector de este aumento en la transcripción de los genes estudiados. En estos experimentos ya conociendo la mayor sensibilidad de las células MCF-7 al ICI que las T47D, se usó para estas últimas una concentración de ICI un orden de magnitud mayor para obtener una respuesta similar a las MCF-7 (ver Figuras 3-1 y 3-5).

Los factores pioneros son proteínas que fueron identificadas por su capacidad de interactuar con la cromatina condensada y separarla, permitiendo el acceso de factores de transcripción (Cirillo et al. 2002). En cáncer de mama, se ha descrito que FOXA1 es un factor pionero que se encuentra en el 50% de los sitios posibles a los que se puede unir el RE α (Carroll et al. 2005).

En esta instancia decidimos medir el reclutamiento de FOXA1 al promotor proximal de *pS2*, el cual contiene dos EREs. Al medir la ocupación de FOXA1 en esta región observamos un aumento de FOXA1 al tratar con FGF2. Es interesante destacar que en ambos modelos es menor la proporción de FOXA1 que la de ER α . Este resultado demuestra que FOXA1 podría estar mediando la interacción del RE α con su elemento de respuesta. Sería interesante evaluar cómo la depleción de FOXA1 interfiere con el mecanismo de activación ligando independiente mediado por FGF2 en ambos modelos, dado que se sabe que FOXA1 es requerido para la unión de RE α al ADN en más del 90 % de los sitios ERE en células MCF-7 (Hurtado et al. 2011). Si comparamos las respuestas de ambas líneas, la proporción de ER α a FOXA 1 es similar en ambas líneas, siendo en T47D más conspicua la respuesta. Lo que no podemos descartar en este punto, es que las diferencias entre las proporciones de FOXA1/RE α observadas se deban a cinéticas de reclutamiento diferente, y si hubiéramos analizado un tiempo más temprano las proporciones podrían estar invertidas.

En el laboratorio como ya se mencionó, hemos estudiado al FGFR-2 en trabajos anteriores, y demostramos que puede formar un complejo transcripcional con el RP y STAT5 e inducir genes como *c-MYC*, haciendo a este receptor un buen candidato como blanco terapéutico (Cerliani et al. 2011). Además, demostramos que el RE α debe asociarse al RP para mediar efectos proliferativos inducidos por progestágenos (Giulianelli et al. 2012). Para continuar estudiando el rol del FGFR-2 en estos complejos y en relación a la vía del RE α , desarrollamos una línea transfectada establemente con una versión mutante del FGFR-2, la cual provocaba la dimerización constitutiva y consecuente activación de la vía (Robertson 1998). Utilizamos la línea MCF-7 dado que el foco era estudiar cómo el FGF2 podía activar al RE α en ausencia del ligando canónico, la cual denominamos R2CA. Previamente habíamos desarrollado un modelo similar en células T47D, transfectadas con la misma variante mutante del FGFR-2. En este último modelo, se observó que al tener la vía del FGFR-2 activada, las células eran capaces de establecerse como xenotransplantes, y crecer sin el aporte de hormonas exógenas en ratones

inmunosuprimidos. Además, proliferaban más que las células control, y mostraban una respuesta tanto a antiprogéstágenos como a inhibidores de FGFRs como el PD173074 (Cerliani et al. 2011).

Con estos antecedentes, desarrollamos la línea MCF-7 R2CA y en primera instancia evaluamos la activación de las vías de quinasas río abajo de los FGFRs. Al medir su fosforilación, se observó que estas células tenían la vía de MAPK activada. Curiosamente no observamos cambios en la vía de Akt en las condiciones experimentales utilizadas. Este dato contrastaba con lo observado en las MCF-7 wt tratadas con FGF2, en las cuales se activaba la vía de Akt. La discrepancia podría radicar en que si bien el FGF2 puede unirse al FGFR-2, también se une a los demás receptores de FGF (Ornitz et al. 1996) y esto podría contribuir a una respuesta diferencial en cuanto a la activación de quinasas río abajo. Además, el mecanismo de activación de los FGFRs implica una dimerización luego de la unión al ligando, y esto puede ser homo o heterogénea, lo cual podría diferir con la línea R2CA en la cual se produce la homo dimerización específicamente del receptor mutado, dando una respuesta más específica. Estos resultados apuntan claramente la necesidad de plantear experimentos investigando si la cotransfección con FGFR1 activado permitirían imitar el papel del FGF2 de aumentar la fosforilación de Akt y Erks.

Habiendo encontrado que la mutación activaba preferencialmente a la vía de las Erks, medimos la fosforilación del RE α en la serina 118, que como habíamos mencionado, se fosforila preferencialmente por estas quinasas (Shah and Rowan 2005; Cheng et al. 2007). Si bien se observó un incremento de la marca de pRE α en las células R2CA comparadas con el wt, al relativizar por RE α total se evidenció que aumentó el número de RE α total por lo que no se observan mayores sitios fosforilados por molécula de RE α . Sin embargo por inmunofluorescencia se observa un claro aumento de marca para pRE α . La relevancia de este dato es discutible, pero lo cierto es que cada célula va a tener un número absoluto mayor de pRE α que las células wt lo que redundaría en un aumento de activación de genes regulados por RE α como por ejemplo el RP (Fazzari et al. 2001) o el *pS2*.

No sólo se observó un aumento de RP basal sino también en la fosforilación de la serina 190 de dicho receptor. Si bien este residuo se encuentra basalmente fosforilado (Hagan et al. 2012), la fosforilación del mismo aumenta al activarse el RP, y estudios con mutantes para esa serina indicarían que tienen la capacidad de dimerizar con RP wt y unirse al ADN, lo cual podría indicar que la fosforilación de ese sitio contribuiría al reclutamiento de co-factores a complejos transcripcionales que contienen al RP (Takimoto et al. 1996). Estos resultados están de acuerdo con los publicados en el

trabajo anterior de nuestro grupo en el cual mostramos que FGF2 a través del FGFR-2 podría mediar la activación del RP (Cerliani et al. 2011).

Es interesante destacar que así como sucedía con las células T47D R2CA, las MCF-7 R2CA poseen basalmente una tasa de proliferación mayor que las células control, y esto no resulta sorprendente dado que la vía de las MAPK se encuentra activada como consecuencia de la sobre expresión del FGFR-2 mutante, y se sabe que esta vía está implicada en proliferación celular (Zhang and Liu 2002; Meloche and Pouyssegur 2007). Las R2CA respondieron diferente a los estímulos que las células control, siendo insensibles a la estimulación por FGF2 y E₂ (en contraste con las T47D R2CA, las cuales respondían a FGF2)(Cerliani et al. 2011). Creemos que esta falta de respuesta se debe a un sistema saturado por la inducción constante como consecuencia de la activación constitutiva del FGFR-2. Fue interesante encontrar una inhibición en la proliferación ante el tratamiento con el antiestrógeno ICI y el antiprogéstágeno MFP, aportando a la hipótesis de la interacción entre las vías de FGFRs y los receptores hormonales. Nos parece importante remarcar que las concentraciones utilizadas de MFP fueron del orden de 10 nM, para garantizar su actividad como antiprogéstágeno, dado que en concentraciones mayores podría actuar como antiglucocorticoide (Sun et al. 2013). Estos resultados son interesantes porque muestran que aun en la línea MCF-7 que depende más del ER α que del PR para proliferar, el bloqueo del RP también afecta a la proliferación mostrando la interrelación de ambos receptores aún en la proliferación ligando independiente.

En relación con la activación basal del RP, el resultado indicaría que este receptor podría formar parte del mecanismo por el cual el modelo R2CA mantiene una tasa de proliferación mayor que el control, aunque nuevamente no podemos descartar que esto sea solo una consecuencia más de la activación de la vía de RE α . Como hemos demostrado en trabajos previos, el FGFR-2 puede estar involucrado en la activación del RP (Cerliani et al. 2011), y si bien en este modelo demostramos la activación del RE α por la variante constitutivamente activada del FGFR-2, también se observó que las células R2CA tienen sobre activación de la vía de las MAPKs, y tanto el RE α como el RP son sensibles a la fosforilación por estas quinasas (Cheng et al. 2007; Hagan et al. 2012), por lo tanto no se puede descartar una activación del RP independiente de RE α . Nos faltó evaluar si en las células estimuladas con FGF2 o en las R2CA existe también una interacción nuclear entre el ER α y el RP tal como se ha observado en la estimulación por progestágenos.

Analizamos también el crecimiento en xenoinjertos de las células MCF-7 R2CA y encontramos que en ausencia del aporte exógeno de hormonas, si bien son capaces de establecerse, la activación del FGFR-2 no es sustento suficiente para un crecimiento independiente de hormonas, ya que observamos que los tamaños tumorales se estancan luego de una primera etapa de crecimiento exponencial. En esta instancia, continúan siendo dependientes de hormonas, con un crecimiento comparable al de las células control. Más aun, los tumores R2CA son sensibles a antiestrógenos y antiprogéstágenos, indicando que el RP podría tener un papel relevante en el crecimiento de los tumores R2CA. Nuevamente su comportamiento se asimila al modelo T47D R2CA, el cual también logra establecerse como xenoinjerto pero su crecimiento se detiene luego de una primera instancia de aumento de tamaño.

