

Tesis Doctoral

Rol de la vía FGF2/FGFR en la resistencia a la terapia hormonal en cáncer de mama

Sahores, Ana

2016-03-17

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:

Sahores, Ana. (2016-03-17). Rol de la vía FGF2/FGFR en la resistencia a la terapia hormonal en cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sahores, Ana. "Rol de la vía FGF2/FGFR en la resistencia a la terapia hormonal en cáncer de mama". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-17.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Rol de la vía FGF2/FGFR en la resistencia a la terapia hormonal en cáncer de mama

**Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad
de Buenos Aires en el área de Química Biológica.**

Ana Sahores

Directora de tesis: Caroline A. Lamb

Consejera de estudios: Adalí Pecci

Lugar de trabajo: Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME),

Buenos Aires, Argentina - Marzo 2016

RESUMEN

El 75% de los carcinomas mamarios expresan receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) y son susceptibles a una terapia endocrina. Sin embargo, con el tiempo, algunos pacientes desarrollan resistencia (resistencia hormonal adquirida) y otros no responden al tratamiento desde el comienzo (resistencia constitutiva). En nuestro laboratorio, utilizando modelos de carcinomas mamarios murinos y humanos, hemos demostrado que los tumores respondedores a la terapia con el antiprogestágeno mifepristona (MFP) tienen mayor expresión de la isoforma A del RP (RPA) que de la isoforma B (RPB). A su vez, los tumores con resistencia constitutiva o adquirida, se caracterizan por manifestar la relación inversa (RPB>RPA).

Se han propuesto diversas hipótesis para explicar los mecanismos que conducen a la resistencia endócrina, entre ellas, la activación constitutiva de vías de transducción de señales. La vía que involucra al FGF2 y sus receptores está constituida por cuatro receptores (FGFR1-4) y cinco isoformas de FGF2 con distinto peso molecular: la isoforma de 18 kDa o LMW-FGF2 y las de alto peso o HMW-FGF2 de 22; 22,5; 24 y 34 kDa. En trabajos previos demostramos que, en muestras de carcinomas mamarios humanos, existe una asociación significativa entre la expresión de FGFR2 y RE α ; también observamos una correlación positiva entre la expresión de FGFR1 y un alto grado histológico. Demostramos también que, en tumores sensibles a la terapia endocrina, el FGFR2 activado por el FGF2 estromal participa en el crecimiento tumoral a través de la activación de los RP.

Si bien se ha demostrado que la vía del FGF2/FGFR se encuentra desregulada en numerosas neoplasias y patologías del desarrollo, en muestras de pacientes con cáncer de mama aún es controvertida la asociación entre la expresión de FGF2 y el pronóstico de la enfermedad.

En base a estos antecedentes, nuestra hipótesis de trabajo es que durante la adquisición de la resistencia endocrina se produce un cambio en la expresión y señalización de FGF2 que favorece el crecimiento y la progresión tumoral. Nuestro objetivo general fue evaluar el rol de la vía FGF2/FGFR en el crecimiento y la progresión del cáncer de mama.

En primer lugar, utilizamos el modelo murino de carcinomas mamarios generados en nuestro laboratorio. Observamos, tanto por inmunohistoquímica como por *Western blot*, que las variantes resistentes de tres familias tumorales diferentes (C4, 59 y C7) expresan mayores niveles de FGFR1 y FGF2 que los tumores sensibles. Por inmunohistoquímica, observamos que el FGF2 se localiza predominantemente en el epitelio o en el estroma tumoral de las variantes

resistentes y sensibles, respectivamente. Es interesante observar que, el análisis de la expresión de las distintas isoformas de FGF2 reveló que las variantes resistentes expresan mayores niveles de las isoformas HMW-FGF2 que las variantes sensibles. Asimismo, mediante ensayos de ELISA mostramos que, en los tumores resistentes adquiridos y constitutivos, la localización es mayormente intracelular y extracelular, respectivamente.

Luego, evaluamos la funcionalidad de la vía de FGF2/FGFR en cultivos primarios de células epiteliales de las tres familias tumorales. Observamos que el agregado de LMW-FGF2 estimula la proliferación celular de tumores sensibles y resistentes constitutivos, pero no afecta la proliferación celular de los tumores resistentes adquiridos de la familia C4. Por otra parte, el tratamiento con dos inhibidores distintos de FGFR, PD 173074 y BGJ398, inhibe significativamente la proliferación celular basal e inducida por LMW-FGF2 en las tres familias tumorales, lo que indica un rol proliferativo de esta vía. Sin embargo, al realizar ensayos *in vivo* con el inhibidor BGJ398, éste sólo reduce parcialmente el crecimiento tumoral de las variantes C4-HI (sensible) y C7-HI (resistente constitutiva). El inhibidor no tuvo efectos significativos sobre el crecimiento tumoral de las variantes resistentes de la familia C4, aunque indujo signos de regresión tumoral temprana en todas las variantes tumorales ensayadas (C4-HI, C4-2-HI, C4-HIR, 59-HI, C7-HI). Las diferencias en el alcance de los efectos observados en cultivo e *in vivo* sugieren que deben desarrollarse inhibidores con mayor eficacia *in vivo*.

En conjunto, los resultados obtenidos con el modelo murino muestran una correlación positiva entre la expresión de HMW-FGF2 y FGFR1 con la resistencia hormonal y sugieren que, en la progresión tumoral, habría un aumento en la expresión de HMW-FGF2 y FGFR1 en el epitelio tumoral. Este aumento conduce a un cambio de una señalización paracrina en las variantes sensibles, a una autocrina o intracrina en los tumores resistentes constitutivos o adquiridos, respectivamente.

A continuación, validamos los resultados en un modelo de cáncer de mama humano, para lo cual utilizamos la línea celular T47D-WT y sus variantes: la línea T47D-YA, con alta expresión de RPA y sensible a MFP, y la línea T47D-YB, con alta expresión de RPB y resistente a MFP. Por inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y *Western blot*, observamos que la línea T47D-YB expresa mayores niveles de FGFR1, FGFR2 y HMW-FGF2 respecto de la línea T47D-YA. Por otro lado, el agregado de LMW-FGF2 estimula la proliferación celular en las líneas T47D-WT e -YA pero no altera su proliferación en las células T47D-YB. La línea resistente presenta mayor actividad basal de la vía de FGF2/FGFR, ejemplificada en la fosforilación de FRS2 y activación predominantemente de la vía de AKT, en comparación con la línea sensible. El LMW-FGF2 modularía principalmente la activación de las vías mencionadas en las líneas

T47D-WT e -YA, lo que sugiere una activación constitutiva en la línea resistente. El BGJ398 inhibe significativamente la proliferación celular basal e inducida por LMW-FGF2 en las tres líneas celulares, indicando que la vía de FGF2/FGFR cumple un rol proliferativo.

Finalmente, generamos variantes de la línea T47D-YA que sobreexpresan las isoformas de 18 y 22,5 kDa de FGF2 y evaluamos su efecto sobre la sensibilidad a MFP, TLP y TAM. En ensayos de recuento celular observamos que la sobreexpresión de las isoformas de 18 y 22,5 kDa promovió un aumento en la tasa de proliferación celular y resistencia al tratamiento endocrino en comparación con la línea T47D-YA infectada con el plásmido vacío (T47D-YA-Vac). La resistencia a MFP se mantuvo aún en ensayos *in vivo* y se observaron signos de malignidad en los tumores primarios, particularmente en la línea T47D-YA-22,5. Esto se evidenció en la capacidad para invadir tejidos adyacentes al tumor, como piel, músculo y tejido adiposo. Si bien algunos de los animales portadores de tumores T47D-YA-Vac e -YA-18 kDa focos metastásicos en los pulmones, 100% de los ratones con T47D-YA-22,5 presentaron metástasis pulmonares y un mayor número de focos con respecto a T47D-YA-Vac e -YA-18 kDa.

Nuestras observaciones indican que el FGF2 promueve el crecimiento tumoral en ambas variantes, sensibles y resistentes. Sin embargo, los resultados sugieren que, en los tumores sensibles, el estroma proveería el FGF2 que induciría el crecimiento tumoral a través de sus receptores de membrana y el RP de forma paracrina. Por otro lado, en los tumores resistentes, el propio parénquima tumoral expresaría elevados niveles de FGF2 (particularmente LMW-FGF2) y que, a través de un *loop* autocrino que involucra al FGFR1, gatillarían señales de proliferación, independientemente de la presencia de progestágenos o antiprogestágenos. No descartamos que exista también un *loop* intracrino, donde el FGF2 intracelular, particularmente las HMW-FGF2, serían responsables de la proliferación celular, resistencia a endocrina y diseminación metastásica.

Nuestros estudios contribuyen a esclarecer el rol de las isoformas de FGF2 en la progresión tumoral mamaria y representan la primera evidencia de resistencia hormonal vinculada a HMW-FGF2.

Palabras clave: cáncer de mama, FGF2, FGFR, RP, resistencia endocrina

"Role of FGF2/FGFR pathway in endocrine resistance in breast cancer"

ABSTRACT

Two-thirds of breast cancers express estrogen and progesterone receptors (ER and PR, respectively) and are standard targets for endocrine therapy. Most tumors initially respond to endocrine therapy, but many will eventually develop resistance (acquired hormone resistance) while others will fail to respond from the beginning (constitutive hormonal resistance) despite expressing hormone receptors. In our lab, using murine and human mammary carcinomas, we have demonstrated that tumors which respond to antiprogestin therapy (mifepristone; MFP) express higher levels of the isoform A of PR (PRA) than the isoform B (PRB), whereas tumors with constitutive or acquired hormonal resistance have the inverse ratio (PRB>PRA).

Many hypothesis have been proposed to explain the mechanisms that lead to endocrine resistance, among them, the constitutive activation of proliferative pathways. In humans, the FGF2/FGFR pathway is formed by four receptors (FGFR1-4) and five FGF2 isoforms with different molecular weight: low molecular weight isoform or LMW-FGF2 of 18 kDa and high molecular weight isoform or HMW-FGF2 of 22; 22,5; 24 and 34 kDa. In previous experiments and using human breast cancer samples, we found a significant association between the expression of FGFR2 and ER α , and reported a positive correlation between the expression of FGFR1 and a higher histological grade. We also demonstrated that stromal FGF2 activates FGFR2 and PR pathways, inducing tumor growth in hormone responsive carcinomas.

It has been proved that the FGF2/FGFR pathway is dysregulated in numerous neoplasias and developmental pathologies. However, its association with breast cancer progression is still controversial.

Taking into account these findings, our working hypothesis is that during tumor progression there is a switch in FGF2 expression and signaling that favors tumor growth and progression. Our main goal, therefore, was to study the role of the FGF2/FGFR pathway in breast tumor growth and progression.

We used a murine model of mammary carcinomas developed in our laboratory. By immunohistochemistry and *Western blot* assays, we observed that all the resistant variants of three different tumor families (C4, 59 y C7) express higher FGFR1 and FGF2 levels than the responsive variants. By immunohistochemistry assays we observed that FGF2 labeling was predominantly localized in the epithelium and in the tumor stroma of the resistant and responsive variants, respectively. Analysis of the expression of the different FGF2 isoforms revealed that the resistant variants express higher levels of total FGF2, especially HMW-FGF2, compared to the

responsive variants. We confirmed these findings using an ELISA assay and observed that acquired and constitutive resistant tumors differ in their FGF2 localization; whereas the former predominantly accumulate it within the cell, the latter also secrete it to the conditioned media.

Next, we studied the activity of the FGF2/FGFR pathway in primary cultures of epithelial cells from three tumor families (C4, 59, and C7). Treatment with LMW-FGF2 induced cell proliferation in responsive and constitutive resistant tumors, though failed to affect cell proliferation of acquired resistant tumors of the C4 family. Furthermore, treatment with two different FGFR inhibitors, PD 173074 and BGJ398, significantly inhibited basal and FGF2-induced cell proliferation in the three tumor families, indicating a proliferative role of FGF2/FGFR pathway. In *in vivo* experiments, BGJ398 only inhibited tumor growth of C4-HI (responsive) and C7-HI (constitutive resistant) tumors. However, blocking the pathway induced early signs of regression in all evaluated variants (C4-HI, C4-2-HI, C4-HIR, 59-HI, and C7-HI). The observed differences in the *in vitro* and *in vivo* assays suggest that more efficient inhibitors should be developed.

Altogether, these findings show a positive correlation between HMW-FGF2, FGFR1 expression, and hormone resistance. Moreover, during tumor progression there would be an increase in HMW-FGF2 and FGFR1 expression in the tumor epithelium, leading to a switch from a paracrine signaling in the responsive variants to an autocrine or intracrine loop in constitutive and acquired resistant tumors, respectively.

Later, we validated the results in a human breast cancer model using the T47D-WT cell line and its variants: T47D-YA with high expression of PRA and responsive to MFP, and T47D-YB with high expression of PRB and resistant to MFP. By immunofluorescence, immunohistochemistry and *Western blot*, we observed that T47D-YB cells express higher levels of FGFR1, FGFR2, and HMW-FGF2 compared to the T47D-YA cells. By contrast, treatment with LMW-FGF2 induces cell proliferation only in T47D-WT and -YA cells and does not affect cell proliferation in the -YB line. The resistant variant presents higher basal activation of the FGF2/FGFR pathway, evidenced by phosphorylation of FRS2 and activation of the AKT pathway, compared to the responsive cell line. Consistent with the results obtained in the murine model, LMW-FGF2 regulates the activation of the mentioned pathways only in T47D-WT and -YA cells, suggesting a constitutive activation in the resistant cell line. Treatment with BGJ398 significantly inhibits basal and FGF2-induced cell proliferation in the three cell lines, indicating that the FGF2/FGFR pathway has a proliferative role in these cell lines.