El análisis histopatológico de los tumores reveló que los R2CA poseían un grado histológico ligeramente mayor que el control, y esto puede estar relacionado a un fenotipo más indiferenciado y un tumor más invasivo (Elston and Ellis 2002). Los FGFRs han sido vinculados con un fenotipo más indiferenciado en cáncer de mama y esto podría explicar cómo la activación del FGFR-2 resulta en un tumor de mayor grado histológico (Sharpe et al. 2011; Fearon et al. 2013). Lo que se destaca es que al suplementar el crecimiento con E_2 , el tumor R2CA se vuelve indistinguible del tumor control. Si bien no podemos explicar por qué esto sucede, podría estar relacionado con genes preferentemente activados por el $RE\alpha$ en presencia del ligando y otros activados por el $RE\alpha$ activado en forma ligando independiente. Ante la presencia del ligando natural predominarían los primeros.

Luego de eutanasiar los animales, medimos la expresión del FGFR-2 en las muestras de tumores. Como era esperable, los tumores continuaron sobre expresando el R2CA, como se observó por inmunohistoquímica. Por lo tanto, si bien la activación del FGFR-2 no confiere hormono independencia completa, el transgen no se pierde al menos durante la duración del experimento y esto podría sugerir que sigue siendo relevante en el crecimiento tumoral. Además, la inducción del RP en este modelo se mantuvo en los xenoinjertos. Si bien no se puede descartar que se deba a hormonas circundantes, creemos que se debe al mecanismo descrito en el modelo *in vitro*, en el que la activación indirecta del $RE\alpha$ lleva a la expresión de RP. En concordancia con esto, también observamos que se expresa tanto RP como $RE\alpha$ en las MCF-7 suplementadas con E_2 .

Con las evidencias anteriores, tanto en las líneas MCF-7 y T47D como en el modelo R2CA, comprobamos que el FGF2 podría, a través del FGFR-2 activar indirectamente al RE α por fosforilaciones en serinas clave, e inducir la expresión de genes relacionados con esta vía, como *pS2* y *c-MYC*. Ya sea como consecuencia de esta activación o como posible factor involucrado en todo el mecanismo descrito, el RP resultó inducido tanto *in vivo* como *in vitro*, y podría jugar un rol en la expresión de genes, dado que no podemos descartar que *c-MYC* fuera regulado también por el RP (Musgrove et al. 1991). Aunque estaba claro que RE α era reclutado a los elementos de respuesta en el promotor proximal de *pS2*, y su interacción era facilitada por FOXA1, factor clave en la transcripción de genes mediada por RE α , el mecanismo de activación, al menos en R2CA parecería ser más dependiente de MAPK, dado que no vimos un aumento de la fosforilación de Akt. Aun así, deberíamos evaluar el estado de pS6 en este modelo, una quinasa río debajo de Akt (Tannous and Teng 2011). En estudios recientes Yanai y colaboradores, asociaron una alta expresión de pS6 con tumores de alto grado nuclear y bajo grado de expresión de RP, lo que contrasta con la línea R2CA, y esto podría argumentar a favor de la falta de activación de la vía de Akt (Yanai et al. 2014).

Los resultados obtenidos en líneas celulares humanas se trataron de reproducir utilizando el modelo murino C4-HD/C4-HI. Los tumores C4-HI como ya se mencionó, poseen un crecimiento dependiente del RP y en trabajos previos del laboratorio se identificó al FGF2 como un factor paracrino que podría estar sustentando el comportamiento HI (Giulianelli et al. 2008). Lo interesante de este tumor es que posee una activación basal del RE α , como se muestra en la **Figura 3-18** y que anteriormente había evaluado el Dr. Giulianelli en su tesis doctoral. Mientras que en el tumor parental (C4-HD) se observó un aumento en la fosforilación de RE α en respuesta al tratamiento con FGF2, una respuesta que había sido documentada con el tratamiento con MPA (Giulianelli et al. 2012).

Como antecedente, ya conocíamos que el tumor C4-HI disminuía su crecimiento en respuesta a uno de los inhibidores de FGFR, el PD (Giulianelli et al. 2008). En este trabajo de Tesis utilizamos además el BGJ e investigamos en ambos casos la expresión de RE α . Al tratar el tumor con ambos inhibidores de FGFRs, observamos una respuesta parcial, con un efecto de disminución de la tasa de crecimiento de los tumores tratados en comparación a los no tratados. Cuando analizamos la expresión de pRE α en los tumores C4-HI, encontramos que el tratamiento con BGJ o PD disminuía la activación de RE α . Por otro lado, el tratamiento no revertía el crecimiento tumoral, indicando que al menos en este modelo, el

crecimiento hormono independiente no solo dependería de la activación del RE α por FGF2, sino que podría ser el resultado de la activación de más de una vía, como por ejemplo la vía del RP, como ya se mencionó. Por otra parte, cuando se trataron los tumores con Fulvestrant, inhibieron su crecimiento, con una respuesta más importante que la obtenida con BGJ pero menos importante a la obtenida con MFP donde los tumores regresionan casi totalmente (Wargon et al. 2009). Teniendo en cuenta ambos resultados, parecería que en C4-HI, la activación ligando independiente del RE podría ser desencadenante del crecimiento HI, sin embargo otras vías de señalización del FGF2 podrían suplir al RE activado, no así al RP activado, y participar del crecimiento tumoral.

En la segunda sección de esta tesis, abordamos el estudio de los miRNAs, moléculas pequeñas involucradas en la regulación postranscripcional de genes. El laboratorio desarrolló interés por estos mecanismos al observar que tumores resistentes a MFP, C4-HIR, obtenidos por presión selectiva con el antiprogéstágeno, poseían un cociente de isoformas del RP donde prevalecía RPB cuando eran resistentes y con mayor expresión relativa de RPA cuando eran sensibles (Wargon et al. 2009). Estos tumores, al ser cultivados *in vitro*, revertían el cociente de isoformas a un fenotipo RPA, resultando ahora sensibles al tratamiento con MFP. Además, si estos mismos cultivos eran reimplantados en ratones BALB/c, resultaban nuevamente resistentes a MFP, con el consiguiente aumento de la isoforma B del RP. Esto nos llevó a proponer la existencia de mecanismos de regulación epigenética que podría estar mediando dichos cambios en el perfil de isoformas de RP. En un principio se estudiaron modificación por metilación en el promotor de RP (Wargon et al. 2011) y luego se comenzó el estudio de los miRNAs. Conjuntamente con esto, ya habíamos estudiado el transcriptoma de las variantes HD y HI de la familia, y esto nos daba la oportunidad de identificar a gran escala grupos de genes que podrían estar regulados por miRNAs en estos tumores. Por otra parte, es indudable que el FGF2 juega un rol importante en la adquisición de la hormono independencia por lo tanto el estudio de miRNAs expresados en forma diferencial en los distintos tipos de tumores nos podía brindar herramientas para el estudio de mecanismos moleculares noveles involucrados en el redireccionamiento de genes que conducen al crecimiento tumoral hormono independiente.

Se realizó un *array* de miRNAs que media la expresión de 375 miRNAs conocidos en ese momento, y se analizaron los cambios de expresión en estas moléculas, para todas las familias de tumores ensayadas. Habiendo obtenido un perfil preliminar, el mayor desafío fue reducir el volumen de

información y centrarnos en los candidatos más interesantes para continuar los estudios. En este punto, ajustamos los parámetros del análisis, y encontramos que al inquirir los datos en un marco más astringente, el perfil de miRNAs desregulados cambiaba notablemente, aunque algunos candidatos no se modificaban.

Con el perfil de miRNAs de cada comparación de tumores, generamos listas únicas de genes potencialmente regulados por miRNAs diferencialmente expresados en las variantes tumorales de la familia C4. Nos enfocamos solo en los genes de las listas que estuvieran diferencialmente expresados en el transcriptoma de alguno de los tumores, para luego corroborar si los genes sobre expresados en alguna variante tumoral se correspondían con una disminución en un miRNA que los pudiera tener como blanco posible. Cabe destacar que en este análisis dejamos de lado el grupo de tumores C4-HIR, dado que carecíamos de datos acerca de su transcriptoma. De este análisis surgieron algunos candidatos interesantes. Por un lado, el FGFR-2 se encontraba sobre expresado en tumores C4-HI, dato que ya conocíamos. Este gen además se encontraba en un *cluster* asociado a la comparación C4-HD vs C4-HI, por lo tanto era factible que un miRNA sub expresado en C4-HI tuviera como blanco a este gen. Hasta el momento encontramos que el único miR diferencialmente expresado que podría tener como blanco a FGFR-2 era el 674 que se encuentra sobre expresado en C4-HI según las listas mencionadas anteriormente. Estudiando con mayor detalle encontramos que Spred-1 podría estar regulado por miR-31, un miR que demostramos que se sobre expresa en C4-HI. Esta proteína es relevante ya que es parte de la familia de represores de FRS2 y Ras, dos proteínas directamente relacionadas con la señalización por FGFRs (Sharma et al. 2014).