Finally, we generated T47D-YA cell line variants over-expressing the 18 and 22,5 kDa FGF2 isoforms, and studied their effect over MFP, TLP, and TAM sensibility. The

over-expression of both isoforms increased cell proliferation and conferred resistance to endocrine therapy compared to the T47D-YA cell line infected with the control plasmid (T47D-YA-Vac). The MFP resistance was confirmed in *in vivo* assays and interestingly, we even observed malignant signs in the primary tumors, particularly in the YA-22,5 kDa cell line. These tumors were able to invade adjacent tissue, such as skin, muscle, and adipose tissue. Only some animals bearing -YA-Vac and -YA-18 kDa primary tumors registered lung metastasis, while 100% of the mice bearing -YA 22,5 kDa tumors presented lung metastasis and had more foci compared to YA-Vac and -YA-18 kDa.

Our results suggest that FGF2 promotes tumor growth in both responsive and resistant tumor variants. However, we believe the underlying mechanisms are not the same, given that in responsive variants the stroma is the main producer of FGF2, which induces tumor growth through its membrane receptors and PR forming a paracrine loop. In resistant tumors, the parenchyma expresses high levels of FGF2 (mostly LMW-FGF2) that triggers proliferative and survival signals through an autocrine loop involving membrane FGFR1, regardless of the presence of progestins or antiprogestins. We still cannot rule out the existence of an intracrine loop, where the intracellular FGF2 (mostly HMW-FGF2) would be responsible for cell proliferation, resistance to antiprogestins, and metastatic dissemination.

Altogether, these findings help to clarify the role of the FGF2 isoforms in breast tumor progression and are the first evidence of endocrine resistance associated to HMW-FGF2.

Key Words: breast cancer, FGF2, FGFR, PR, hormonal resistance.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AP	Antiprogestágenos
ATCC	por sus siglas en inglés: <i>American Type Culture Collection</i>
CK	Citoqueratinas
D1-D3	Dominio tipo inmunoglobulinas (Ig)
DBD	Dominio de unión a ADN
EC	Extracto celular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERE	Elemento Respondedor de Estrógenos
ev	endovenoso
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR	Receptores de factor de crecimiento de fibroblastos
FRE	Elemento Respondedor de FGF
GFP	Proteína fluorescente verde, por sus siglas en inglés: <i>Green Fluorescent Protein</i>
H&E	Tinción con hematoxilina eosina
H ₂ O _d	Agua destilada
HD	Hormono dependiente
HER2/neu	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
HI	Hormono independiente
HIR	Hormono independiente y resistente
HMW	Isoformas de alto peso molecular
HRE	Elemento de respuesta a hormonas
h	Horas
HSPG	Proteoglicanos heparán sulfato
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Ioduro de Propidio
IRES	Sitio Interno de Entrada al Ribosoma
kDa	kilo Dalton
LBD	Dominio de unión a ligando
LMW	Isoformas de bajo peso molecular

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
mARN	Mensajero de ácido ribonucleico
MC	Medio condicionado
MFP	Mifepristona
MMP	Metaloproteasas
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
NLS	Señal de localización nuclear
NSG	ratones <i>NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null</i>
ON	por sus siglas en inglés: <i>overnight</i>
PBS	<i>Buffer</i> fosfato
PKC	Proteína quinasa C
PMSF	por sus siglas en inglés: <i>Phenylmethanesulphonyl fluoride</i>
PRE	Elemento Respondedor de Progestágenos
RA	Receptor de Andrógenos
RE α	Receptor de Estrógenos alfa
RE β	Receptor de Estrógenos beta
RG	Receptor de Glucocorticoides
RH	Receptor de Hormonas esteroideas
RP	Receptor de progesterona
RPA	Isoforma A del receptor de progesterona
RPB	Isoforma B del receptor de progesterona
RTK	Receptor tirosina quinasa
sc	subcutáneo
SERM	Moduladores selectivos del receptor de estrógenos
SFB	Suero fetal bovino
SFBch	Suero fetal bovino depletado de esteroides (<i>charcolizado</i>)
SN	Sobrenadante
TAM	Tamoxifeno
TLP	Telapristona
VEGFR	Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
wt	<i>Wild Type</i>

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo económico de CONICET (Beca tipo I y II), la Fundación Roemmers y Fundación Fiorini, los Subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica PICT N°1244 y PICT N°1091 y el Subsidio de CONICET PIP N°603.

Agradezco a mi directora Caro, que desde lo profesional y personal siempre estuvo a mi lado durante la realización de este trabajo de Tesis. Por guiarme, enseñarme, tenerme paciencia y, sobre todo, por darme libertad para equivocarme, volar y confiar en mí.

Agradezco a todos los chicos del laboratorio, a los que ya no están y los que recién llegan: Pipi, Eme, Lau, Marin, Tommy, María, Colo, Sebas, Vic, Pao, Bruno, Ceci, Cyn, Michelle, Andrés, Sol, Vir, Jime, Aye y Meli. Gracias por hacer cada día diferente, por tantas charlas frutales rodeadas de cactus, delicias culinarias y, si me lo guardaron, el matecito frío y lavado para Anet!

A las grosas, Claudia y Virgi porque me orientaron, corrigieron y ayudaron a armar este trabajo de Tesis. Gracias por criticar, destruir y construir conmigo.

Agradezco también a todas las personas del Instituto que colaboraron de alguna manera en mi formación como científica y persona durante todos estos años; desde el saludo de la mañana de los chicos de seguridad, el cuidado de ratones por el personal del Bioterio, los reactivos prestados y la buena onda en los pasillos y cuartos comunes.

A mis amigos crazy-nerdy Maxo y la Turi, porque desde el primer día de facultad la deliramos y disfrutamos de viajar desde el micro hasta el macro cosmos. Gracias por compartir la pasión por la vida, su origen, funcionamiento y por tanto delirio para explicar lo que no sabemos.

Gracias Wiscacho y Lo Sabías, porque me hacen reír y le dan mucho color a mi vida. Tantos fines de semana de fútbol, pileta, boliche y programa con-ti-nuaaaaaaaaaa-do, viajes inolvidables y ahora trayendo nuevas personitas al mundo, son una fuente de alegría continua!

Gracias a mi familia Sahores-Nelson-Moreno-Ayerza, porque es un collage de parentescos con un corazón de fierro. Gracias por enseñarme que, con esfuerzo y buena voluntad, todo siempre despegar. Gracias a mis dos abuelas, por vivir a fondo y por incentivar-me siempre a que siga el camino de la ciencia.

A mis viejos. Gracias Papo por iluminarme en el pensamiento lateral desde chiquita y por transmitirme un espíritu aventurero sin miedo al ridículo. Gracias vieja por estar siempre al pie del cañón, constante e incondicional. Gracias por tu esencia positiva, trabajo de hormiga y tu ejemplo.

Gracias Max, porque me cambiaste la vida y me haces tan feliz. Gracias, por enseñarme a vivir el momento, “majando la onda” y por apostar a armar una familia juntos. Forever.

Gracias Dios, porque me diste la vida y cada día me regalas salud, amor y fe. Porque no hay forma de que mi mente racional crea que no Estas acá, conmigo, en todo momento. Porque Sos la energía que conecta todo, y, como dice Pasteur, un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia, te acerca a Él.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	17
- HORMONAS Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA	19
o Receptores Hormonales (RH)	20
o Receptores de estrógenos (RE)	21
o Receptores de progesterona (RP)	21
- CÁNCER DE MAMA	23
o Factores de riesgo para el cáncer de mama	23
o Clasificación de los tumores de mama	24
o Tratamiento del cáncer de mama	25
o Progresión tumoral: resistencia, recidivas y metástasis	27
o Mecanismos de resistencia endocrina	27
o Antiprogestágenos	30
- FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGF2)	32
o Estructura génica	33
o Estructura del transcripto	34
o Estructura de la proteína	34
o Expresión	35
o Localización	36
o Funciones en condiciones normales	37
o FGF2 en cáncer	38
- ESTRUCTURA DE FGFR	41
o Activación de la vía	42
o FGFR en cáncer	43
o Potencial terapéutico de FGF2 y sus receptores en cáncer	45
2. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS	49
3. OBJETIVOS	53
4. MATERIALES Y MÉTODOS	55
- Animales	57
- Tumores mamarios murinos	57
- Pasajes tumorales y mantenimiento de los tumores	59
- Cultivos primarios de tumores mamarios	59
- Líneas celulares utilizadas	61

- Descongelado de células desde nitrógeno líquido	62
- Congelados de células en nitrógeno líquido	63
- Repique de líneas celulares y cultivos primarios	63
- Infección lentiviral	63
- Ensayos de proliferación celular	66
- Extractos proteicos tumorales	67
- Extractos proteicos celulares	67
- Cuantificación de proteínas - Método de Lowry	68
- <i>Western blot</i>	68
- Inmunohistoquímica (IHQ)	69
- Inmunofluorescencia (IF)	70
- Detección de GFP	70
- Diseño experimental <i>in vivo</i>	70
- Tratamiento con MFP	71
- Tratamiento con BGJ398	71
- Toma de muestras	71
- Ensayos de metástasis	71
- Obtención de muestras para los ensayos de ELISA	72
- Cuantificación de FGF2 por ELISA	73
- Concentración de los medios condicionados	73
- Análisis estadístico y cuantificaciones	73
5. RESULTADOS	77
6. DISCUSIÓN	135
7. RESUMEN DE RESULTADOS	153
8. CONCLUSIÓN	155
9. REFERENCIAS	157
10. APÉNDICE	181
a. Reactivos y soluciones	187
b. Hormonas, antihormonas y otros reactivos utilizados en cultivo	187
c. Hormonas, antihormonas y otros reactivos utilizados <i>in vivo</i>	187
d. Anticuerpos utilizados	187
e. Plásmidos utilizados	189

INTRODUCCIÓN

*“La actividad más importante que un ser humano puede lograr
es aprender para entender, porque entender es ser libre”*

B. Spinoza

HORMONAS Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria es la estructura que diferencia a los mamíferos de otros animales. Consiste en una estructura anatómica única que produce y secreta leche con el fin de alimentar al recién nacido. Las glándulas mamarias son apéndices epidérmicos que evolucionaron a partir de glándulas sudoríparas apócrinas (Ofstedal 2002). El crecimiento y la maduración del órgano están finamente regulados por factores de crecimiento, hormonas y proteínas de la matriz extracelular.

Al nacimiento, la glándula mamaria murina neonata consiste en cordones epiteliales conectados al pezón por un conducto, su estructura se asemeja a un árbol rudimentario que invade el tejido adiposo. El lumen de los conductos está formado por células epiteliales recubiertas por una capa de células mioepiteliales con capacidad contráctil (Williams & Daniel 1983). Ambos tipos celulares están separados por una lámina basal. Durante la pubertad, debido a la influencia de las hormonas ováricas e hipofisarias, las terminaciones de los conductos se engrosan y forman estructuras denominadas brotes terminales (TEB; por sus siglas en inglés: *Terminal End Bud*), el epitelio mamario prolifera y, a partir de los conductos primarios, surgen ramificaciones laterales que cubren el panículo adiposo. Durante la preñez y en respuesta a hormonas, los conductos se elongan y aumenta el número de ramificaciones laterales, lo que induce la diferenciación lóbulo-alveolar en preparación para la lactancia (Sato *et al.* 2007), se forman estructuras secretorias, acinos, con capacidad de sintetizar y secretar proteínas de la leche (Howard & Gusterson 2000). Finalizada la lactancia, la involución se caracteriza por una apoptosis masiva de las células epiteliales y una extensa remodelación tisular que tiene como resultado una glándula mamaria cuya morfología es similar a la de animales nulíparos (Werb *et al.* 1996).

La influencia endocrina es clave para el desarrollo y la regulación funcional de la glándula mamaria. Es así como la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PRL), sintetizadas y secretadas por la hipófisis, promueven la morfogénesis y lactogénesis mamaria (Trott *et al.* 2008). También se ha informado que el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I), sintetizado tanto en el hígado como en el epitelio y estroma mamarios, cumple un rol relevante durante el desarrollo ductal y la formación de los TEB en la glándula mamaria (Ruan & Kleinberg 1999). Los estrógenos y la progesterona, son fundamentales para inducir la proliferación y morfogénesis de forma directa (Silberstein & Daniel 1982) e indirecta (Lieberman *et al.* 1978). En particular, los estrógenos estimulan el desarrollo ductal durante la pubertad (Nandi 1958) y ambas hormonas median los cambios morfológicos y proliferativos de las ramificaciones laterales de los conductos durante la maduración sexual y la preñez (Woodward *et al.* 1998).

Los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) cumplen un rol central en la señalización río abajo de las hormonas ováricas (Feng *et al.* 2007). Cabe remarcar que estos receptores se expresan tanto en el compartimento epitelial como en el estroma de la glándula mamaria, pero sólo una subpoblación de las células epiteliales luminales los expresa (Zeps *et al.* 1998). A través de un *loop* paracrino en el que participa la proteína anfirregulina (AREG), un miembro de la familia de EGF, las células que expresan los RE y los RP estimulan la proliferación de células vecinas que no expresan estos receptores e inducen la liberación de más factores de crecimiento (por ejemplo, FGF), contribuyendo a un rápido crecimiento de la mama durante la pubertad y la preñez (Ciarloni *et al.* 2007).

RECEPTORES HORMONALES (RH)

Los RH son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción, entre los que se encuentran los receptores de andrógenos (RA), de glucocorticoides (RG), de mineralocorticoides (RM) y los anteriormente mencionados RE y RP.

En ausencia de ligando, los RH suelen encontrarse en el citoplasma asociados a chaperonas de la familia de proteínas de estrés térmico (HSP; por sus siglas en inglés: *Heat Shock Proteins*). Cuando el ligando interactúa con sus receptores, estos sufren un cambio conformacional que permite la disociación de las chaperonas y su dimerización. Durante la activación de los receptores aumenta su grado de fosforilación, a la vez que se expone una señal de localización nuclear (NLS) que permite la traslocación del complejo ligando-proteína al núcleo (Wen *et al.* 1994). Los homodímeros o heterodímeros interactúan con factores de transcripción, proteínas de unión al ADN y co-activadores o co-represores que aumentan o disminuyen la transcripción de los genes regulables por los RH, respectivamente (Beato & Sanchez-Pacheco 1996). Los sitios específicos donde los receptores se unen al ADN se denominan HRE (por sus siglas en inglés: *Hormone Response Element*).

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

- La **región amino terminal**, es el dominio más variable e interactúa con diferentes componentes o proteínas de la maquinaria transcripcional.
- El **dominio de unión a ADN** (DBD; por sus siglas en inglés: *DNA Binding Domain*) se encuentra muy conservado entre los miembros de esta familia y está formado por dos motivos de “dedos de zinc” involucrados tanto en la interacción proteína-ADN (en los HRE) como en la interacción proteína-proteína.

- La **región bisagra o *hinge*** contiene la secuencia NLS y controla el movimiento del receptor hacia el núcleo. Además, participa en la formación de los dímeros.
- El **dominio de unión a la hormona** (HBD; por sus siglas en inglés: *Hormone Binding Domain*) se localiza en la región carboxilo terminal y es el menos conservado entre los RH. El HBD puede contener otra secuencia NLS, aminoácidos de unión a chaperonas o motivos involucrados en la dimerización del receptor.

RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (RE)

Se han descrito dos isoformas de los RE y cada una de ellas es codificada por genes diferentes que se encuentran localizados en distintos cromosomas (Kuiper *et al.* 1997). La primera en describirse fue RE α , con un peso molecular de 67 kDa (Koike *et al.* 1987) y, casi diez años más tarde, en 1996, se clonó el RE β a partir de próstata de rata con un peso molecular de 54 kDa (Kuiper *et al.* 1996).

En humanos, ambas isoformas se expresan en una amplia variedad de tejidos. Sin embargo, se ha documentado una expresión diferencial en algunos tejidos reproductivos como la glándula mamaria, el útero y el ovario. En los dos primeros se detectó una mayor proporción de RE α (RE α /RE β : 9/1; (Saji *et al.* 2000), mientras que en el ovario la expresión de RE β es más abundante (Hewitt & Korach 2003).

Por otro lado, en cáncer, si bien la expresión de isoformas de RE aún no está bien establecida, se ha reportado que los tumores benignos expresan principalmente RE β , mientras que en carcinomas mamarios aumentan los niveles de RE α (Speirs 2002). En la clínica, se utiliza al RE α como un factor pronóstico para predecir la respuesta a la terapia endocrina (ver *Tratamiento del Cáncer de Mama*; de Leeuw *et al.* 2011; Jordan *et al.* 2011; de Leeuw *et al.* 2011).

RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP)

Como se mencionó anteriormente, los RP se han asociado a una variedad de procesos biológicos, como el desarrollo de la glándula mamaria y el mantenimiento de la preñez. Además, los RP se encuentran implicados en procesos celulares como el ciclo celular y el procesamiento de proteínas, así como en el metabolismo y la inducción de eventos de señalización (Li & O'Malley 2003). Tanto en humanos como en roedores, existen dos isoformas de RP denominadas A (RPA) y B (RPB) que se transcriben a partir de un mismo gen controlado por promotores alternativos (Rousseau-Merck *et al.* 1987). La isoforma B contiene 933 aminoácidos y su peso molecular en humanos es de 116 kDa. Por su parte, la isoforma A es más pequeña

porque carece de los primeros 164 aminoácidos y su peso molecular es de 94 kDa (**Figura i-1**). En roedores, el peso molecular de ambas isoformas es de 83 y 115 kDa, respectivamente (Schneider *et al.* 1991).

En la glándula mamaria humana, las isoformas A y B se expresan en cantidades aproximadamente equimolares, mientras que la isoforma A es predominante en la mama murina (relación RPA/RPB: 3/1;(Schneider *et al.* 1991). A partir del cADN del RP humano se caracterizó una tercera isoforma, la C, que se traduce a partir de un codón alternativo. Esta isoforma incluye el segundo dedo de zinc del DBD, posee las secuencias NLS, de dimerización y el HBD (Wei *et al.* 1997). Además, el mismo grupo que la caracterizó por primera vez, describió que RPC aumenta la actividad transcripcional de las restantes dos isoformas (Wei *et al.* 1996), aunque aún no está claro su rol en la glándula mamaria y en cáncer de mama. Varios estudios han demostrado que las isoformas de RP tienen funciones transcripcionales diferentes y que son específicas de cada tipo celular.

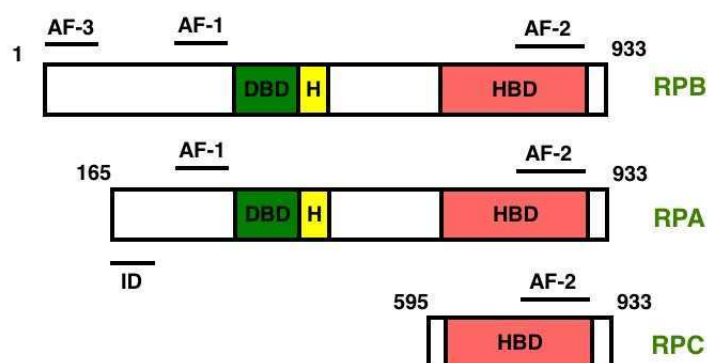


Figura i-1: Estructura de las variantes de RP. Organización de los dominios de las isoformas RPA, RPB y RPC humanas. Se esquematiza la región de unión al ADN (DBD), la bisagra (H) y el dominio de unión a la hormona (HBD). Los números denotan la posición de los aminoácidos para cada isoforma. AF-1, -2 y -3 corresponden a los dominios de activación de la transcripción e ID, al dominio inhibitorio.

Los RP, como la mayoría de los receptores hormonales, son fosfoproteínas y pueden sufrir modificaciones postraduccionales. Hasta el momento, se han identificado 13 residuos serina que pueden ser fosforilados y, de esta manera, activar los receptores. Seis de estos sitios se encuentran solamente en la isoforma RPB, lo que significa que la actividad transcripcional de esta isoforma puede regularse de forma diferencial a la de las otras dos (Abdel-Hafiz & Horwitz 2014). Basalmente, los receptores se encuentran fosforilados en algunos residuos y el tratamiento con progesterona, u otro agonista, estimula la fosforilación de los otros sitios, por ejemplo, en laSer²⁹⁴ (Vicent *et al.* 2006).

Como se mencionó anteriormente, cuando los RP se activan, traslocan al núcleo y al unirse a secuencias PRE (por sus siglas en inglés: *Progesterone Responsive Element*), regulan la transcripción de genes específicos. En los últimos años distintos trabajos han demostrado la interacción de los RP con otros factores de transcripción como CREB en sitios SP1 para regular la expresión de p21(Owen *et al.* 1998), o STAT5 y FGFR2 en el promotor de MYC (Cerliani *et al.* 2011).

CÁNCER DE MAMA

El cáncer es un problema de salud mundial. En la medida en que se controlaron otras causas de mortalidad y la población envejeció, las enfermedades neoplásicas ocuparon un lugar entre las más importantes causales de muerte y discapacidad en el mundo. El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres, luego del cáncer de piel no melanoma, hasta alcanzar el 25% del total de cánceres diagnosticados (Torre *et al.* 2015). Se estima que se producen alrededor de 1,7 millones de casos nuevos por año y que, en el curso de toda la vida, a una de cada ocho mujeres se le diagnosticará esta enfermedad (Fundación para la Investigación y Prevención del Cáncer (FUCA); http://www.fuca.org.ar/cancer_mama.htm) mientras que menos del 1% de los pacientes son hombres. Mundialmente, representa aproximadamente el 15% de la mortalidad por cáncer en el mundo (más de 500.000 mujeres por año), siendo la primera causa de muerte por cáncer en el sexo femenino. Aunque habitualmente se asume que esta patología es esencialmente un problema de las regiones industrializadas, más de la mitad de los decesos ocurren en países de bajos o medianos ingresos (DeSantis *et al.* 2015). La mortalidad por cáncer de mama varía ampliamente de región en región. Para los países del continente americano oscila entre 9,7 por 100.000, en Ecuador y 24,1 por 100.000 en Uruguay (Justo *et al.* 2013). Argentina tiene la segunda tasa de mortalidad en el continente (21,8 por 100.000), lo que se traduce en alrededor de 5.400 muertes por año (<http://www.msal.gov.ar/inc>). El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea y, debido a esto, el diagnóstico y tratamiento puede ser muy diferente entre un paciente y otro.

FACTORES DE RIESGO PARA EL CÁNCER DE MAMA

Si bien se desconocen las causas exactas del cáncer de mama, se han identificado factores que aumentan (o disminuyen) la probabilidad de padecer este tipo de neoplasia, que se denominan “factores de riesgo”. Básicamente, se identifican dos grandes grupos de pacientes:

- **Carcinoma mamario hereditario.** Se debe a mutaciones germinales y representa un 5-10% de los casos (Moller *et al.* 2016). Por ejemplo, las mutaciones en los genes supresores

tumorales BRCA1 y BRCA2 están asociadas a una susceptibilidad hereditaria, fundamentalmente en el desarrollo de tumores de mama y ovario (Petrucci *et al.* 1993). Las mujeres con uno de estos genes mutados tienen hasta un 80-85% de probabilidad de padecer cáncer de mama en algún momento de su vida (Antoniou *et al.* 2008).

- **Carcinoma mamario esporádico.** Representa 90-95% del total y se han identificado múltiples factores de riesgo como:

1) Factores dietarios y de estilo de vida: incluyen el sobrepeso y la obesidad (Copson *et al.* 2015), el consumo de alcohol (Shin *et al.* 2015), el tabaco (Gram *et al.* 2015) y el sedentarismo (Katzke *et al.* 2015).

2) Factores relacionados con procedimientos médicos: incluyen una alta densidad monográfica, alta densidad mineral ósea, radiación torácica en altas dosis y biopsias previas de mama (Visscher *et al.* 2016).

3) Factores reproductivos: la exposición a hormonas ováricas aumenta la probabilidad de contraer cáncer de mama (Carolin & Pass 2000). Es por ello que factores tales como menarca temprana, menopausia tardía, nuliparidad o primera preñez tardía se asocian a un mayor riesgo de padecer esta enfermedad. Se considera que una primera preñez temprana y la lactancia son factores protectores (Anderson *et al.* 2014), que reducen un 4% el riesgo de padecer cáncer de mama, por cada 12 meses de lactancia.

4) Factores hormonales exógenos: una variedad de trabajos apunta a que la administración prolongada de estrógenos, como terapia de reemplazo hormonal (TRH), aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama. Entre ellos, dos estudios epidemiológicos: “*The Women’s Health Initiative Randomized Trial*” (Chlebowski *et al.* 2003) y “*The Million Women Study*” (Beral 2003) reportaron un aumento en la incidencia de esta enfermedad en mujeres que recibían TRH en combinación con un análogo de la progesterona, el acetato de medroxiprogesterona (MPA). Estos estudios sostienen que la progesterona induce un proceso de transformación en la glándula mamaria y que los tumores generados son incluso más invasivos en relación a los de mujeres tratadas sólo con estrógenos (Nelson *et al.* 2002).

CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE MAMA

De acuerdo con su tipo histológico, los carcinomas mamarios se clasifican principalmente en ductales y lobulillares según si se asemejan a conductos o a lobulillos mamarios, respectivamente. Además, los carcinomas ductales y lobulillares se denominan invasivos cuando infiltran el tejido adyacente (CDI y CLI, respectivamente). Por el contrario, cuando el crecimiento tumoral se encuentra circunscrito a los conductos mamarios, sin invadir la membrana basal, los

tumores se clasifican como carcinomas ductales *in situ* (DCIS). La clasificación según el tipo histológico no refleja la heterogeneidad de los tumores en función de su comportamiento biológico y tampoco permite identificar a los pacientes que presentarán mejores respuestas y beneficios con las diferentes modalidades terapéuticas existentes.

En el año 2000, a partir de un trabajo de *Perou y colaboradores*, se ha incorporado lo que denominamos la clasificación molecular de los carcinomas mamarios que se fundamenta en patrones de expresión génica (*Perou et al.* 2000). Originalmente, la clasificación se basó en la expresión de citoqueratinas (CK) de expresión luminal (CK8 y CK18) o de expresión basal mioepitelial (CK5/6 y CK17). En la práctica, la expresión de estas CK se correlaciona con la expresión de los RH. Es decir, aquellos tumores que expresan RE α , expresan CK de tipo luminal y aquellos que no expresan RE α , expresan predominantemente CK de tipo basal. Además, se identificó un tercer grupo con sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER-2) que generalmente no expresa RE α . Por lo tanto, a partir del trabajo de *Perou y colaboradores* y, en consideración a la expresión de los RH, HER-2 y el índice de proliferación, los tumores se pueden clasificar en cuatro grandes grupos con diferentes implicancias pronósticas y de tratamiento:

- Luminales A: RE α (+) y bajo índice de proliferación
- Luminales B: RE α (+) y alto índice de proliferación
- Basales: RE α (-) y HER-2 (-)
- HER-2: RE α (-) y HER-2 (+)

En los últimos años, se han generado múltiples plataformas genéticas que permiten analizar la expresión de genes específicos y predecir el riesgo de metástasis y recurrencia de la enfermedad. Entre ellos se encuentra el *Oncotype DX Assay*, el *MammaPrint Score* y el *PAM50/risk of recurrence* (*Gyorffy et al.* 2015) que hace posible derivar a las pacientes a tratamientos personalizados de acuerdo a su subtipo tumoral.

TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

Existen diversos tratamientos disponibles para el cáncer de mama. Los más frecuentemente utilizados son cirugía, quimioterapia, radioterapia y terapias hormonales o dirigidas (como HER-2 y VEGF).

Actualmente, en la clínica, se dispone de diferentes terapias endocrinas que tienen como blanco exclusivamente al RE α , por lo que se utilizan en tumores de tipo luminal. Para bloquear la acción de los estrógenos se emplean inhibidores de aromatasa o antiestrógenos.

- Inhibidores de aromatasa: actúan reduciendo los niveles endógenos de estrógenos ya que inhiben la enzima encargada de convertir la testosterona en estrógenos (Brodie & Njar 2000). Estas terapias (anastrozole, letrozole y exemestano) inhiben asimismo la producción periférica de estradiol y, por lo tanto, también inhiben sus efectos beneficiosos sobre otros órganos (Hurvitz & Pietras 2008). Es por ello que esta terapia se recomienda casi exclusivamente para mujeres post-menopáusicas (Brueggemeier *et al.* 2005).
- Antiestrógenos: se han desarrollado antiestrógenos puros como el fulvestrant y los moduladores selectivos de la actividad de los RE (SERM; por sus siglas en inglés: *Selective Estrogen Receptor Modulators*) como el tamoxifeno y el raloxifeno (Sestak 2014). Los primeros son bloqueantes específicos que se unen al receptor e inducen un cambio conformacional, lo que impide la dimerización de RE y causa su rápida degradación (Dauvois *et al.* 1993). Al igual que los inhibidores de aromatasa, estos compuestos privan a la paciente de los efectos beneficiosos de los estrógenos endógenos (Howell 2005). Por el contrario, los SERM no inhiben la expresión de RE, sino que modulan su acción de forma específicamente según el tejido en el que incidan. Es así como el tamoxifeno presenta actividad antagonista en mama y agonista en útero, aumentando el riesgo de cáncer de endometrio (Jackson *et al.* 1997). En nuestro laboratorio, proponemos que los antiprogéstágenos también podrían tener efectos beneficiosos en pacientes con cáncer de mama (Ver más adelante: *Antiprogéstágenos*).

Las terapias dirigidas son aquellas que se utilizan para eliminar células tumorales específicas sin dañar o reduciendo al mínimo el daño a las células normales. Entre los blancos terapéuticos específicos más comúnmente utilizados encontramos la sobreexpresión de HER-2 y la activación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; Bachelot *et al.* 2014). Actualmente, existen numerosos ensayos clínicos en ejecución en los que se ponen a prueba nuevos compuestos dirigidos a inhibir el crecimiento celular, inducir la apoptosis de las células tumorales o al menos, inmovilizarlas. Además, si se considera que el cáncer no es una enfermedad de células, sino de tejidos, existen varios estudios que proponen usar como blanco el microambiente tumoral (Egeblad *et al.* 2010).

PROGRESIÓN TUMORAL: RESISTENCIA, RECIDIVAS Y METÁSTASIS

En algunos casos, luego de la cirugía y pese al tratamiento adyuvante, el tumor primario vuelve a crecer en el mismo sitio, sobre la pared del pecho o en otros órganos. Las células tumorales pueden movilizarse hacia zonas distantes por el torrente sanguíneo o el sistema linfático (Mego *et al.* 2010). Los ganglios linfáticos axilares son generalmente el primer sitio donde se alojan estas células y, en estadíos avanzados de cáncer de mama, las células tumorales pueden generar metástasis alojándose en pulmones, huesos o cerebro.

En la mayoría de los casos el tumor recidivante es resistente a la terapia que fue administrada y, generalmente, se debe recurrir a una nueva cirugía y a un nuevo esquema de terapia adyuvante. Existen múltiples mecanismos que pueden contribuir al desarrollo de un fenotipo resistente. Este fenómeno es un problema clínico de primera magnitud ya que, en gran medida, es responsable del fracaso terapéutico y de la mortalidad como resultado de la enfermedad.

MECANISMOS DE RESISTENCIA ENDOCRINA

Aproximadamente 70% de los carcinomas mamarios expresa RH y, como se mencionó anteriormente, estas pacientes son blancos terapéuticos ideales para la terapia endocrina adyuvante. A pesar de expresar RH, un alto porcentaje de tumores son insensibles a la terapia desde un inicio, lo que se denomina “resistencia constitutiva”. Además, con el tiempo, la mayoría de los tumores que inicialmente responde a la terapia hormonal, desarrollan resistencia (“resistencia adquirida”;Gonzalez-Angulo *et al.* 2007; Brewster *et al.* 2008).

Hasta el momento, los moduladores de estrógenos, particularmente el tamoxifeno, han sido y siguen siendo los fármacos más eficaces en el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, alrededor de una tercera parte de las pacientes reincide en la enfermedad dentro de los 15 años del diagnóstico inicial (citado en Osborne & Schiff 2011), lo que impulsa la búsqueda de terapias alternativas. La resistencia a la terapia hormonal puede desarrollarse por múltiples razones que involucran principalmente a los RE, ya sea a nivel de sus ligandos, actividad del receptor o vías de señalización río abajo. Se han propuesto diversos mecanismos para la adquisición de resistencia a la terapia endocrina:

- Hipersensibilidad a estrógenos o pérdida de la expresión de RE α : las células tumorales se adaptan a la falta de estradiol que resulta de la terapia con inhibidores de aromatasa. En consecuencia, los niveles muy bajos de hormona y de su receptor son capaces de inducir una actividad transcripcional potente (Hurvitz & Pietras 2008). También se ha observado que, por presión selectiva en presencia de la terapia endocrina, aproximadamente en un 20% de los

tumores resistentes se seleccionan clones negativos para RE α (Gutierrez *et al.* 2005; Davis 1999; Kuukasjarvi *et al.* 1996). Además, las alteraciones genéticas de RE α (inserciones, deleciones, rearrreglos y mutaciones puntuales) pueden afectar la respuesta a la terapia, ya que dan lugar al silenciamiento de la expresión del RE α (Li *et al.* 2013; Gutierrez *et al.* 2005) o a la expresión de un receptor truncado carente del dominio de unión al ligando (Robinson *et al.* 2013). En un trabajo de Toy y colaboradores, se describe que, en estos casos, el receptor adquiere una conformación de agonista, lo que implica una activación constitutiva de la vía, aún en ausencia del ligando (Toy *et al.* 2013). Llamativamente, algunas de estas mutaciones se han descrito en metástasis y no se las encuentra en los tumores primarios, lo que sugiere que el mecanismo de resistencia involucra evolución clonal (Jeselson *et al.* 2014).

-Cambios en la actividad transcripcional de RE α : la actividad del RE α depende de co-activadores y co-represores que modulan la función del receptor. Algunos estudios describen que la expresión elevada del co-activador AIB1 reduce la eficacia del tratamiento con tamoxifeno (Osborne & Schiff 2011; Hurvitz & Pietras 2008) y está relacionada a un peor pronóstico (Alkner *et al.* 2010). La pérdida de expresión del co-represor NCoR se asocia también a la resistencia al tamoxifeno (Lavinsky *et al.* 1998).

-Pérdida de expresión de los RP: algunos trabajos asocian la expresión de los RP con una mejor respuesta a la terapia endocrina. Las pacientes RE α (+) y RP (+) tienen una importante reducción del riesgo relativo de recurrencia y muerte, en comparación a las pacientes RE α (+) y RP (-) (Arpino *et al.* 2005; Normanno *et al.* 2005). Debido a esto, se postula que la pérdida de expresión de los RP podría ser una posible causa de resistencia endocrina (Hurvitz & Pietras 2008).

-Cambios en el metabolismo del tamoxifeno: otros autores sostienen que la resistencia podría deberse a un polimorfismo genético en la enzima citocromo (CYP2D6), que metaboliza el tamoxifeno a su metabolito más activo, el endoxifeno (Normanno *et al.* 2005; Hurvitz & Pietras 2008). Alrededor de 8% de las mujeres caucásicas posee una variante mutante de esta enzima y presentan mayor riesgo de recurrencia tumoral (Hoskins *et al.* 2009).

-Cambios en la sensibilidad/producción de factores de crecimiento: una expresión alterada de algunos factores de crecimiento también puede contribuir a la generación de un fenotipo resistente endocrino (Normanno *et al.* 2005; Hurvitz & Pietras 2008). Las células tumorales se independizan de los estrógenos para crecer y proliferan en presencia de EGFR (Stotter & Walker 2010; Nicholson *et al.* 1993), HER-2 (Dowsett *et al.* 2005; Gutierrez *et al.* 2005), IGF-I y TNF α , entre otros (Arpino *et al.* 2008; Shou *et al.* 2004; Schiff *et al.* 2004). Además, se ha descrito que

la ausencia prolongada de estrógenos puede inducir directamente a la transcripción de estos factores de crecimiento, lo que resulta en una actividad aumentada de sus mediadores río abajo y mayor proliferación celular, lo que finalmente provoca un crecimiento tumoral independiente del ligando (Yarden *et al.* 2001; Salvatori *et al.* 2003; Gutierrez *et al.* 2005).

- Alteraciones en la activación de vías de señalización como PKC α , MAPK y AKT: algunos trabajos sugieren que las vías de señalización de los receptores tirosina-quinasa, PKC α y MAPK participan en la resistencia hormonal al modular la localización subcelular de co-reguladores del RE α (Hurvitz & Pietras 2008). Además, se observó que ERK1/2 fosforila al RE α en la Ser¹¹⁸ y transactiva a los receptores en ausencia de estradiol (Kato 2001). De hecho, un incremento en los niveles de ERK1/2, o en su actividad, correlaciona con una peor respuesta al tratamiento hormonal y con una menor supervivencia (Gee *et al.* 2001). Por otro lado, AKT fosforila al RE α en la Ser¹⁶⁷ y conduciría a una activación independiente del ligando (Martin *et al.* 2000). Un estudio preclínico de DeGraffenried y colaboradores asocia la sobreexpresión de AKT con la resistencia endocrina y propone que el tratamiento con un inhibidor de la vía AKT restaura la sensibilidad a la terapia hormonal (DeGraffenried *et al.* 2004).

- Inflamación y sistema inmune: múltiples trabajos apuntan a que el sistema inmune es un regulador clave en el desarrollo y la diseminación tumoral. Las células infiltrantes del sistema inmune producen citoquinas, proteinasas, quemoquinas y factores de crecimiento que promueven el remodelado de la matriz extracelular y la angiogénesis. De hecho, se ha reportado que algunas de estas citoquinas (IL6, IL1 β y TNF, entre otras) están asociadas a la supresión de RE α en cáncer de mama (Murray *et al.* 2015). Los macrófagos asociados al tumor se relacionan con angiogénesis y sobrevida (Leek *et al.* 1996), como así también con la progresión del cáncer hacia estadios metastásicos (Lin *et al.* 2001). Hagemann y colaboradores reportaron que los macrófagos son capaces de producir estrógenos que estimulan directamente la proliferación de células tumorales ER α (+) (Hagemann *et al.* 2005) y, en consecuencia, la presencia de macrófagos intratumorales podría llevar a la resistencia endocrina (Paik *et al.* 2004).

- Otros factores: desde 1985 se propone que las células con características “stem” podrían estar relacionadas con la resistencia endocrina en cáncer de mama (Osborne *et al.* 1985). Varios trabajos describen que, tanto la radioterapia como la quimioterapia aumentan el porcentaje de la población “stem” intratumoral (Eyler & Rich 2008; Creighton *et al.* 2009) y que estas células raramente expresan RE α (Schillace *et al.* 2014). Otros trabajos relacionan a la matriz extracelular y los componentes estromales (entre ellos, los fibroblastos asociados a tumor o FAT, por sus siglas en inglés) con la progresión de la enfermedad (Paulsson & Micke 2014; Dittmer &

Leyh 2015). *Simian y colaboradores* describen cómo el medio condicionado de FAT induce resistencia al tamoxifeno en células sensibles de cáncer de mama (Simian *et al.* 2009).

En conjunto, la resistencia endocrina puede deberse a un cambio en el fenotipo de las células tumorales como en el microambiente tumoral. La desregulación en la expresión de un gen o a cambios más complejos en la activación de vías mitogénicas pueden causar este *switch* (Hurvitz & Pietras 2008). Los mecanismos son múltiples e incluyen desde alteraciones en los niveles de estrógenos intratumorales, a cambios en la respuesta inmunitaria o endocrina del huésped, pasando por trastornos en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antiestrógenos. Pese a que son importantes los avances en los estudios de resistencia endocrina, en la actualidad, los mecanismos causantes de los fenotipos resistentes permanecen inciertos y aún no existen métodos efectivos para prevenirlos (Johnston 2009).