Que un gen sea predicho por un algoritmo no implica su regulación por miRNAs. En este caso, parecería que el FGFR-2 no está sujeto a regulación por miRNAs, pero encontramos un mecanismo que podría contribuir a una mayor señalización por FGFRs en los tumores con independencia hormonal.

Encontramos además que *PTEN* se encuentra sub expresado en C4-HI y coincide con un *cluster* de genes potencialmente desregulados en C4-HI. *PTEN* es un gen de relevancia en cáncer de mama no solo porque es el supresor tumoral más frecuentemente mutado en cáncer (Kechagioglou and Papi 2014) sino también porque es la fosfatasa que regula la defosforilación de el fosfatidil inositol trifosfato, que es la molécula que media la activación de la quinasa Akt (Tamura et al. 1999). Se ha propuesto que la haploinsuficiencia de este gen además podría tener un rol en la señalización por MAPKs (Chu and

Tarnawski 2004). Como ya demostramos, la vía de Akt estaría implicada en la activación de RE α por FGF2. De los miRNAs desregulados, el miR-29 tiene como target posible a PTEN, y podría ser que el FGF2 regule positivamente la expresión de este miRNA y a través de este mecanismo disminuya la expresión de PTEN, incrementando la activación de PI3K/Akt. Queda pendiente la validación de este miRNA en nuestro modelo experimental.

Otro factor de interés para el laboratorio es el STAT5. Es un transductor de señales que puede mediar la transcripción de genes, se encuentra activado frecuentemente en diversos tipos de cáncer (Ferbeyre and Moriggl 2011), y es activado por fosforilaciones en residuos específicos, mediada por receptores de tipo tirosina quinasa, como son los FGFRs. En particular existen dos isoformas de STAT5, la 5A y la 5B, que aunque son codificadas por genes distintos, guardan un 90% de homología (Grimley et al. 1999). En los tumores C4, STAT5A se encuentra sobre expresado en HD, y esto coincide con un clúster de genes regulados por miRNAs al comparar C4-HD sin MPA vs con MPA. Esto podría indicar que el progestágeno podría reprimir miRNAs que regulen a STAT5A. Interesantemente, en el análisis de enriquecimiento de vías (el cual abordamos más adelante) encontramos que el C4-HD tratado con MPA al ser comparado con C4-HD sin MPA, podría tener desregulada la vía de la prolactina, y se sabe que la ablación específica de STAT5A provoca la falla en la maduración de la mama por prolactina (Grimley et al. 1999). Además, encontramos que miR-141 podría explicar la mayor expresión de STAT5A en tumores HD, ya que se sub expresa al tratar los tumores con MPA y esto podría regular positivamente la expresión de STAT5A. En concordancia con esto, en un trabajo del 2014, Finlay-Shultz y colaboradores comprobaron que el miR-141 era regulado negativamente en células de cáncer de mama al ser tratadas con progesterona, y esto a su vez provocaba un aumento de STAT5A, corroborando el mecanismo que proponemos (Finlay-Schultz et al. 2014).

Aunque habíamos encontrado genes relevantes en cáncer de mama y de particular interés para nuestro laboratorio, decidimos explorar los datos del *array* de miRNAs de manera más global. Los análisis de enriquecimiento de vías permiten indagar a nivel global como cambia la señalización de una muestra y especular si esto puede tener relación con la iniciación o progresión tumoral (Fertig et al. 2014). Nos centramos en las comparaciones para las cuales teníamos datos tanto de microRNAs como de genes expresados. Encontramos que al comparar el C4-HD con MPA vs sin MPA, vemos desregulada la vía de señalización de ErbB. Esto no nos sorprendió dado que nuestro modelo es positivo para el gen

HER2/neu (o ERBB2) y esta señalización podría contribuir al crecimiento mediado por progestágenos de estos tumores (Béguelin et al. 2010). Además, la señalización de prolactina también se ve desregulada, y se sabe que además de cumplir roles en el desarrollo mamario, la prolactina está involucrada en diversos procesos asociados al cáncer de mama, como por ejemplo la activación de las quinasas de la familia SRC, que pueden activar a STAT5 a través de Jak2 (Martín-Pérez et al. 2015) y en nuestro modelo como ya hemos mencionado, STAT5 está relacionado tanto con FGFR-2 como con el RP. Además, la prolactina a través de la proteína inducida por prolactina o PIP, puede activar a ErbB2 (Naderi 2015) y esto concuerda con el hecho de que encontramos la señalización por ErbB desregulada.

Quizás el dato más interesante lo encontramos al comparar C4-HD sin MPA con C4-HI, donde observamos que se ven desregulados genes que tienen que ver con el silencio postranscripcional mediado por ARNs pequeños, en los cuales se incluyen los miRNAs. Esto podría indicar un papel relevante de los miRNAs en el pasaje la hormono independencia, y si bien esto es especulación, nos proponemos seguir investigando en estos mecanismos a futuro. En C4-HI encontramos además desregulación de genes involucrados tanto en regulación positiva como negativa del ciclo celular, cuando lo comparamos con C4-HD con MPA. Esto también era esperado, ya que uno de los *hallmarks* de la progresión del cáncer es la adquisición de mecanismos de supervivencia y evasión de la apoptosis, ambos puntos relacionados con genes que controlan el ciclo celular (Hanahan and Weinberg 2011). Otro mecanismo interesante que se ve desregulado es el de la migración de células endoteliales. Esto es interesante por varios motivos, en primera instancia porque apunta que existen mecanismos asociados a migración celular que están desregulados y sabemos que el C4-HI posee características más invasivas que su tumor parental C4-HD, y por otro lado se sabe que el FGF2, en especial las isoformas de bajo peso molecular como la de 18 kDa (utilizada en esta tesis) estimula la migración de las células endoteliales (Yang et al. 2015) y por eso vemos desregulación de este camino de transducción de señales. En este último punto cabe destacar que las muestras fueron obtenidas a partir de tejido tumoral, el cual podría haber incluido células endoteliales y esto explicaría la desregulación de esta vía en C4-HI, pero es un fenómeno que amerita ser estudiado en más detalle en nuestro modelo dado que podría involucrar miRNAs.

Habiendo realizado este análisis bioinformático del transcriptoma en relación a los genes potencialmente blancos de los miRNAs, decidimos corroborar la expresión algunos miRNAs seleccionados. Para esta tesis, acotamos la evaluación a 5 candidatos, que elegimos tanto por su

relevancia en cáncer de mama como por otras evidencias bibliográficas. De los 5, miR-222 y el miR-335 no resultaron diferencialmente expresados en los tumores analizados, pero nos permitieron valorar la técnica y corroborar la reproducibilidad de la *stem loop* PCR en varios candidatos.

El miR-1 era un candidato muy atractivo dado que era el único que se modificaba al comparar un tumor C4-HI con un C4-HIR, y este tenía como blanco posible al RP (Betel et al. 2008). Al medir la expresión en estas dos variantes tumorales, no encontramos diferencias significativas, y la amplificación de este miRNA resultaba poco consistente. Un segundo análisis del *array* contestaba este interrogante, dado que con un ligero cambio en los parámetros, el miR-1 no parecía estar desregulado.

Con la técnica ya optimizada, decidimos evaluar al miR-31 y al miR-155. Lo interesante de ambos miRNAs es que pueden ser inducidos por FGF2 en modelos no relacionados con cáncer de mama (Wolf et al. 2013). Aun así, teníamos la evidencia de que podrían ser inducidos por el factor, y al medir tanto el miR-31 como el miR-155, encontramos que aumentaban su expresión en el tumor C4-HI. Esto sumado al hecho de que el C4-HI sobre expresa FGFR-2 podría indicar que es a través de este receptor que se estimula la expresión de ambos miRNAs. También evaluamos la expresión de los miRNAs elegidos en C4-HIR, la variante resistente al tratamiento con MFP de la familia C4. Esto nos interesó ya que una de las aplicaciones más promisorias de los miRNAs en la clínica es su utilización como factor de diagnóstico (Zhou et al. 2012). Son moléculas estables en el torrente sanguíneo y pueden ser analizadas con una técnica de uso cotidiano como es la PCR en tiempo real (Ma et al. 2012b). Interesantemente, tanto miR-31 como miR-155 aumentan su expresión en correlación con la progresión tumoral y existen evidencias de que la regulación de su expresión puede coincidir y correlaciona con el estado de expresión de los receptores hormonales (Lu et al. 2012). Si bien el trabajo de Lu y colaboradores establece una correlación con los miRNAs circulantes, nuestro trabajo aporta una nueva visión ya que no solo serían marcadores séricos asociados a los receptores hormonales, sino que en el tejido podrían funcionar como marcadores de progresión tumoral. Esto último es una conjetura que deberíamos corroborar con el estudio de otras familias tumorales con variantes que tengan distintos grados de dependencia hormonal.