ANTIPIROGESTÁGENOS

Los antagonistas hormonales sintéticos son extremadamente útiles como herramientas clínicas y experimentales. En algunos países, los antiprogéstágenos, en particular la mifepristona (MFP), son utilizados como abortivos ya que desencadenan el trabajo de parto (Schaff 2010; Raymond *et al.* 2013). En los últimos años, ha aumentado el interés del estudio de los antiprogéstágenos como potenciales tratamientos para tumores que expresan RH o para los que generaron resistencia a la terapia endocrina convencional. Mientras tanto, se los utiliza como herramientas para estudiar los mecanismos moleculares de la acción hormonal.

Los antiprogéstágenos pueden actuar en todos los niveles de acción hormonal, ya sea en la activación del receptor, su dimerización o su unión a secuencias específicas en el ADN (Guiochon-Mantel *et al.* 1994). Cada antiprogéstágeno posee distinta potencia inhibitoria que está controlada por su afinidad por los RP y la afinidad del complejo antagonista-receptor por los sitios PRE, entre numerosos otros factores (revisado en Goyeneche & Telleria 2015).

Básicamente, según su modo de acción, los antiprogéstágenos se dividen en tres categorías:

- Tipo 1: inhiben la fosforilación de los RP e impiden la unión directa a los sitios PRE (ZK98299 u onapristona; (Gass *et al.* 1998). Se comportan sólo como antagonistas.
- Tipo 2: permiten tanto la fosforilación de los RP como la unión a sitios PRE, pero bloquean la activación de la transcripción en determinados genes (MFP y acetato de telapristona; (Klijn *et al.* 2000). Muestran potencial agonista cuando se estimula

la vía PKA en cultivo (Beck *et al.* 1993) y cierta actividad agonista según la especie y el tejido específicos.

- Tipo 3: permiten el pegado de los RP a los sitios PRE, aunque bloquean la transcripción génica (ZK230211 o lonaprisan; (Afhuppe *et al.* 2010). Tienen actividad puramente antagonista para ambas isoformas de los RP.

Mifepristona (MFP o RU486)

Se trata de un potente antagonista de la progesterona y de glucocorticoides, ya que se une con alta afinidad a ambos receptores (Colucci & Ortlund 2013), induce su dimerización y unión al ADN, pero no permite su actividad transcripcional (Sitruk-Ware & Spitz 2003). Algunos autores han explicado que la unión de MFP a los RP induce el reclutamiento de co-represores en ciertos genes (Jackson *et al.* 1997; Wargon *et al.* 2015). La constante de disociación para el RP humano y de roedores es de aproximadamente 2×10^{-9} M, similar a la del progestágeno sintético R5020 y cinco veces más afín que la progesterona (Horwitz 1992). Principalmente, la MFP ha demostrado ejercer un efecto antiproliferativo en tumores sensibles a la progesterona, ya sea de ovario (Gamarra-Luques *et al.* 2014), útero (Segovia-Mendoza *et al.* 2015) o mama (Klijn *et al.* 2000; Lanari *et al.* 2012; Giulianelli *et al.* 2013). Dado que la MFP también se une a RG, se ha reportado un efecto beneficioso en otros tipos de cáncer (Check *et al.* 2010; Tieszen *et al.* 2011). Algunos autores reportan que a concentraciones de 20 μ M, la MFP induce citostasis (Goyeneche *et al.* 2007), descenso en los niveles de Cdk2 (Tieszen *et al.* 2011) y reorganización de la morfología celular (Brandhagen *et al.* 2013) en una variedad de líneas tumorígenicas *en cultivo*.

Acetato de telapristona (PROELLEX®)

Es un modulador selectivo de la actividad de los RP con mínima actividad antiglucocorticoide (Gupta *et al.* 2013). La telapristona se une al RG con una afinidad 22 veces menor que la MFP (Wiehle *et al.* 2011) y un trabajo de Attardi y colaboradores reporta que la telapristona es dos o tres veces menos potente que la MFP en su unión al RP (Attardi *et al.* 2002). Concentraciones micromolares de telapristona inducen apoptosis en cultivos primarios de carcinomas uterinos (Luo *et al.* 2010) y en líneas celulares de cáncer de ovario (Gamarra-Luques *et al.* 2012; Gamarra-Luques *et al.* 2014). Con respecto al cáncer de mama, se ha reportado que este antiprogestágeno (1 μ M) induce cambios morfológicos en la línea T47D e inhibe el crecimiento independiente de anclaje (Gupta *et al.* 2013). Además, inhibe la proliferación celular de esta línea, al inducir un arresto en G0/G1 y un descenso en los niveles de EGFR y del

transcripto de la isoforma B del RP (Gupta *et al.* 2013). La telapristona inhibe la aparición de tumores de mama inducidos por NMU en un modelo de carcinogénesis química en rata (Wiehle *et al.* 2011) e induce la regresión tumoral en un modelo *in vivo* (Wiehle *et al.* 2007). Algunos estudios clínicos han reportado efectos beneficiosos en pacientes con lesiones endometriales y fibrosis uterina.

FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO TIPO 2 (FGF2)

El factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), también conocido como FGF básico (bFGF), es uno de los miembros más importantes de la familia de proteínas FGF. En el humano se han descrito 22 miembros que dividen en seis subfamilias según diferencias en la homología de sus secuencias y en la filogenia (Itoh & Ornitz 2004). Cada miembro se encuentra codificado en distintos cromosomas, lo que indica que, a lo largo de la evolución, sufrieron duplicaciones y traslocaciones entre los cromosomas (Maruoka *et al.* 1998; Itoh & Ornitz 2008). Todos los FGF comparten una región central que consiste en 120-130 aminoácidos ordenados en 12 láminas antiparalelas (β 1- β 12) flanqueada por extremos amino y carboxilo terminales variables. Los FGF pueden unirse con alta afinidad a una familia de receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa y, hasta el momento, se han descrito cinco de estos receptores (FGFR1-R5, ver *Estructura de FGFR*). Los FGF también pueden unirse, aunque con menor afinidad, al heparán sulfato (HS) que se localiza en la matriz extracelular. De hecho, se ha demostrado que los FGF deben formar un complejo con el HS para activar sus receptores y, a su vez, gatillar señales intracelulares.

El FGF2 fue inicialmente purificado a partir de hipófisis bovinas como una proteína que estimulaba la proliferación de células NIH-3T3 (Maciag *et al.* 1979). Unos años después, se purificó otro miembro destacado de esta familia, pero que, por poseer un punto isoeléctrico ácido, se lo denominó factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF/FGF1; Thisse & Thisse 2005). La mayoría de los FGF (excepto FGF1, FGF2, FGF9, FGF16 y FGF20) poseen una señal peptídica de secreción. Se ha reportado que tanto FGF1 como FGF2 se secretan por una vía independientemente de Golgi (Nickel 2005).

Habitualmente, se considera a los FGF como factores paracrinos y se los conoce por su rol clave en la gastrulación, el desarrollo de órganos durante la embriogénesis (Amaya *et al.* 1991) y la organización de tejidos como la piel (Werner 2011) y los pulmones (Peters *et al.* 1994). Específicamente, el FGF2 induce la proliferación de células de origen mesodérmico, ectodérmico, neuro ectodérmico y endodérmico (Maciag *et al.* 1979). Además, se ha descrito

que modula la motilidad (Cheng *et al.* 2014), diferenciación (Fei *et al.* 2011) y supervivencia (Turner *et al.* 2011) de células en cultivo.

Estructura Génica

El gen del FGF2 humano consiste en 70.990 pares de bases, está compuesto por un extremo 5'UTR, tres exones, dos intrones y un extremo 3'UTR extremadamente largo ; **Figura i-2**). Ambos extremos contienen varios elementos que regulan la expresión de FGF2 en respuesta a factores de crecimiento, densidad celular, neurotransmisores, hormonas y segundos mensajeros. El promotor principal se ubica desde -1800 hasta +314 (relativo al sitio de transcripción +1) y no contiene los típicos motivos consenso CATT o TATA (Shibata *et al.* 1991). La región distal -512/-854 contiene un dominio de regulación negativa, un elemento dependiente de la densidad celular (-512/-650), un elemento respondedor a factores de crecimiento (-512/-554) con sitios de unión para el factor de transcripción STAT y un elemento respondedor a la proteína quinasa C (PKC) y al AMPc (-556/-624). La región proximal -511/+314 mantiene una transcripción basal baja y contiene sitios de unión específicos para factores de transcripción que incluyen a las proteínas AP-1, p53 (salvaje y mutante) Sp1 y el factor EGR1 (Detillieux *et al.* 2003). El promotor también contiene medio sitio PRE, por lo que la progesterona misma podría regular la expresión de FGF2. Esto se analizará más adelante.

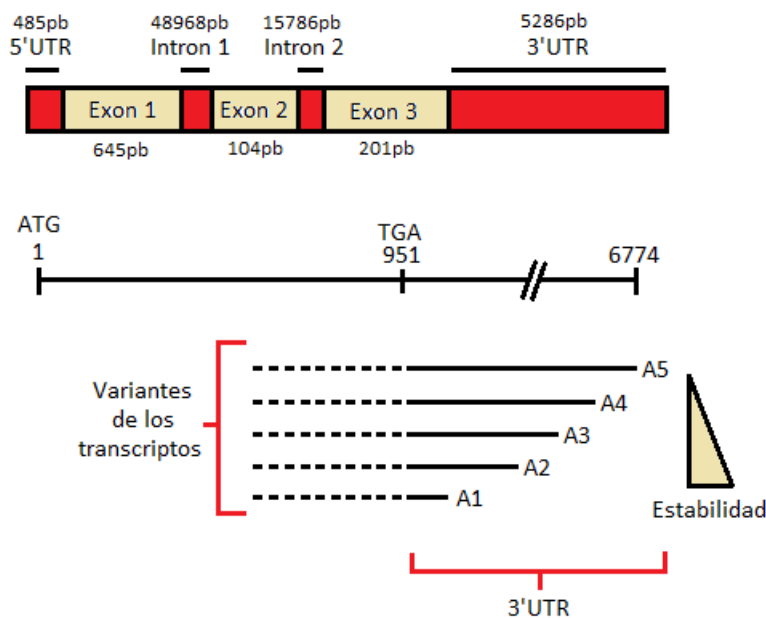


Figura i-2 Representación esquemática del gen de FGF2 humano y sus transcritos. Los rectángulos amarillos representan las regiones codificantes y los UTR corresponden a las regiones no traducidas. El codón de inicio de la traducción es el ATG y el codón de finalización, el TGA. A1 corresponde al primer sitio de poliadenilación. Esquema modificado del “Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology” (atlasgeneticsoncology.org).

Estructura del transcripto

El extremo 3'UTR es rico en nucleótidos A y U y contiene múltiples elementos reguladores que regulan la poliadenilación, el inicio de la traducción y la estabilidad del ARNm. El transcripto cuenta con un único *enhancer* de la traducción localizado en el extremo 3'UTR, río arriba inmediatamente después del sitio de poliadenilación más distal (+5404/+6775). El *enhancer* participa en la selección activa del sitio de poliadenilación y en la modulación del uso de sitios alternativos del inicio de la traducción. Además, un elemento desestabilizador modula la estabilidad del ARNm y se sitúa entre los dos primeros sitios de poliadenilación (+1019/+3326; (Touriol *et al.* 1999; Touriol *et al.* 2000). El transcripto más largo contiene 6774 nucleótidos y seis sitios de poliadenilación alternativos en el extremo 3'UTR. El uso de los sitios alternativos de poliadenilación genera una variedad de transcriptos que contienen la misma secuencia codificante pero diferentes longitudes del extremo 3'UTR que, a su vez, contienen elementos reguladores. Debido a esto, la estabilidad de los transcriptos varía según la longitud del extremo 3'UTR, por lo tanto, cuanto más cortos sean los transcriptos, tanto más estables serán.

Estructura de la proteína

La traducción del FGF2 humano puede iniciarse en uno de los cinco codones para luego generar cinco isoformas de diferente peso molecular (**Figura i-3**). Todas las isoformas contienen una secuencia de localización nuclear (NLS) en el extremo carboxilo terminal. La isoforma liviana de 18 kDa es la más estudiada y se traduce a partir del codón AUG por un mecanismo dependiente de Cap. Por otro lado, las isoformas pesadas o de alto peso molecular (HMW-FGF2) de 22, 22,5, 24 y 34 kDa se originan por traducción alternativa a partir de diferentes codones CUG (Prats *et al.* 1989). Además, en el extremo amino terminal estas isoformas contienen dominios con repeticiones de ácido glutámico y arginina (GR) que actúan como NLS (Dono *et al.* 1998a). Las isoformas de 22, 22,5 y 24 kDa se traducen por un mecanismo dependiente de IRES (por sus siglas en inglés: *Internal Ribosome Entry Site*), mientras que la isoforma de 34 kDa depende de Cap (Arnaud *et al.* 1999). Además, esta isoforma contiene un NLS adicional con estructura similar a la proteína *Rev* del virus de la inmunodeficiencia humana, por lo que se postula que tendría un comportamiento distinto al resto de las HMW-FGF2, en cuanto a la regulación de su traducción y su localización nuclear (Chlebova *et al.* 2009).

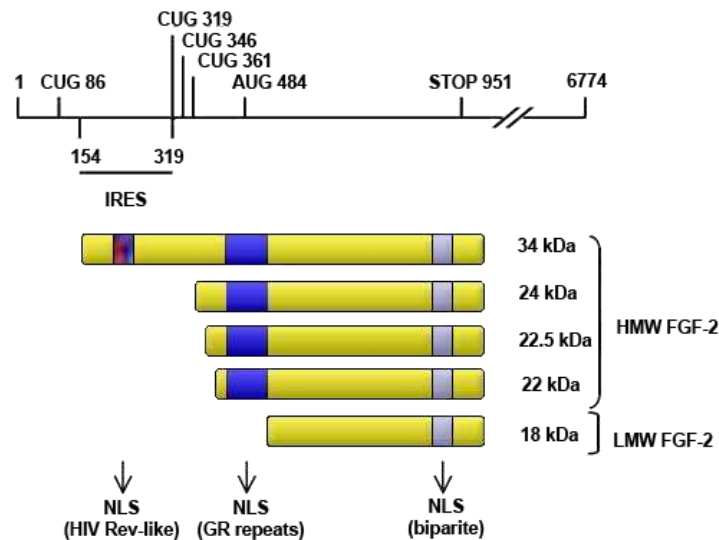


Figura i-3: Representación esquemática de las distintas isoformas del FGF2 humano generadas por traducción alternativa del mismo transcrito. Se ilustra el codón clásico de inicio de la traducción AUG-metionina y los cuatro codones alternativos CUG-leucina. IRES corresponde al Sitio Interno de Entrada del Ribosoma y NLS a la Secuencia de Localización Nuclear presente en todas las isoformas. Esquema modificado del “Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology” (atlasgeneticsoncology.org).

Se ha descrito que en otras especies también existen múltiples isoformas de FGF2 y, particularmente en el ratón las isoformas pesan 17, 20, 20.5 y 30 kDa (Florkiewicz & Sommer 1989). La estructura en tres dimensiones de la isoforma liviana ha sido estudiada por varios grupos de investigación (Zhu *et al.* 1991; Moy *et al.* 1996), pero, hasta la fecha, no hay evidencia respecto de la estructura proteica de las isoformas pesadas. Se hipotetiza que todas las isoformas tienen una conformación espacial semejante porque comparten los mismos residuos estructurales. Sin embargo, aún queda por ver si esta hipótesis es correcta.

EXPRESIÓN

La expresión de FGF2 depende del tipo de tejido y estadio de desarrollo. Las células diferenciadas también varían sus niveles de FGF2 debido a que, al regular la poliadenilación tanto el fenotipo celular, como el ambiente pueden afectar la longitud del transcrito y la expresión de las diferentes isoformas por regulación post-transcripcional (Touriol *et al.* 1999). La mayoría de las células usan casi exclusivamente el sitio de poliadenilación más distal y es por esto que generan el transcrito más largo. El transcrito que contiene el extremo 3'UTR completo y todos los elementos reguladores, finalmente da lugar a la isoforma liviana de 18 kDa. Por el contrario, en las células transformadas o en condiciones de estrés, existe una preferencia por el sitio de poliadenilación más proximal, lo que genera transcritos con un extremo 3'UTR

considerablemente más corto y carentes de los elementos reguladores críticos (Vagner *et al.* 1996). Por lo general, estos transcritos se traducen desde los codones alternativos CUG y generan las isoformas pesadas.

Además, en un estudio con diferentes tipos celulares humanos se ha advertido que las isoformas pesadas son típicas de células inmortalizadas y transformadas, mientras que las células primarias sintetizan casi exclusivamente la isoforma liviana (Vagner *et al.* 1996). Más aún, las HMW-FGF2 son inducidas cuando las células normales se someten a *shock* térmico y estrés oxidativo, lo que sugiere que el fragmento IRES, localizado río arriba del codón de inicio de la traducción CUG, es activado por estímulos de estrés.

La expresión de FGF2 puede clasificarse en dos patrones diferenciales (Bugler *et al.* 1991): el primero de ellos, caracterizado por altos niveles de LMW-FGF2, iniciado por el codón AUG y acompañado de niveles bajos o casi indetectables de las isoformas HMW-FGF2. Este patrón se observa en células normales, tales como fibroblastos derivados de la piel, células epiteliales de la retina y células endoteliales de la aorta. En contraste, el segundo patrón, definido por altos niveles de isoformas HMW-FGF2 y niveles bajos o casi nulos de la isoforma LMW-FGF2, se observa en células transformadas (Couderc *et al.* 1991), como por ejemplo, carcinomas de útero (células HeLa) y páncreas (células MIA PaCa-2) y adenocarcinomas de hígado (células SK-Hep-1), mama (células MCF-7) y colon (células HT-29).

LOCALIZACIÓN

La localización subcelular del FGF2 es esencial para cumplir funciones biológicas específicas y está determinada por el tipo celular, el nivel de diferenciación, las fases del ciclo celular y la densidad celular. Pueden ocurrir cambios en la distribución de las isoformas en respuesta a señalización por AMPc y PKC, así como en la densidad y estrés celular y modificaciones postraduccionales (Pintucci *et al.* 1996; Vilgrain *et al.* 1993).

Comúnmente, la isoforma LMW-FGF2 se acumula en la matriz extracelular donde se encuentra asociado al HS (Renko *et al.* 1990) y a la membrana basal. El factor de crecimiento es secretado a través de una vía no clásica (Mignatti & Rifkin 1991; Mignatti *et al.* 1992) dado que carece de la secuencia consenso en su extremo amino terminal. Se han descrito numerosas proteínas proteolíticas que clivan al factor de crecimiento (Yeoman 1993) y permiten su unión a los receptores de membrana. Además, la fosforilación de FGF2 modifica su afinidad por los FGFR y permite la liberación de FGF2 de la membrana basal (Plouet *et al.* 1988). Dentro de la célula, el LMW-FGF2 se encuentra principalmente en el citoplasma (Renko *et al.* 1990), aunque también puede traslocar al núcleo (Baldin *et al.* 1990; Sheng *et al.* 2004). Se considera que,

debido a su localización, esta isoforma es responsable de los efectos paracrin y autocrinos del FGF2 (Ornitz & Itoh 2001).

Las isoformas HMW-FGF2 están predominantemente localizadas en el núcleo (Chook & Suel 2011) dado que cuentan con una serie de repeticiones de aminoácidos GR (Glu/Arg) que actúan como un NLS (Arese *et al.* 1999). Además, estas isoformas son responsables de los efectos intracrin del FGF2 (Delrieu 2000). Sin embargo, son capaces de migrar al citoplasma y pueden ser secretadas a través del brote de vesículas a partir de la membrana plasmática como resultado de daño o muerte celular que compromete la integridad de la membrana (Taverna *et al.* 2003).

FUNCIONES EN CONDICIONES NORMALES

El FGF2 es una molécula con múltiples funciones y participa en una variedad de procesos biológicos tales como la angiogénesis, el desarrollo embrionario (cerebro, corazón, músculos, hueso, sangre, ojos y piel, entre otros) y la cicatrización (Yanagisawa-Miwa *et al.* 1992). Los ratones *K.O* para FGF2 son viables, aunque tienen problemas de desarrollo cerebral, regulación de la presión arterial (Dono *et al.* 1998b), cicatrización y osteogénesis (Ortega *et al.* 1998). En los últimos años se ha intentado dilucidar las funciones específicas de las isoformas de FGF2.

Función de LMW-FGF2. En su mayoría, los trabajos atribuyen un rol predominantemente migratorio a la isoforma liviana (Garmy-Susini *et al.* 2004). Sin embargo, se ha descrito que también tiene un efecto estimulador de la proliferación celular (Bailly *et al.* 2000), de la diferenciación celular (Giampietri *et al.* 2000) y cumple un rol crítico en la angiogénesis (Ishihara *et al.* 2006), reparación de heridas, en el desarrollo embrionario y mantenimiento del tono vascular (Unger *et al.* 1994).

Función de HMW-FGF2. A estas isoformas se les atribuye un rol predominantemente proliferativo (Quarto *et al.* 1991), sobre todo en condiciones de bajo suero (Arnaud *et al.* 1999), por lo que se las postula como factores de supervivencia. No obstante, en condiciones normales, este efecto varía según el tipo celular estudiado y los niveles de expresión de HMW-FGF2. Además, se ha reportado que la expresión de las isoformas pesadas induce la diferenciación celular (Sherman *et al.* 1993; Cowan *et al.* 2003), regula positivamente las moléculas asociadas con la adhesión celular y estabiliza complejos de adhesión focal en una variedad de tejidos (Korah *et al.* 2004), lo que les otorga participación en la migración celular. La mayoría de las funciones de las isoformas HMW-FGF2 requiere una localización nuclear y son independientes de los FGFR de membrana (Yu *et al.* 2007; Sorensen *et al.* 2006). De hecho, se ha reportado que estas isoformas interactúan con la proteína nuclear FIF (55 kDa; interactúa específicamente

con FGF2, no con FGF1, FGF3 ni FGF6), que tiene actividad anti-apoptótica (Van den *et al.* 2000).

FGF2 EN CÁNCER

Dado que el FGF2 desempeña un rol crítico en el desarrollo y la homeostasis de múltiples sistemas y órganos, se ha descrito la expresión desregulada en numerosas patologías y neoplasias (Wesche *et al.* 2011).

En estudios en cultivo con líneas celulares tumorales se observó que el FGF2 no sólo contribuye al crecimiento sino también a la progresión tumoral, aumentando la invasión tumoral y resistencia a la terapia. En las líneas de cáncer de ovario OVCA3 y SKOV3 se observó que el tratamiento con FGF2 estimula la invasión (Lin *et al.* 2003b; Lin *et al.* 2003a; Zhang *et al.* 2003) y confiere una mayor resistencia al cisplatino en cultivo. También se ha reportado que la sobreexpresión de las HMW-FGF2, particularmente la de 24 kDa, induce un fenotipo radio-resistente en fibroblastos NIH-3T3 y en la línea celular HeLa derivada de un carcinoma de cuello de útero (Delrieu *et al.* 1998; Cohen-Jonathan *et al.* 1997). Asimismo, en un trabajo reciente con células de cáncer de mama que no expresan RH, se demuestran que el FGF2 nuclear promueve quimiorresistencia (Li *et al.* 2015).

Al evaluar por inmunohistoquímica tejidos malignos de distintos orígenes, como gliomas, cáncer de ovario (Le Page *et al.* 2006) y adenocarcinomas esofágicos (Barclay *et al.* 2005) se observaron niveles elevados de FGF2 en comparación con los tejidos sanos. Además, en cáncer de páncreas, los tumores positivos para FGF2 exhiben mayores índices de proliferación, tanto en células tumorales como en endoteliales en comparación con tumores que no expresan el factor de crecimiento (Yamazaki *et al.* 1997).

Los niveles de expresión de FGF2 también se correlacionan con la progresión tumoral, encontrándose una mayor capacidad invasiva y metástasis en carcinomas gástricos (Ueki *et al.* 1995; Zhao *et al.* 2005), de páncreas y tumores astrocíticos (Zagzag *et al.* 1990) en comparación con tumores con baja expresión de FGF2. Además, los niveles de FGF2 están asociados a una reducción en la tasa de supervivencia de los pacientes con sarcoma de Kaposi, carcinomas esofágicos, pancreáticos (Yamanaka *et al.* 1993) y tumores astrocíticos (Takahashi *et al.* 1992). Varios trabajos indican que la sobreexpresión del ligando está asociada al desarrollo de quimiorresistencia en pacientes con carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC), linfoma no-Hodgkins, leucemia linfocítica crónica (Menzel *et al.* 1996) o cáncer de ovario (Gan *et al.* 2006). Este efecto podría deberse a que el FGF2 media la supervivencia de las células tumorales

al aumentar los niveles de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL y, a su vez, inhibe la apoptosis a través de la vía de MEK-2 (Pardo *et al.* 2002).

Si bien, el consenso es que la expresión de FGF2 está asociada a un mal pronóstico, para algunos tipos de tumores, como el cáncer colorrectal, la evidencia en la literatura es contradictoria (Tabara *et al.* 2001). Se ha descrito que, en tumores colorrectales, los niveles de FGF2 están significativamente reducidos en comparación con el tejido adyacente no tumoral (Landriscina *et al.* 1998); (Mathonnet *et al.* 2006). Como dato interesante, los mismos autores especulan que esta diferencia en la intensidad de la inmunomarcación podría deberse a que el tejido tumoral secreta altos niveles de FGF2 en comparación con el tejido normal. En línea con esto último, numerosos grupos de trabajo describen que los pacientes con carcinoma gástrico, de vejiga (Gazzaniga *et al.* 1999), de ovario (Le Page *et al.* 2006), hepatocelular (Hsu *et al.* 1997; Poon *et al.* 2001; Uematsu *et al.* 2005), renal (Fujimoto *et al.* 1991; Horstmann *et al.* 2005) y con neoplasia endocrina familiar múltiple de tipo I (MEN-1), sarcoma de Kaposi (Ascherl *et al.* 2001) o cáncer colorrectal (George *et al.* 2002) poseen niveles elevados de FGF2 séricos en comparación con el suero de pacientes sanos. Se ha reportado que, en el caso de los tumores hipofisarios, los niveles séricos descienden luego de la cirugía o del inicio de la terapia con el quimioterápico bromocriptina (Zimering *et al.* 1993).

Los niveles séricos de FGF2 también se correlacionan con un peor pronóstico, ya que en pacientes con hepatocarcinomas, están asociados a un aumento en el tamaño y la vascularización tumorales, además de mayor agresividad y metástasis. Asimismo, varios grupos de trabajo reportaron niveles significativamente mayores de FGF2 circulante en pacientes con tumores renales (Horstmann *et al.* 2005) y cáncer colorrectal (George *et al.* 2002) metastáticos, en comparación con pacientes no metastáticos. Se asociaron altos niveles séricos de FGF2 con una reducción en la supervivencia de los pacientes y, consistente con esto, los pacientes con niveles séricos inferiores tuvieron más tiempo libre de enfermedad. Más aún, en pacientes con cáncer de vejiga, los niveles elevados de FGF2 en suero y también en orina se asocian a una recurrencia temprana, tal vez debido a que el FGF2 aumenta la expresión de Bcl-2 (Nguyen *et al.* 1994). Además, se ha reportado que los pacientes con mieloma múltiple que responden a la terapia, presentan niveles de FGF2 en suero significativamente menores a los no respondedores (Sezer *et al.* 2001). Conjuntamente, estos hallazgos demuestran que los niveles de expresión de FGF2, tanto intratumorales como en suero, se correlacionan positivamente con la progresión y metástasis y, negativamente, con el pronóstico y la supervivencia de los pacientes con una variedad de tipos de neoplasias.