Utilizando las bases de datos de genes blancos, estudiamos con más detalle cómo podría la expresión de los miRNAs 31 y 155 relacionarse con el mecanismo de activación de RE α por FGF2. En el contexto de la interacción de FGF2 con la vía de RE α , encontramos que miR-31 podría promover la activación de RE α ya que podría tener como target a la proteína Spred1, la cual es un regulador negativo

de FRS2, una proteína adaptadora clave en la cascada de señalización de los FGFRs. Entonces, a través de la regulación negativa de Spred1, podría favorecer una mayor activación de FGFR-2 (Fearon et al. 2013), y por lo que vimos anteriormente indirectamente de RE α y RP.

Por su parte, en estudios realizados por Donnem y colaboradores, constataron que el miR-155 correlaciona con la expresión de FGF2 (Donnem et al. 2012), y otros trabajos relacionaron a este miR con metástasis, encontrando que los tumores metastásicos sobre expresan este miRNA (O'Day and Lal 2010). En nuestro caso, esto coincide con lo observado, ya que el C4-HIR es un tumor metastásico y es el que posee mayor expresión de miR-155. Con estas evidencias postulamos que miR-31 y miR-155 no sólo serían marcadores de progresión, sino que también podrían tener acciones regulatorias sobre genes diana como consecuencia de la estimulación con FGF2 que podrían promover no solo la activación ligando independiente de RE α por desrepresión de MAPKs, sino también la angiogénesis y migración celular, llevando a los tumores a un fenotipo mas invasivo. Es interesante destacar que contamos con resultados preliminares del tumor C4-HIR en los que se ha observado una mayor expresión de FGF2, lo cual podría relacionarse directamente con el aumento de ambos miRs, aunque sabemos que este tumor expresa menores niveles de FGFR-2 por lo tanto podría ser que el receptor involucrado en este caso sea otro miembro de la familia, probablemente el FGFR-1 el cual se encuentra altamente expresado en este tumor (estos datos serán incluidos en la tesis de la Lic. Ana Sahores).

PARTE V

Conclusiones

Resumen de resultados y conclusiones

En líneas celulares MCF-7 y T47D:

- 1) Demostramos que el FGF2 estimula la proliferación de células T47D y MCF-7 activando las vías de Akt, Erk y RE α .
- 2) Demostramos además que el RE α activado por FGF2 media la proliferación celular y participa en la transcripción de genes clave, como *c-MYC* y *pS2*.
- 3) El bloqueo del RE α afecta en mayor medida a la línea MCF-7 que a la T47D en su respuesta al FGF2, línea en la cual el RP juega un rol preponderante.

Se concluye que el FGF2 puede activar al RE α en forma ligando independiente y que el grado de participación en la proliferación celular del RE α es dependiente de factores intrínsecos de cada línea celular.

En células MCF-7 R2CA

- 1) Logramos desarrollar la línea celular MCF-7 R2CA, la cual sobre expresa un FGFR-2 constitutivamente activo. La línea muestra mayor tasa de proliferación y activación basal del RE α y Erks, no así de la vía de Akt, en comparación con la línea control, sugiriendo la participación de otros FGFRs en la respuesta inducida por FGF2 en células MCF-7.
- 2) En el modelo de R2CA en xenotransplantes, pudimos comprobar que el FGFR-2 le confería una ventaja proliferativa a las células, ya que estos tumores eran capaces de establecerse sin aporte exógeno de hormonas, aunque su crecimiento fue limitado.

Concluimos que el FGFR-2 constitutivamente activo, induce la síntesis de genes blanco como *RP* y *pS2* presuntamente a través del RE α . Su expresión constitutiva no reemplaza completamente el aporte exógeno de E₂, aunque los tumores responden al tratamiento con antiestrógenos o antiprogestágenos. Los datos sugieren que FGFR-2 actúa en conjunto con otros factores/receptores para inducir la progresión tumoral.

En tumores C4 del modelo murino:

- 1) El crecimiento de los tumores hormono independientes C4-HI que se inhiben con antiprogestágenos, puede ser inhibido sólo parcialmente por inhibidores de los FGFRs, o por un antiestrógeno puro.
- 2) Basalmente, estos tumores demuestran activación del RE α , lo que sugiere que dicha activación podría ser la causa de su transición a la hormono-independencia. Sin embargo, el hecho de que el tratamiento con inhibidores de FGFRs o antiestrógenos disminuye casi completamente la activación de RE α y sólo parcialmente el crecimiento tumoral, sugiere que bajo presión selectiva se ponen en funcionamiento vías de señalización independientes de la activación de RE α .

Concluimos que existe una interrelación de la vía del RE α con la del FGF2 en el modelo tumoral murino, sin embargo, así como también se observó en las células T47D, la activación ligando independiente del RE α no es jerárquicamente tan relevante como la del RP representando un posible mecanismo de adquisición de resistencia al tratamiento con un antiestrógeno.

En estudios de miRNAs de tumores de la familia C4:

- 1) Analizamos la expresión de 375 miRNAs conocidos y obtuvimos un perfil de expresión para 3 variantes tumorales con distintos grados de dependencia hormonal.
- 2) Al analizar los datos del array de miRNAs y compararlos con el transcriptoma de los tumores C4-HD y C4-HI, encontramos distintas vías de señalización y procesos alterados en estos tumores, cuyo comportamiento podría estar vinculado a una expresión alterada de miRNAs.
- 3) En particular los genes STAT5 y FGFR-2, dos candidatos de gran interés para el laboratorio y que participarían en la activación de RE α y RP por FGF2, podrían estar regulados por miRNAs.
- 4) Logramos optimizar la medición de los miRNAs en muestras tumorales, e identificamos los miR-31 y 155, ambos relacionados a la vía de FGF2, como posibles marcadores de progresión tumoral, aunque queda por explorar su rol como reguladores de procesos metastásicos.

Concluimos que la desregulación en la expresión de miRNAs podría participar en la transición hacia la independencia y resistencia hormonal, regulando a posibles miembros claves del *signaling pathway* del FGF2 siendo miR-31 y 155 candidatos a tener en cuenta en futuros estudios.

A futuro, nos queda evaluar si el RE α se encuentra formando complejos transcripcionales junto con el RP en los promotores de genes blanco cuando se estimulan las células con FGF2 y evaluar si la cotransfección de FGFR-1 constitutivamente activado es capaz de aumentar la tumorigenicidad de las células MCF-7 R2CA e imitar la acción del FGF2 activando también la vía de Akt.

En cuanto a los miRNAs, pretendemos medir la expresión de miR-31 y 155 en otros tumores con distinto grado de dependencia hormonal para poder corroborar su posible aplicación como marcadores de progresión, así como también evaluar la expresión de los genes blanco regulados por estos miRNAs en los tumores de la familia C4.

Tabla 1

<i>Simbolo del gen</i>	<i>miRNAs</i>	<i>Descripcion del gen</i>
Pcdha8	mmu-miR-532-5p, mmu-miR-29b	protocadherin alpha 8
Zfp704	mmu-miR-532-5p, mmu-miR-29b	zinc finger protein 704
Jarid2	mmu-miR-29b, mmu-miR-155	jumonji, AT rich interactive domain 2
Mark3	mmu-miR-29b, mmu-miR-350	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
Pcdha3	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	protocadherin alpha 3
BC060632	mmu-miR-29b, mmu-miR-127	cDNA sequence BC060632
Pcdha2	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	protocadherin alpha 2
Dnmt3a	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	DNA methyltransferase 3A
Pcdha12	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	protocadherin alpha 12
Morf4l2	mmu-miR-29b, mmu-miR-96	mortality factor 4 like 2
Pten	mmu-miR-29b, mmu-miR-467a	phosphatase and tensin homolog
Col5a2	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	collagen, type V, alpha 2
Zfp36l1	mmu-miR-29b, mmu-miR-96, mmu-miR-539	zinc finger protein 36, C3H type-like 1
Camk2g	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma
Rnf19a	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	ring finger protein 19A
Tsc22d3	mmu-miR-29b, mmu-miR-96	TSC22 domain family 3
Pcdha10	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	protocadherin alpha 10
Pcdha5	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	protocadherin alpha 5
Pcdha7	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	protocadherin alpha 7
Pcdhac1	mmu-miR-29b, mmu-miR-532-5p	protocadherin alpha subfamily C, 1
Ube2g1	mmu-miR-96, mmu-miR-335-5p	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 1 (UBC7 homolog, C. elegans)
O910001A06Rik	mmu-miR-96, mmu-miR-224	RIKEN cDNA O910001A06 gene
Zhx2	mmu-miR-96, mmu-miR-744	zinc fingers and homeoboxes 2
Tacc1	mmu-miR-96, mmu-miR-494	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
Frs2	mmu-miR-96, mmu-miR-532-5p, mmu-miR-539	fibroblast growth factor receptor substrate 2
Ctnnd1	mmu-miR-96, mmu-miR-197	catenin (cadherin associated protein), delta 1
Tcf7l2	mmu-miR-96, mmu-miR-539	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box
Vamp3	mmu-miR-96, mmu-miR-197	vesicle-associated membrane protein 3
Sox6	mmu-miR-96, mmu-miR-155, mmu-miR-350	SRY-box containing gene 6
Hoxa5	mmu-miR-96, mmu-miR-350	homeo box A5
Ebf3	mmu-miR-96, mmu-miR-127	early B-cell factor 3
Ankib1	mmu-miR-96, mmu-miR-222, mmu-miR-350	ankyrin repeat and IBR domain containing 1
Klhl14	mmu-miR-127, mmu-miR-467a	kelch-like 14 (Drosophila)
Lcorl	mmu-miR-155, mmu-miR-350	ligand dependent nuclear receptor corepressor-like

Apéndice 1

CULTIVO CELULAR: MEDIOS Y SOLUCIONES

Medio de cultivo

- DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12, 1:1)
(Sigma Aldrich, St Louis) sin rojo fenol. 15,6 g/l
- Bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich) 1,2 g/l
- Sulfato de gentamicina comercial 50 mg/l

Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua bidestilada y se esterilizó por filtración.

Suero Fetal Bovino (SFB) de complementado

SFB (Natocor, Argentina) calentado en baño térmico a 56°C durante treinta minutos.

SFB depletado en hormonas adsorbido con carbón (SFBch)

Se incubó el SFB de complementado con carbón activado (5%; Mallinckrodt) durante 1 h a 4°C con agitación permanente. Luego de la adsorción, el suero se centrifugó dos veces a 12000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se volvió a incubar con 5% de carbón activado pero esta vez durante toda la noche y, finalmente, el suero se centrifugó 6 ó 7 veces hasta eliminar completamente el carbón y se esterilizó por filtración.

Medio de cultivo para células epiteliales y CAFS

- DMEM/F12
- 10% SFB de complementado

Medio de lavado

- DMEM/F12
- 2% SFB de complementado.

PBS 10X

- Na₂HPO₄.12H₂O (fosfato dibásico de sodio, dodecahidrato. Anedra) 30,06 g
- NaH₂PO₄.H₂O (fosfato monobásico de sodio monohidratado. Anedra) 2,56 g
- NaCl (Anedra) 87,6 g

Se llevó a un litro con H₂O_d. Para trabajar se hace una dilución 1:10 con H₂O_d.

Solución de Tripsina-EDTA

- Tripsina (Gibco, 1:250) 0,25% p/v
- EDTA (Cicarelli) 0,2 % p/v

Se disolvió en PBS 1X.

Timidita tritiada (utilizada en ensayos de proliferación celular)

³H-timidina (NEN, actividad específica 20 Ci/mmol) 0,4 µCi/hoyo

Líquido de centelleo

Optiphase 'HISAFE' 3 (PerkinElmer).

INMUNOHISTOQUIMICA / INMUNOFLUORESCENCIA

Ioduro de Propidio (solución madre)

2 mg en 1 ml de agua destilada.

Solución de montaje

Vectashield (Vector)

Solución de bloqueo

Suero fetal bovino (SFB) 10% v/v en PBS 1X

WESTERN BLOT

TBS 10X

- Cloruro de Sodio (NaCl) 58.44 g.
- Tris Base 12.1 g.

Volumen final: 1 litro de agua destilada.

Para utilizar se diluye a una concentración 1X, en agua destilada.

Para preparar TBS 1X, tween 0,1% (TBSt), se le agrega 1 ml de Tween 20.

Acrilamida 30%

- Acrilamida (Gibco BRL) 29 g.
- Bisacrilamida (Gibco BRL) 1 g.

Volumen final: 100 ml agua destilada

Se filtra y se conserva a 4° C protegida de la luz.

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tris Base 90,85 g.

Volumen final: 500 ml agua destilada.

(Llevar a pH con HCl 1:2)

Tris-HCl 1,0 M pH 6,8

- Tris Base 60,57 g.

Volumen final: 500 ml agua destilada.

(Llevar a pH con HCl 1:2)

SDS 10%

SDS (Gibco BRL) 10 g.

Volumen final: 100 ml agua destilada

Persulfato 10% (APS)

APS (Gibco SRL)

1 g.

Volumen final: 10 ml agua destilada

Buffer de siembra (Loading Buffer) 4X

- SDS 0.8 g.
- β -mercaptoetanol 2ml
- Glicerol 4 ml
- Tris Base 1M pH 6,8 2.5 ml
- Azul de Bromofenol 0,004g.
- H₂O_d 1.5ml

Se lleva a 1X con la muestra que se va a sembrar en el gel.

Buffer de Corrida 10X

- Tris Base 30 g.
- Glicina 144 g.
- SDS 10 g.

Volumen final: 1 litro de agua destilada.

Para utilizar se diluye a una concentración 1X, en agua destilada.

Buffer de transferencia

- Buffer de corrida 10X 100 ml.
- Metanol 200 ml

Volumen final: 1 litro de agua destilada.

Solución de Revelado

A. *Tubo 1:*

- a. H₂O_d 4,6 ml
- b. Tris pH 8.8 333 μ l
- c. Luminol (Sigma) 50 μ l
- d. Ácido Cumárico (Sigma) 22 μ l.

B. *Tubo 2:*

a. H ₂ O _d	4,6 ml
b. Tris pH 8.8	333 µl
c. H ₂ O ₂ (Merck).	22 µl

Se mezclan las soluciones de los tubos 1 y 2, y se coloca la mezcla sobre la/s membrana/s de nitrocelulosa durante 2 minutos aproximadamente antes de exponer las placas radiográficas.

Luminol: 22 mg de luminol en 500 µl de DMSO

Cumárico: 7,5 mg de ácido cumárico en 500 µl de DMSO.

Placas radiograficas: CL-XPosure film (18 x 24 cm, Thermo Scientific)

Solución de bloqueo

Leche descremada en polvo al 5% en PBS 1X/ tween 0.1%

Marcadores de peso molecular

PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Membrana de nitrocelulosa

Hybond C (0,45 µm; Amersham).

Extractos proteicos

Buffer RIPA

• Tris Base 10 mM (pH 7.5)	0.121 g
• Nacl 150 mM	0.876 g
• Vanadato de Sodio 2 mM	0.0367 g
• Deoxicolato de Sodio 1 %	1 g
• SDS 0.1 %	0.1 g
• Igepal 1 %	1 ml

Se lleva a un volumen final de 100 ml con agua destilada

Inhibidores de proteasas

- PMSF (Sigma, 0.5nM) 174.2 mg
- Mezcla de inhibidores (100X):
 - ZPCK (Sigma, 0.025mM) 16,4 mg
 - TLCK (Sigma, 0.025mM) 18,4 mg
 - TPCK (Sigma, 0.025mM) 17,74 mg
 - TAME (Sigma, 0.025mM) 18,8 mg

Para ambas soluciones, se lleva a un volumen final de 20 ml en etanol absoluto

MÉTODO DE LOWRY

Curva standard de albúmina (Sigma) con valores en un rango desde 0-100 μg (por duplicado) a partir de un stock de 2 mg/ml.

Para preparar las muestras y las diluciones del patrón:

- Solución 1:
 - CuSO_4 1% p/v
 - Tartrato de Na_2K 2% p/v

Se agregan ambas soluciones al 5% en *buffer* Na_2CO_3 2% NaOH 0,1N

Se diluyen 5 μl de cada muestra en 100 μl de agua destilada (por duplicado), y se le agregan 0,9 ml de Solución 1. Se agitan las muestras en un vortex y luego de 10 minutos se agregan 100 μl del reactivo de Folin (Folin-Ciocalteu, Anedra) diluido 1:2. Se esperan 30 minutos y se mide la absorbancia a 750 nm en un lector de ELISA. Para obtener la concentración, se interpola utilizando el ajuste a la curva de diluciones del patrón.

EXTRACCION DE RNA

Para la extracción de RNA total se utilizó el reactivo TRIzol Reagent (Ambion by Life Technologies), siguiendo las especificaciones del fabricante.

En el caso de los miRNAs, se utilizó el kit mirVana PARIS (Ambion), siguiendo el protocolo provisto por la empresa.

INMUNOPRECIPITACION DE CROMATINA

Para la realización de los ensayos de CHIP, se utilizó el kit HighCell# CHIP kit (Diagenode). Se siguió el protocolo sin modificaciones que acompañaba el kit. Todos los anticuerpos y primers utilizados se consignan en la sección correspondiente.

DROGAS E INHIBIDORES UTILIZADOS

FGF2: Gentilmente donado por el laboratorio del Dr. Baldi.

Estradiol: Sigma-Aldrich.

Fulvestrant / ICI 182.780: Astrazeneca.

PD 173074: Pfizer.

BGJ398: Selleckchem.

MPA: Laboratorio Craveri (*in vitro*)/ Abcam (*in vivo*).

RU-486/MFP: Sigma-Aldrich (*in vitro*)/ Abcam (*in vivo*).

Apéndice 2

Anticuerpos utilizados para *western blot*

- RE α humano(HC-20): sc-543, Santa Cruz Biotechnology.
- pRE α (ser118): sc-101675, Santa Cruz Biotechnology.
- pRE α (ser167): #2514S, Cell signalling.
- pAkt (ser 473): sc-7985-R, Santa Cruz Biotechnology.
- Akt total (H-136): sc-8312, Santa Cruz Biotechnology.
- pErk (E-4): sc-7383, Santa Cruz Biotechnology.
- Erk total (K-23): sc-94, Santa Cruz Biotechnology.
- FGFR-2 (Bek, C-17): sc-122, Santa Cruz Biotechnology.
- RP (H-190): sc-7208, Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpos secundarios:
 - Anti rabbit: Peroxidase labeled anti rabbit IgG (H+L), PI-1000, Vector.
 - Anti mouse: Peroxidase labeled anti mouse IgG (H+L), PI-2000, Vector.

Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

- FGFR-2 (Bek, C-17): sc-122, Santa Cruz Biotechnology.
- RE α humano (HC-20): sc-543, Santa Cruz Biotechnology.
- RE α ratón (MC-20): sc-542, Santa Cruz Biotechnology.
- pRE α (ser118): sc-101675, Santa Cruz Biotechnology.
- pRE α (ser167): #2514S, Cell signaling.
- pRP (ser190): Anticuerpo monoclonal donado por el laboratorio del Dr. Edwards.
- RP (H-190): sc-7208, Santa Cruz Biotechnology.
- FOXA1: ab23738, Abcam.
- MYC: D84C12 (XP) R, Cell Signaling.
- Anticuerpos secundarios
 - Para inmunohistoquímica:
 - Anti rabbit: Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, BA-1100, Vector.

- Anti mouse: Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody, BA-9200, Vector.
- Para inmunofluorescencia:
 - Anti rabbit acoplado a FitC: Fluorescein anti rabbit IgG (H+L) FI-1000, Vector.
 - Anti mouse acoplado a FitC: Fluorescein anti rabbit IgG (H+L) FI-2000, Vector.

Anticuerpos utilizados para inmunoprecipitación de cromatina

- RE α (HC-20) X: sc-543 X, Santa Cruz Biotechnology.
- FOXA1: #2514S, Cell signaling.
- IgG control (normal rabbit IgG): sc-2027, Santa Cruz Biotechnology.

Apéndice 3

Primers utilizados para PCR en tiempo real:

MYC	<i>Forward</i>	5'-ACGGCCGACCAGCTGGAGAT-3'
	<i>Reverse</i>	5'-TCGTCGTCCGGGTCGCAGAT-3'
pS2	<i>Forward</i>	5'-CGTGCCCGTGTGCATGTCCT-3'
	<i>Reverse</i>	5'-GTGGCCTTCCCGACCCTGC-3'
GAPDH	<i>Forward</i>	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
	<i>Reverse</i>	5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'

Primers utilizados para CHIP:

pS2	<i>Forward</i>	5'-GGCCATCTCTCACTATGAATCACTTCTGC-3'
	<i>Reverse</i>	5'-GGCAGGCTCTGTTTGCTTAAAGAGCG-3'

Primers utilizados para stem-loop PCR

Se utilizaron kits de Taqman (Applied Biosystems, 4427975):

- mmu-mir-1: 002882

-mmu-mir-31: 002495

-mmu-mir-155: 002571

Bibliografía

- Afhüppe W, Beekman JM, Otto C, et al (2010) In vitro characterization of ZK 230211-A type III progesterone receptor antagonist with enhanced antiproliferative properties. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119:45–55. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.12.011
- Afhüppe W, Sommer A, Müller J, et al (2009) Global gene expression profiling of progesterone receptor modulators in T47D cells provides a new classification system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113:105–15. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.11.015
- Anbalagan M, Rowan BG (2015) Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 1–9. doi: 10.1016/j.mce.2015.01.016
- Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129–57.
- Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides a C (1994) Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 8:1208–14.
- Aronica SM, Katzenellenbogen BS (1993) Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol* 7:743–52. doi: 10.1210/mend.7.6.7689695
- Augoff K, McCue B, Plow EF, Sossey-Alaoui K (2012) miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer* 11:5. doi: 10.1186/1476-4598-11-5
- Balañá ME, Labriola L, Salatino M, et al (2001) Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells. *Oncogene* 20:34–47.
- Barkhem T, Haldosén L-A, Gustafsson J-A, Nilsson S (2002) Transcriptional synergism on the pS2 gene promoter between a p160 coactivator and estrogen receptor-alpha depends on the coactivator subtype, the type of estrogen response element, and the promoter context. *Mol Endocrinol* 16:2571–2581. doi: 10.1210/me.2002-0051
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215–33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002
- Basilico C, Moscatelli D (1992) The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 59:115–65.
- Beato M, Sánchez-Pacheco A (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17:587–609. doi: 10.1210/edrv-17-6-587

- Béguelin W, Díaz Flaqué MC, Proietti CJ, et al (2010) Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3. *Mol Cell Biol* 30:5456–5472. doi: 10.1128/MCB.00012-10
- Betel D, Wilson M, Gabow A, et al (2008) The microRNA.org resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Res* 36:149–153. doi: 10.1093/nar/gkm995
- Brooks S, Locke E, Soule H (1973) Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 248:6251–6253.
- Cardoso W V (2001) Molecular regulation of lung development. *Annu Rev Physiol* 63:471–94. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.471
- Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, et al (2005) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 122:33–43. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.008
- Cerliani JP, Guillardoy T, Giulianelli S, et al (2011) Interaction between FGFR-2, STAT5, and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer Res* 71:3720–3731. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3074
- Chen C, Ridzon D a, Broomer AJ, et al (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33:e179. doi: 10.1093/nar/gni178
- Cheng J, Zhang C, Shapiro DJ (2007) A functional serine 118 phosphorylation site in estrogen receptor-?? is required for down-regulation of gene expression by 17??-estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *Endocrinology* 148:4634–4641. doi: 10.1210/en.2007-0148
- Chu EC, Tarnawski AS (2004) PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit* 10:RA235–A241. doi: 6275 [pii]
- Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, et al (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* 9:279–289. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00459-8
- Cochrane DR, Jacobsen BM, Connaghan KD, et al (2012) Progesterone regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 355:15–24. doi: 10.1016/j.mce.2011.12.020
- Di Leva G, Gasparini P, Piovan C, et al (2010) MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 102:706–21. doi: 10.1093/jnci/djq102
- Dixon JM (2014) Endocrine Resistance in Breast Cancer. *New J Sci* 2014:1–27. doi: 10.1155/2014/390618
- Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, et al (2003) Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 10:179–86.

- Donnem T, Fenton CG, Lonvik K, et al (2012) MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0029671
- Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, et al (1995) Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 35:173–86.
- Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, et al (1998) Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem* 273:29321–29330.
- Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, et al (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447:1087–93. doi: 10.1038/nature05887
- Elizalde P V, Lanari C, Kordon E, et al (1990) Transforming growth factor-beta activities in “in vivo” lines of hormone-dependent and independent mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. *Breast Cancer Res Treat* 16:29–39.
- Elizalde P V, Lanari C, Molinolo AA, et al (1998) Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:305–17.
- Elston CW, Ellis IO (2002) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 41:154–161. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139–49. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001
- Fabris VT, Benavides F, Conti C, et al (2005) Cytogenetic findings, Trp53 mutations, and hormone responsiveness in a medroxyprogesterone acetate induced murine breast cancer model. *Cancer Genet Cytogenet* 161:130–9. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.02.008
- Fazzari a, Catalano M., Comba a, et al (2001) The control of progesterone receptor expression in MCF-7 breast cancer cells: effects of estradiol and sex hormone-binding globulin (SHBG). *Mol Cell Endocrinol* 172:31–36. doi: 10.1016/S0303-7207(00)00397-X
- Fearon AE, Gould CR, Grose RP (2013) FGFR signalling in women’s cancers. *Int J Biochem Cell Biol* 45:2832–2842. doi: 10.1016/j.biocel.2013.09.017
- Ferbeyre G, Moriggl R (2011) The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1815:104–114. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.10.004
- Ferlay J, Soerjomataram I I, Dikshit R, et al (2014) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.29210

- Fertig, Afsari B, Geman D (2014) Learning Dysregulated Pathways in Cancers from Differential Variability Analysis. *Cancer Inform* 12:61. doi: 10.4137/CIN.S14066
- Finlay-Schultz J, Cittelly DM, Hendricks P, et al (2014) Progesterone downregulation of miR-141 contributes to expansion of stem-like breast cancer cells through maintenance of progesterone receptor and Stat5a. *Oncogene* 0:1–12. doi: 10.1038/onc.2014.298
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108
- Garmy-Susini B, Delmas E, Gourdy P, et al (2004) Role of fibroblast growth factor-2 isoforms in the effect of estradiol on endothelial cell migration and proliferation. *Circ Res* 94:1301–1309. doi: 10.1161/01.RES.0000127719.13255.81
- Giulianelli S, Cerliani JP, Lamb CA, et al (2008) Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: A role for the FGF-2/FGFR-2 axis. *Int J Cancer* 123:2518–31. doi: 10.1002/ijc.23802
- Giulianelli S, Herschkowitz JJ, Patel V, et al (2011) MPA-induced gene expression and stromal and parenchymal gene expression profiles in luminal murine mammary carcinomas with different hormonal requirements. *Breast Cancer Res Treat* 129:49–67. doi: 10.1007/s10549-010-1185-4
- Giulianelli S, Vaqué JP, Soldati R, et al (2012) Estrogen receptor alpha mediates progestin-induced mammary tumor growth by interacting with progesterone receptors at the cyclin D1/MYC promoters. *Cancer Res* 72:2416–2427. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3290
- Givol D, Yayon A (1992) Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 6:3362–9.
- Gonder JC, Laber K (2007) A renewed look at laboratory rodent housing and management. *ILAR J* 48:29–36.
- González L, Zambrano a, Lazaro-Trueba I, et al (2009) Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene* 28:1298–1308. doi: 10.1038/onc.2008.473
- Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN (2007) Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 608:1–22.
- Grimley PM, Dong F, Rui H (1999) Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:131–57.
- Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M (2008) The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep* 9:1087–93. doi: 10.1038/embor.2008.189
- Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IML, et al (2004) Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab* 15:73–78. doi: 10.1016/j.tem.2004.01.008