En consideración a lo expuesto en los párrafos anteriores, la expresión de FGF2 podría ser un evento clave en la tumorigenicidad de varios tipos de cáncer y la expresión del factor podría ser necesaria para el crecimiento sostenido de una variedad de tumores. Los hallazgos indican que los niveles de FGF2 en los tumores y en el suero proveen información útil con respecto al crecimiento tumoral, la resistencia a medicamentos y la invasión, metástasis y recurrencia.

FGF2 asociado al cáncer de mama. Con respecto a la expresión y el rol del FGF2 en el cáncer de mama, la evidencia en la literatura es aún escasa y contradictoria. Se ha reportado que, en cultivos celulares la expresión de FGF2 es típica de las líneas celulares normales, mientras que las líneas celulares malignas, como por ejemplo MCF-7, T47D, ZR-75-1 y MDA-MB-231, expresan bajos niveles del mRNA (Luqmani *et al.* 1992). Además, otros autores describen que la sobreexpresión de FGF2 en la línea celular de cáncer de mama T47D inhibe la proliferación celular y promueve la diferenciación celular (Korah *et al.* 2000) y que, la incubación con FGF2 en células MDA-MB-134 inhibe la proliferación celular (McLeskey *et al.* 1994). Por otro lado, otros grupos de investigación, incluido el nuestro, sostienen exactamente lo opuesto (ver *Antecedentes*; (Fannon & Nugent 1996; Piotrowicz *et al.* 1999; Cerliani *et al.* 2011).

En cuanto a la clínica, algunos trabajos asocian los niveles elevados de FGF2 a tumores pequeños y de bajo grado, con mejor pronóstico y período más prolongado libre de enfermedad (Yiangou *et al.* 1997). En contraste, *Smith y colaboradores* aseguran que los niveles de FGF2 son hasta diez veces más elevados en el citosol de las células tumorales en comparación con el tejido mamario normal (obtenido de mamoplastías) y tres veces más elevado en comparación con el citosol de células no neoplásicas obtenidas a partir de la misma mama de la cual se extrajo cada tumor (Smith *et al.* 1999). Además, otros dos grupos de trabajo han reportado niveles elevados de FGF2 en orina (Nguyen *et al.* 1994) y en el fluido del pezón (Sartippour *et al.* 2005) de pacientes con carcinomas mamarios. Recientemente, *Arcaro y colaboradores* demostraron un aumento en los niveles de FGF2 en la leche de mujeres con cáncer de mama con respecto a mujeres sanas en el período de lactancia (Arcaro *et al.* 2012).

Conjuntamente, las evidencias disponibles no permiten establecer un rol claro del FGF2 sobre las células de origen epitelial mamario. Creemos que esto puede deberse a que, hasta el momento, ningún trabajo con muestras de pacientes con carcinomas mamarios distingue entre la expresión de las isoformas de FGF2 y justamente el balance entre los niveles de las isoformas livianas y pesadas (LMW-FGF2/HMW-FGF2) podría proveer un mecanismo para controlar las funciones fisiológicas de FGF2 (Piotrowicz *et al.* 1999; Quarto *et al.* 2005). En conjunto, el

estudio diferencial de las isoformas de FGF2 sería de sumo interés en el campo de la oncología, ya que su relación y localización diferencial dentro de la célula podrían ser marcadores pronóstico para una variedad de tumores, incluyendo los de mama.

ESTRUCTURA DE FGFR

Como se mencionó anteriormente, en vertebrados se han descrito cinco receptores (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 y FGFR5) y todos ellos corresponden a la superfamilia de las tirosina-quinasa. Los receptores comparten una región extracelular compuesta por tres dominios (D1-D2-D3) de tipo-inmunoglobulina (Ig), una región transmembrana y una región intracelular con actividad de tirosina-quinasa (**Figura i-4**; Mohammadi *et al.* 2005). Esta última es la región más conservada entre los receptores, con excepción del FGFR5 que carece del dominio.

Entre los dominios D1 y D2 se localiza una serie de aminoácidos con residuos ácidos, mayoritariamente serinas. Esta secuencia ácida (AB), que varía de 4 a 8 aminoácidos según el receptor, modula la unión a sus ligandos FGF y es crucial para la autoinhibición de los receptores (Wang *et al.* 1995). El fragmento D2-D3 es necesario y suficiente para la unión al ligando y le brinda especificidad. En el dominio D3 se encuentran los exones que pueden sufrir *splicing* alternativo, lo que resulta en la transcripción de más de 48 isoformas con diferente afinidad de unión a sus ligandos (Johnson & Williams 1993). Además, todos los receptores son susceptibles a modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilaciones (Winterpacht *et al.* 2000) que afectan también la unión a sus ligandos.



Figura i-4: Diagrama esquemático de FGFR. Posee 3 dominios: D1, D2 y D3. Entre el dominio D1 y D2 se encuentra la secuencia ácida AB. En el dominio D2 se encuentra una región de unión a heparán sulfato (HBS, celeste), y en el dominio D3 se sitúa el fragmento que sufre *splicing* alternativo (violeta) y que da lugar a las isoformas IIIb y IIIc. Los extremos amino y carboxilo terminales están rotulados con una N y una C, respectivamente. Se indican las porciones involucradas en la autoinhibición y la unión al ligando. Esquema modificado de (Mohammadi *et al.* 2005).

ACTIVACIÓN DE LA VÍA

Cada receptor puede ser activado por varios tipos de FGF y, en muchos casos, cada FGF es capaz de unirse a más de un receptor. Particularmente, el FGF2 es capaz de unirse a los FGFR1, 2, 3 y 4, aunque tiene mayor afinidad por el FGFR1 ($K_d = 62 \text{ nM}$; (Ibrahimi *et al.* 2004a).

Para que ocurra la activación de la vía, en primer lugar, una molécula de FGF debe unirse a un proteoglicano de heparán sulfato (HSPG). El HSPG actúa como receptor de baja afinidad y se une al ligando para formar el complejo HSPG/FGF que también se une al dominio D2 de los receptores (Kan *et al.* 1993) y así estabiliza la unión del complejo FGF/FGFR para permitir la correcta activación de la vía (Yayon *et al.* 1991). Se considera que la unidad funcional de FGF/FGFR consiste en dos complejos de 1:1:1 FGF/FGFR/HSPG yuxtapuestos en un dímero simétrico (Schlessinger *et al.* 2000). Además, se ha reportado que el HSPG protege a los FGF de la degradación, funciona como reservorio del ligando en la matriz extracelular y determina el radio de difusión del FGF2 (Hacker *et al.* 2005).

Una vez formado el complejo trimérico, se induce la dimerización de los receptores que entran en contacto entre sí a través de una región en la base del dominio D2. Cada ligando interactúa con el dominio D2 de un segundo receptor a través de un sitio de unión secundario. Se ha descrito que una mutación en este sitio reduce la dimerización y la activación de los receptores sin afectar la unión con el ligando (Ibrahimi *et al.* 2005). La activación de los receptores ocurre cuando el ligando induce la estabilización de los dímeros a través de sus dominios extracelulares (Schlessinger *et al.* 2000).

La formación de los dímeros, ya sean homodímeros o heterodímeros (Shi *et al.* 1993), permite a los dominios citoplasmáticos autofosforilarse en el *loop* activo (*loop*-A) de tirosinas y activarse (**Figura i-5**). A continuación de la fosforilación de dos residuos tirosina en este fragmento, se produce la fosforilación de quinasas que se asocian tanto al extremo carboxilo terminal del receptor como a la región cercana a la membrana (Mohammadi *et al.* 1996). Los dos principales sustratos intracelulares de FGFR son la fosfolipasa C (PLC γ 1), también denominada FRS1, y el sustrato 2 de FGFR, también denominado FRS2 (Dailey *et al.* 2005). La fosforilación de estas proteínas induce su activación, lo que finalmente activa numerosas vías de señalización río abajo, tales como Ras/MAPK, PI3K/AKT y PKC (Powers *et al.* 2000).

Por otro lado, algunos trabajos señalan que la activación de los FGFR también podría ocurrir por endocitosis de complejos activados FGF-FGFR y a través de ligandos y receptores intracelulares en un mecanismo autocrino e intracrino (Wiedlocha & Sorensen 2004).

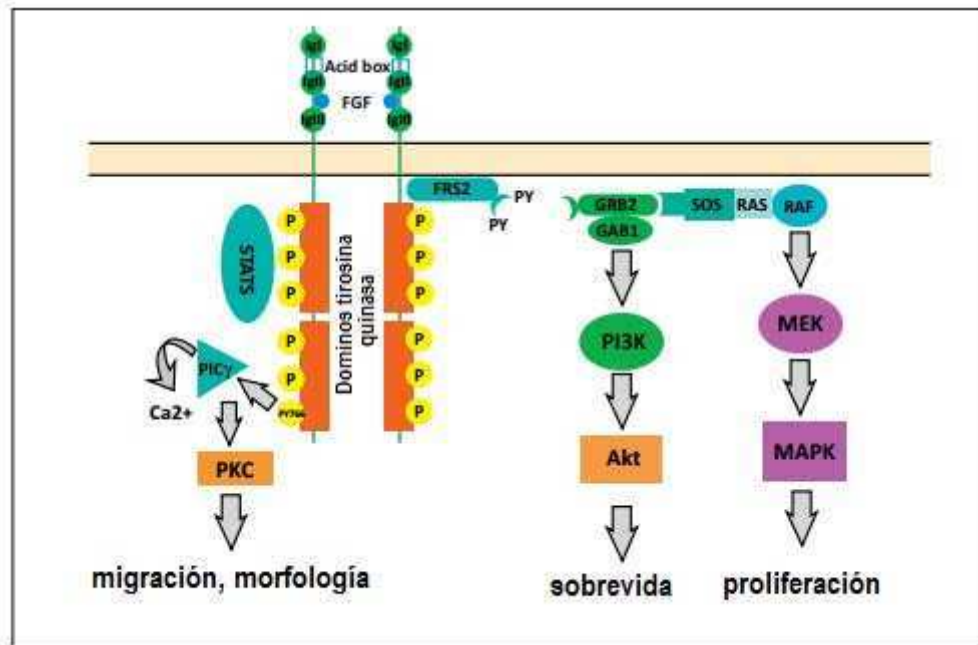


Figura i-5: Estructura de FGFR y cascadas de señalización en la superficie celular. Se ilustran los dominios tipo inmunoglobulina (Ig), la secuencia ácida (acid box), el dominio transmembrana y la cola citoplasmática del extremo carboxilo terminal. El sustrato 2 de FGFR (FRS2) se asocia al receptor cuando se activa por transfosforilaciones. FRS2 también se fosforila e inicia una cascada de señalización río abajo uniéndose a dominios SH2 de proteínas *target*, lo que, a su vez, puede encender las vías de PI3K/AKT y MEK/MAPK. La señalización de FGFR también activa a PLCγ, independientemente de FRS2. Como consecuencia, FGFR puede activar vías relacionadas con la migración, morfología, supervivencia y proliferación celular, ya sea activando la expresión de genes específicos o induciendo la fosforilación de proteínas en el citosol. Esquema modificado de (Liang *et al.* 2012)

FGFR EN CÁNCER

La mayoría de las alteraciones en la vía de FGF/FGFR que causan síndromes óseos también contribuyen al desarrollo de cáncer (Kan *et al.* 2002). Estas alteraciones pueden deberse a mutaciones específicas, cambios en la regulación del *splicing* alternativo y deleciones o amplificaciones génicas, tanto en los receptores como en los ligandos. Se ha descrito que la desregulación de la vía de FGF/FGFR puede estar involucrada tanto en la oncogénesis, como en la neo-angiogénesis y en la resistencia a la quimioterapia (Wesche *et al.* 2011). En este trabajo de Tesis nos focalizamos fundamentalmente en los FGFR1 y FGFR2.

FGFR1. En varios tipos de neoplasia la señalización del FGFR1 es defectuosa. Por ejemplo, un alto porcentaje de glioblastomas exhibe mutaciones en el dominio kinasa del FGFR1 que les confiere una ganancia de función (Rand *et al.* 2005) y este mismo receptor está anormalmente activado en células malignas de próstata (Giri *et al.* 1999) y se asocia con un fenotipo agresivo y mayor capacidad metastásica (Yang *et al.* 2013). Un análisis de alta resolución del número de copias génicas en cáncer de pulmón (Weiss *et al.* 2010) reveló que 21-22% del subtipo escamoso tienen amplificación de FGFR1 (Peifer *et al.* 2012), 40% de estos tumores tiene mayor expresión de MYC y es más sensible a inhibidores de FGFR. Estas observaciones señalan que la amplificación de FGFR1 podría ser un potencial biomarcador de predicción de respuesta (Malchers *et al.* 2014). En un estudio con astrocitomas humanos se observó que, durante la progresión tumoral, aumentaba la expresión de FGFR1 a expensas de FGFR2 (Yamaguchi *et al.* 1994). Además, en este estudio, las células malignas expresaban una variante de FGFR1 que solamente contaba con dos de los dominios tipo-Ig, en comparación con el tejido cerebral sano, donde el receptor contiene los clásicos tres dominios.