- Guagnano V, Furet P, Spanka C, et al (2011) Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* 54:7066–83. doi: 10.1021/jm2006222
- Gurtan AM, Sharp P a (2013) The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol* 1–19. doi: 10.1016/j.jmb.2013.03.007
- Guttilla IK, Adams BD, White B a (2012) ER α , microRNAs, and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 1–10. doi: 10.1016/j.tem.2011.12.001
- Hafner F, Holler E, von Angerer E (1996) Effect of growth factors on estrogen receptor mediated gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58:385–93.
- Hagan CR, Daniel AR, Dressing GE, Lange C a. (2012) Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol Cell Endocrinol* 357:43–49. doi: 10.1016/j.mce.2011.09.017
- Hanahan D, Weinberg R a. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- HersHKovitz Rokah O, Granot G, Ovcharenko A, et al (2012) Downregulation of Mir-31, Mir-155, and Mir-564 in Chronic Myeloid Leukemia Cells. *PLoS One* 7:e35501. doi: 10.1371/journal.pone.0035501
- Holliday DL, Speirs V (2011) Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 13:215. doi: 10.1186/bcr2889
- Howell A (2006) Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13:689–706. doi: 10.1677/erc.1.00846
- Hudson RS, Yi M, Esposito D, et al (2011) MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer. *Nucleic Acids Res* 40:3689–3703. doi: 10.1093/nar/gkr1222
- Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, et al (2007) A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 39:870–4. doi: 10.1038/ng2075
- Hurtado A, Holmes K a, Ross-innes CS, et al (2011) FOXA1 is a critical determinant of Estrogen Receptor function and endocrine response. *Nat Genet* 43:27–33. doi: 10.1038/ng.730.FOXA1
- Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, et al (2004) Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 18:1131–43. doi: 10.1210/me.2003-0308
- Itkin T, Ludin A, Gradus B, et al (2012) FGF-2 expands murine hematopoietic stem and progenitor cells via proliferation of stromal cells, c-Kit activation, and CXCL12 down-regulation. *Blood* 120:1843–55. doi: 10.1182/blood-2011-11-394692

- Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch JM, et al (1984) Sequence of the ps2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res* 12:2861–2878. doi: 10.1093/nar/12.6.2861
- Jensen E V (1991) Steroid hormone receptors. *Curr Top Pathol* 83:365–431.
- Jiang S, Zhang H-W, Lu M-H, et al (2010) MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res* 70:3119–27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4250
- Johnson DE, Williams LT (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60:1–41.
- Kastner P, Krust a, Turcotte B, et al (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9:1603–1614.
- Katoh M, Katoh M (2006) FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review). *Int J Oncol* 29:163–8.
- Katoh M, Katoh M (2003) FGFR2 and WDR11 are neighboring oncogene and tumor suppressor gene on human chromosome 10q26. *Int J Oncol* 22:1155–9.
- Katoh M, Nakagama H (2014) FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med Res Rev* 34:280–300. doi: 10.1002/med.21288
- Kechagioglou P, Papi RM (2014) Tumor Suppressor PTEN in Breast Cancer: Heterozygosity, Mutations and Protein Expression. *Anticancer Res* 34:1387–1400.
- Keen JC, Zhou Q, Park BH, et al (2005) Protein Phosphatase 2A Regulates Estrogen Receptor (ER) Expression through Modulation of ER mRNA Stability. *J Biol Chem* 280:29519–29524. doi: 10.1074/jbc.M505317200
- Keydar I, Chen L, Karby S, et al (1979) Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15:659–70.
- King T a., Gemignani ML, Li W, et al (2004) Increased progesterone receptor expression in benign epithelium of BRCA1-related breast cancers. *Cancer Res* 64:5051–5053. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1283
- Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato ACB (1988) A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res* 16:647–663. doi: 10.1093/nar/16.2.647
- Klinge CM (2000) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65:227–51.

- Klinge CM (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29:2905–2919. doi: 10.1093/nar/29.14.2905
- Koike S, Sakai M, Muramatsu M (1987) Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* 15:2499–513.
- Kok M, Holm-Wigerup C, Hauptmann M, et al (2009) Estrogen receptor- α phosphorylation at serine-118 and tamoxifen response in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101:1725–1729. doi: 10.1093/jnci/djp412
- Kong W, He L, Coppola M, et al (2010) MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J Biol Chem* 285:17869–79. doi: 10.1074/jbc.M110.101055
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138:863–70. doi: 10.1210/endo.138.3.4979
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925–30.
- Kusenda B, Mraz M (2006) MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed ...* 150:205–215.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12:735–9.
- Lamb C, Simian M, Molinolo A, et al (1999) Regulation of cell growth of a progestin-dependent murine mammary carcinoma in vitro: progesterone receptor involvement in serum or growth factor-induced cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70:133–142.
- Lanari C, Kordon E, Molinolo A, et al (1989) Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int J Cancer* 43:845–50.
- Lanari C, Lamb C, Fabris V, et al (2009) The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 16:333–350.
- Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD (1986) Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 33:215–23.
- Lavine KJ, White AC, Park C, et al (2006) Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes Dev* 20:1651–66. doi: 10.1101/gad.1411406

- Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, et al (2011) Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev* 32:597–622. doi: 10.1210/er.2010-0016
- Levenson a S, Jordan VC (1997) MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res* 57:3071–3078.
- Likhite VS, Stossi F, Kim K, et al (2006) Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Mol Endocrinol* 20:3120–3132. doi: 10.1210/me.2006-0068
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT.
- Lu Q, Surks HK, Ebling H, et al (2003) Regulation of estrogen receptor alpha-mediated transcription by a direct interaction with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 278:4639–4645. doi: 10.1074/jbc.M210949200
- Lu Z, Ye Y, Jiao D, et al (2012) MiR-155 and miR-31 are differentially expressed in breast cancer patients and are correlated with the estrogen receptor and progesterone receptor status. *Oncol Lett* 4:1027–1032. doi: 10.3892/ol.2012.841
- Lv J, Xia K, Xu P, et al (2014) miRNA expression patterns in chemoresistant breast cancer tissues. *Biomed Pharmacother* 68:935–942. doi: 10.1016/j.biopha.2014.09.011
- Ma R, Jiang T, Kang X (2012a) Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res* 31:38. doi: 10.1186/1756-9966-31-38
- Ma R, Jiang T, Kang X (2012b) Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res* 31:38. doi: 10.1186/1756-9966-31-38
- Martín-Pérez J, García-Martínez JM, Sánchez-Bailón MP, et al (2015) Role of SRC family kinases in prolactin signaling. *Adv Exp Med Biol* 846:163–88. doi: 10.1007/978-3-319-12114-7_7
- Mauro L, Pellegrino M, De Amicis F, et al (2014) Evidences that estrogen receptor α interferes with adiponectin effects on breast cancer cell growth. *Cell Cycle* 13:553–564. doi: 10.4161/cc.27455
- McKeehan WL, Wang F, Kan M (1998) The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59:135–76.
- Meloche S, Pouysségur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26:3227–3239. doi: 10.1038/sj.onc.1210414

- Meng W, Ye Z, Cui R, et al (2013) MicroRNA-31 predicts the presence of lymph node metastases and survival in patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 19:5423–33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0320
- Miller TL, Jin Y, Sun JM, et al (1996) Analysis of human breast cancer nuclear proteins binding to the promoter elements of the c-myc gene. *J Cell Biochem* 60:560–71. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19960315)60:4<560::AID-JCB12>3.0.CO;2-L
- Moffa A, Tannheimer S (2004) Transforming Potential of Alternatively Spliced Variants of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Human Mammary Epithelial Cells11NIH grant 2RO1CA70354 and.
- Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, et al (1998) Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J* 17:5896–5904. doi: 10.1093/emboj/17.20.5896
- Murakami M, Effenbein A, Simons M (2008) Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis. *Cardiovasc Res* 78:223–231. doi: 10.1093/cvr/cvm086
- Murphy LC, Weitsman GE, Skliris GP, et al (2006) Potential role of estrogen receptor alpha (ERalpha) phosphorylated at Serine118 in human breast cancer in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:139–46. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.09.021
- Musgrove E a, Lee CS, Sutherland RL (1991) Progesterins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol* 11:5032–5043. doi: 10.1128/MCB.11.10.5032.Updated
- Naderi A (2015) Prolactin-induced protein in breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 846:189–200. doi: 10.1007/978-3-319-12114-7_8
- Nardulli AM, Greene GL, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS (1988) Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology* 122:935–44. doi: 10.1210/endo-122-3-935
- Nasser MW, Datta J, Nuovo G, et al (2008) Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem* 283:33394–405. doi: 10.1074/jbc.M804788200
- Negrini M, Calin GA (2008) Breast cancer metastasis: a microRNA story. *Breast Cancer Res* 10:203. doi: 10.1186/bcr1867
- O'Day E, Lal A (2010) MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res* 12:201. doi: 10.1186/bcr2484
- Ornitz D, Itoh N (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 1–12.

- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271:15292–7.
- Pardo OE, Latigo J, Jeffery RE, et al (2009) The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 69:8645–8651. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1576
- Perou CM, Sùrlie T, Eisen MB, et al (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752.
- Petz LN, Nardulli AM (2014) Sp1 Binding Sites and An Estrogen Response Element Half-Site Are Human Progesterone Receptor A Promoter. *J Biol Chem* 289:972–985.
- Piotrowicz RS, Ding L, Maher P, Levin EG (2001) Inhibition of Cell Migration by 24-kDa Fibroblast Growth Factor-2 Is Dependent upon the Estrogen Receptor. *J Biol Chem* 276:3963–3970. doi: 10.1074/jbc.M004868200
- Png KJ, Yoshida M, Zhang XH-F, et al (2011) MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer. *Genes Dev* 25:226–31. doi: 10.1101/gad.1974211
- Power RF, Mani SK, Codina J, et al (1991) Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 254:1636–9.
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein a (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7:165–97.
- Prat A, Perou CM (2011) Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 5:5–23. doi: 10.1016/j.molonc.2010.11.003
- Ram PT, Kiefer T, Silverman M, et al (1998) Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 141:53–64.
- Rao X, Di Leva G, Li M, et al (2011) MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways. *Oncogene* 30:1082–97. doi: 10.1038/onc.2010.487
- Rivas M a, Venturutti L, Huang Y-W, et al (2012) Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progestin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast Cancer Res* 14:R77. doi: 10.1186/bcr3187
- Robertson JFR (2001) Faslodex (ICI 182, 780), a novel estrogen receptor downregulator - Future possibilities in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79:209–212. doi: 10.1016/S0960-0760(01)00138-8
- Robertson SC (1998) Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain. *J Biol Chem* 273:4567–4572.

- Robertson SC, Meyer AN, Hart KC, et al (1998) Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4567–4572.
- Sauvé K, Lepage J, Sanchez M, et al (2009) Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res* 69:5793–5800. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4924
- Scarola M, Schoeftner S, Schneider C, Benetti R (2010) miR-335 directly targets Rb1 (pRb/p105) in a proximal connection to p53-dependent stress response. *Cancer Res* 70:6925–33. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0141
- Shah YM, Rowan BG (2005) The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor (alpha) promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity. *Mol Endocrinol* 19:732–748. doi: 10.1210/me.2004-0298
- Sharma SB, Lin C-C, Farrugia MK, et al (2014) MicroRNAs 206 and 21 Cooperate To Promote RAS-Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling by Suppressing the Translation of RASA1 and SPRED1. *Mol Cell Biol* 34:4143–4164. doi: 10.1128/MCB.00480-14
- Sharpe R, Pearson A, Herrera-Abreu MT, et al (2011) FGFR Signaling Promotes the Growth of Triple-Negative and Basal-Like Breast Cancer Cell Lines Both In Vitro and In Vivo. *Clin Cancer Res* 17:5275–5286. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2727
- Song M (2013) DNA methylation of trefoil factor 1 (TFF1) is associated with the tumorigenesis of gastric carcinoma. *Mol Med Rep* 1:109–117. doi: 10.3892/mmr.2013.1772
- Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869–74. doi: 10.1073/pnas.191367098
- Sotiriou C, Pusztai L (2009) Gene-Expression Signatures in Breast Cancer.
- Stack G, Kumar V, Green S, et al (1988) Structure and function of the pS2 gene and estrogen receptor in human breast cancer cells. *Cancer Treat Res* 40:185–206.
- Sun Y, Fang M, Davies H, Hu Z (2013) Mifepristone: a potential clinical agent based on its anti-progesterone and anti-glucocorticoid properties. *Gynecol Endocrinol* 3590:1–5. doi: 10.3109/09513590.2013.856410
- Svoboda M, Sana J, Redova M, et al (2012) MiR-34b is associated with clinical outcome in triple-negative breast cancer patients. *Diagn Pathol* 7:31. doi: 10.1186/1746-1596-7-31
- Takimoto GS, Hovland AR, Tasset DM, et al (1996) Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 271:13308–13316. doi: 10.1074/jbc.271.23.13308

- Tamura M, Gu J, Danen EHJ, et al (1999) PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 274:20693–20703. doi: 10.1074/jbc.274.29.20693
- Tannous BA, Teng J (2011) Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway: Biomarkers of Success and Tribulation. *Biotechnol. Adv.* 29:997–1003.
- Trudel S, Ely S, Farooqi Y, et al (2004) Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t (4 ; 14) myeloma. *Survival (Lond)* 103:3521–3528. doi: 10.1182/blood-2003-10-3650.Supported
- Valastyan S, Benaich N, Chang A, et al (2009a) Concomitant suppression of three target genes can explain the impact of a microRNA on metastasis. *Genes Dev* 23:2592–7. doi: 10.1101/gad.1832709
- Valastyan S, Chang A, Benaich N, et al (2011) Activation of miR-31 function in already-established metastases elicits metastatic regression. *Genes Dev* 25:646–59. doi: 10.1101/gad.2004211
- Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al (2009b) A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 137:1032–1046. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.047.A
- Valastyan S, Weinberg R a (2010) miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell Cycle* 9:2124–9.
- Van Rooij E (2011) The art of microRNA research. *Circ Res* 108:219–34. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227496
- VanHook AM (2010) Ligand-Independent ER Activation. *Sci. Signal.* 3:ec112–ec112.
- Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X (2010) Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol* 119:586–93. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.07.021
- Wang H, Tan G, Dong L, et al (2012) Circulating MiR-125b as a Marker Predicting Chemoresistance in Breast Cancer. *PLoS One* 7:e34210. doi: 10.1371/journal.pone.0034210
- Wargon V, Fernandez S V, Goin M, et al (2011) Hypermethylation of the progesterone receptor A in constitutive antiprogestin-resistant mouse mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 126:319–32. doi: 10.1007/s10549-010-0908-x
- Wargon V, Helguero L a, Bolado J, et al (2009) Reversal of antiprogestin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 116:449–60. doi: 10.1007/s10549-008-0150-y
- Wesche J, Haglund K, Haugsten EM (2011) Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 437:199–213. doi: 10.1042/BJ20101603

- Wilfred B, Wang W, Nelson P (2007) Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* 91:209–217.
- Wolf L, Gao CS, Gueta K, et al (2013) Identification and characterization of FGF2-dependent mRNA: microRNA networks during lens fiber cell differentiation. *G3 (Bethesda)* 3:2239–55. doi: 10.1534/g3.113.008698
- Yamashita H, Nishio M, Kobayashi S, et al (2005) Phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:R753–64. doi: 10.1186/bcr1285
- Yan L, Huang X-F, Shao Q, et al (2008) MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 14:2348–60. doi: 10.1261/rna.1034808
- Yanai A, Inoue N, Yagi T, et al (2014) Activation of mTOR/S6K But Not MAPK Pathways Might Be Associated With High Ki-67, ER(+), and HER2(-) Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. doi: 10.1016/j.clbc.2014.12.002
- Yang X, Liaw L, Prudovsky I, et al (2015) Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep* 17:509. doi: 10.1007/s11883-015-0509-6
- Zhang C, Zhao J, Deng H (2013) MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci* 20:79. doi: 10.1186/1423-0127-20-79
- Zhang S, Li X, Burghardt R, et al (2005) Role of estrogen receptor (ER) alpha in insulin-like growth factor (IGF)-I-induced responses in MCF-7 breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 35:433–447. doi: 10.1677/jme.1.01858
- Zhang W, Liu HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12:9–18. doi: 10.1038/sj.cr.7290105
- Zhang X, Stappenbeck TTS, White AAC, et al (2006) Reciprocal epithelial-mesenchymal FGF signaling is required for cecal development. ... 133:173–180. doi: 10.1242/dev.02175
- Zhao Y, Li Y, Lou G, et al (2012) MiR-137 Targets Estrogen-Related Receptor Alpha and Impairs the Proliferative and Migratory Capacity of Breast Cancer Cells. *PLoS One* 7:e39102. doi: 10.1371/journal.pone.0039102
- Zheng W, Liu Z, Zhang W, Hu X (2015) miR-31 functions as an oncogene in cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet*. doi: 10.1007/s00404-015-3713-2

Zhou X, Marian C, Makambi KH, et al (2012) MicroRNA-9 as Potential Biomarker for Breast Cancer Local Recurrence and Tumor Estrogen Receptor Status. PLoS One 7:e39011. doi: 10.1371/journal.pone.0039011