Cáncer de mama: se ha reportado una expresión alterada de FGFR1 tanto en líneas celulares como en muestras humanas (Penault-Llorca *et al.* 1995) y, utilizando modelos transgénicos con un sistema inducible, han implicado al FGFR1 en el desarrollo de tumores (Welm *et al.* 2002). De hecho, el FGFR1 se considera un potencial blanco terapéutico para carcinomas lobulillares clásicos (Reis-Filho *et al.* 2006). Un estudio realizado con 1093 muestras de carcinomas mamarios humanos reportó que 14,3% tienen amplificado el gen de FGFR1 (Shi *et al.* 2015) y que la amplificación génica está asociada significativamente con la sobreexpresión del receptor (Turner *et al.* 2010b). Además, la expresión de FGFR1 se correlaciona con la expresión de RE y con el marcador de proliferación Ki67 (Shi *et al.* 2015) y algunos autores señalan que también estaría asociada a invasión, metástasis (Elbauomy *et al.* 2007; Jang *et al.* 2012) y resistencia a la terapia endocrina (Turner *et al.* 2010b).

FGFR2. 12% de los carcinomas de endometrio tiene mutaciones activantes de FGFR2 que causan ganancia de función del receptor. Pollock y colaboradores identificaron 11 mutaciones en el dominio quinasa del FGFR2 en pacientes con esta enfermedad (Pollock *et al.* 2007). También se ha reportado la ganancia de copias del gen de FGFR2 en 10% de los cánceres gástricos (Kunii *et al.* 2008), particularmente en adenocarcinomas poco diferenciados (Hara *et al.* 1998).

Cáncer de mama: la expresión alterada de FGFR2 se asocia al riesgo de contraer cáncer de mama postmenopáusico esporádico (Hunter *et al.* 2007) y, en un estudio realizado con 387 muestras humanas de cáncer de mama, 11,5% demostró tener amplificado el gen de FGFR2 (Adnane *et al.* 1991). En ensayos con líneas celulares sin expresión de RH o HER2, Turner y colaboradores observaron que la amplificación génica de FGFR2 coincide con la activación constitutiva del receptor y con una respuesta eficiente al inhibidor de FGFR, PD173074 (Turner *et al.* 2010a). Dos estudios GWAS (por sus siglas en inglés: *Genome-Wide Association Studies*) identificaron cinco polimorfismos de nucleótido simple (SNP; por sus siglas en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*) localizados en el intrón 2 del gen de FGFR2 y los asociaron a un mayor riesgo de padecer cáncer de mama esporádico (Easton *et al.* 2007). Además, Antoniou y colaboradores asociaron uno de estos polimorfismos a tumores con mutaciones en el gen BRCA2 (Antoniou *et al.* 2008). Aún no queda claro el mecanismo por el cual el FGFR2 está asociado con esta susceptibilidad. En nuestro laboratorio, logramos establecer xenotrasplantes de la línea T47D que expresan una variante mutante de FGFR2 (R2CA) en ratones NSG sin el aporte exógeno de hormonas y con una tasa de crecimiento mayor que la línea control (Cerliani *et al.* 2011). Estos hallazgos resaltan el rol protumorigénico de FGFR2.

POTENCIAL TERAPÉUTICO DE FGF2 Y SUS RECEPTORES EN CÁNCER

Existen múltiples evidencias, tanto preclínicas como clínicas, que sugieren que la inhibición de FGFR podría ser una terapia alternativa eficiente para el tratamiento de múltiples patologías, incluidos distintos tipos de cáncer. Debido a esto, en la última década se han desarrollado y perfeccionado una variedad de fármacos con actividad bloqueante de la vía del FGFR, ya sean moléculas pequeñas, anticuerpos monoclonales anti-FGFR, sondas anti-sense y FGF-Ligand-trap, entre otros.

1. Moléculas pequeñas. Se han desarrollado numerosos inhibidores de la actividad tirosina-quinasa (**Tabla i-1**). Se los puede clasificar en dos familias de acuerdo a su especificidad de bloqueo:

- **Inhibidores no selectivos, o multi-target**, como TKI258-Dovitinib, E-3810, BIBF1120-Nintedanib, PD173074 y AP24534-Ponatinib, entre otros. Además de bloquear la actividad de FGFR, también inhiben otros receptores con actividad tirosina quinasa como VEGFR1, 2, 3 y PDGFR α/β y, debido a esto, generalmente poseen una alta actividad antiangiogénica (Lee *et al.* 2005; Wan *et al.* 2014).

En este trabajo de Tesis utilizamos el PD173074, que actúa específicamente uniéndose al bolsillo hidrofóbico del sitio del ATP de los receptores tirosina-quinasa e inhibe su actividad (Mohammadi *et al.* 1998). El PD173074 ha sido efectivo para inhibir la proliferación celular en distintos tipos de cáncer (Grand *et al.* 2004; Byron *et al.* 2008) y regula el ciclo celular al inhibir la expresión de ciclinas (Koziczak *et al.* 2004).

- **Inhibidores con alta actividad y selectividad de la familia FGFR**, como AZD4547, BGJ398 y LY287445, entre otros.

En este trabajo de Tesis utilizamos el inhibidor BGJ398 que actúa uniéndose al bolsillo de unión del ATP para impedir la activación de los receptores. Gracias a su elevada afinidad, actúa a bajas concentraciones y bloquea la actividad de los FGFR1 (IC₅₀:0,9 nM), 2 (IC₅₀:1,4 nM), 3 (IC₅₀:1 nM) y 4 (IC₅₀: 60 nM). Todas las demás quinasas se inhiben a concentraciones de más de 1 µM, con la excepción del VEGFR2, cuya IC₅₀ es de 180 nM, pero que igualmente supera en aproximadamente dos órdenes de magnitud el IC₅₀ de los FGFR (Guagnano *et al.* 2011). Se ha reportado que este bloqueante inhibe la proliferación tumoral tanto en cultivo como *in vivo* (Konecny *et al.* 2013). Existen dos ensayos clínicos que están evaluando la efectividad de la terapia del BGJ398 en pacientes con tumores con alteraciones en la vía FGF/FGFR: uno de Fase 1 ([clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01004224); NCT01004224) y otro de Fase 2 ([clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02160041); NCT02160041). El primer ensayo comenzó en 2009 y continúa reclutando pacientes con tumores sólidos avanzados (glioblastomas, cáncer de pulmón, vejiga o endometrio), con amplificaciones de FGFR1, FGFR2 o mutaciones en FGFR3. El segundo ensayo comenzó en 2014 y continúa reclutando pacientes con tumores sólidos o hematológicos con mutaciones en las vías de FGFR y PI3K (este ensayo plantea una terapia combinada con BYL719, un inhibidor de PI3Kα).

ONCOGEN	Alteración genética más frecuente	Agente bloqueante	Tipo tumoral más frecuente
FGFR1	Amplificación	TKI258-Dovitinib, PD173074 , AZD4547, E-3810, BGJ398 , licanib, BAY1163877, AP24534-Ponatinib	Cáncer de pulmón (NSCLC) Cáncer de mama
FGFR2	Amplificación o mutación	TKI258-Dovitinib AZD4547, E-3810, BGJ398 , BAY1163877, AP24534-Ponatinib	Cáncer gástrico Cáncer de mama Cáncer de endometrio
FGFR3	Translocación o mutación	TKI258-Dovitinib PD173074 , AZD4547, BGJ398 , BAY1163877, AP24534-Ponatinib	Cáncer de vejiga Cáncer de pulmón (NSCLC)
FGFR4	Amplificación o mutación	AP24534-Ponatinib	Rabdomiosarcoma

Tabla i-1: Los eventos oncogénicos más relevantes en la vía de FGFR pueden ser blanco de inhibidores específicos. El “Tipo tumoral” corresponde a los tumores que poseen más frecuentemente alteraciones genéticas en el gen indicado. NSCLC: subtipo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (por sus siglas en inglés: *Non Small Cell Lung Cancer*). Tabla modificada de (Sun & Bernards 2014).

2. Anticuerpos anti-FGFR. En los últimos años, se ha desarrollado una variedad de anticuerpos específicos contra los FGFR. Estos anticuerpos se unen al dominio extracelular de los receptores, impidiendo la unión del ligando, su dimerización y posterior señalización río abajo. Los anticuerpos se han probado en ensayos preclínicos y clínicos. Ya se completaron dos ensayos clínicos de Fase 1 en los que reclutaron pacientes con tumores sólidos avanzados ([clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01363024); NCT01363024) o pacientes con mieloma múltiple t(4;14) ([clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01122875); NCT01122875).

3. Sondas anti-sense. Esta estrategia se utiliza para bloquear la expresión de un gen de interés aprovechando la maquinaria propia de las células (los complejos proteicos DICER y RISC). Las sondas consisten en hebras simples de ARN sintéticas que, por su complementariedad se aparean al mensajero que se desea bloquear y obstruyen físicamente la traducción (Weiss *et al.* 1999). El silenciamiento de FGF2 y FGFR1 en modelos de melanoma humano ha causado una reducción drástica del tamaño tumoral (Wang & Becker 1997). Si bien en ensayos preclínicos las sondas anti-sense reportan resultados favorables, en la clínica no se los reconoce como terapias efectivas. Esto se debe, principalmente, a que estas sondas se acumulan en tejidos no

tumorales y causan numerosos efectos no deseados. Por todo esto, aún restan muchos desafíos para la aplicación de este tipo de tecnología en la clínica (Rayburn & Zhang 2008).

4. *FGF-Ligand traps*. Existen varios fármacos que actúan secuestrando los FGF e impiden su unión a los receptores y su consecuente activación. Uno de estos fármacos es el FP-1039 que consiste en el dominio extracelular de FGFR1IIIc fusionado al fragmento cristalizado correspondiente a la región IgG humana. Este compuesto bloquea la actividad de múltiples FGF y ha demostrado tener un efecto antiangiogénico y antitumoral en estudios preclínicos (Harding *et al.* 2013). Actualmente se está reclutando a pacientes con cáncer avanzado para un ensayo clínico que se encuentra en Fase I (clinicaltrials.gov, NCT00687505).

ANTECEDENTES

Evidencias experimentales que permiten plantear la hipótesis de trabajo

Isoformas del RP y resistencia a MFP. Como mencionamos en la *Introducción*, la mayoría de los carcinomas mamarios expresan receptores hormonales y, luego del tratamiento endocrino, desarrollan resistencia (Gonzalez-Angulo *et al.* 2007). Se han descrito principalmente dos isoformas de RP: RPA y RPB que se expresan en cantidades equimolares en la glándula mamaria humana normal. Sin embargo, en la mayoría de los tumores mamarios se observa un desbalance en la expresión de ambas isoformas (Sartorius *et al.* 2003). En un trabajo publicado recientemente por nuestro laboratorio, demostramos que los tumores mamarios resistentes a la terapia con MFP expresan una mayor proporción de la isoforma B del RP respecto de la isoforma A, mientras que los tumores sensibles presentan la relación inversa (Wargon *et al.* 2015) **Figura a-1**).

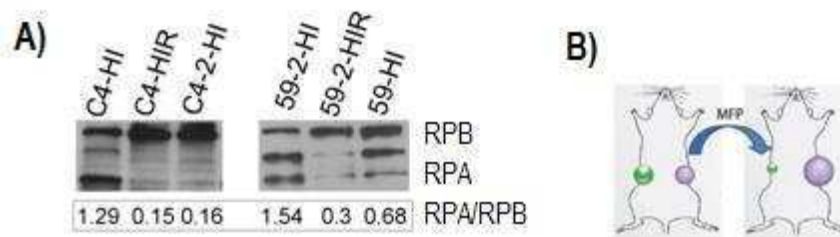


Figura a-1: (A) Expresión de RPA/RPB en variantes tumorales del modelo murino desarrollado en nuestro laboratorio. Se observa una menor relación RPA/RPB en los tumores resistentes (C4-HIR, C4-2-HI, 59-2-HIR y 59-HI) que en los tumores sensibles (C4-HI y 59-2-HI) al tratamiento con MFP. (B) Esquema que representa el crecimiento tumoral de un tumor sensible (en verde) y un tumor resistente (en violeta) en respuesta al tratamiento con MFP (pellet 6 mg).

Asociación entre las vías de RH y FGF/FGFR. Numerosos trabajos señalan que alteraciones en las vías de factores de crecimiento, como la del FGF/FGFR, están asociadas al crecimiento y a la progresión tumoral en cáncer de mama (Turner & Grose 2010). De hecho, algunos de sus miembros se han convertido en blancos terapéuticos y existe una variedad de fármacos en pleno desarrollo.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, demostramos que el estroma de tumores HI y sensibles al tratamiento con AP expresa mayores niveles de FGF2 que el estroma de tumores HD (**Figura a-2A**). Además, observamos que el FGF2: **1**) estimula el crecimiento de los tumores

HD *in vivo*, aún en ausencia de MPA (Giulianelli *et al.* 2008), **2**) induce la fosforilación del RP en un modelo murino y en la línea celular humana T47D y, **3**) induce la formación de un complejo proteico nuclear entre el RP y FGFR2/STAT5 que se une al ADN en sitios PRE (Cerliani *et al.* 2011); **Figuras a-2B y a-2C**). Estos resultados sugieren que la vía del FGF2/FGFR2 participa en la adquisición de un fenotipo HI a través del aumento en la expresión de FGF2 estromal y la activación de la vía del RP (**Figura a-2D**).

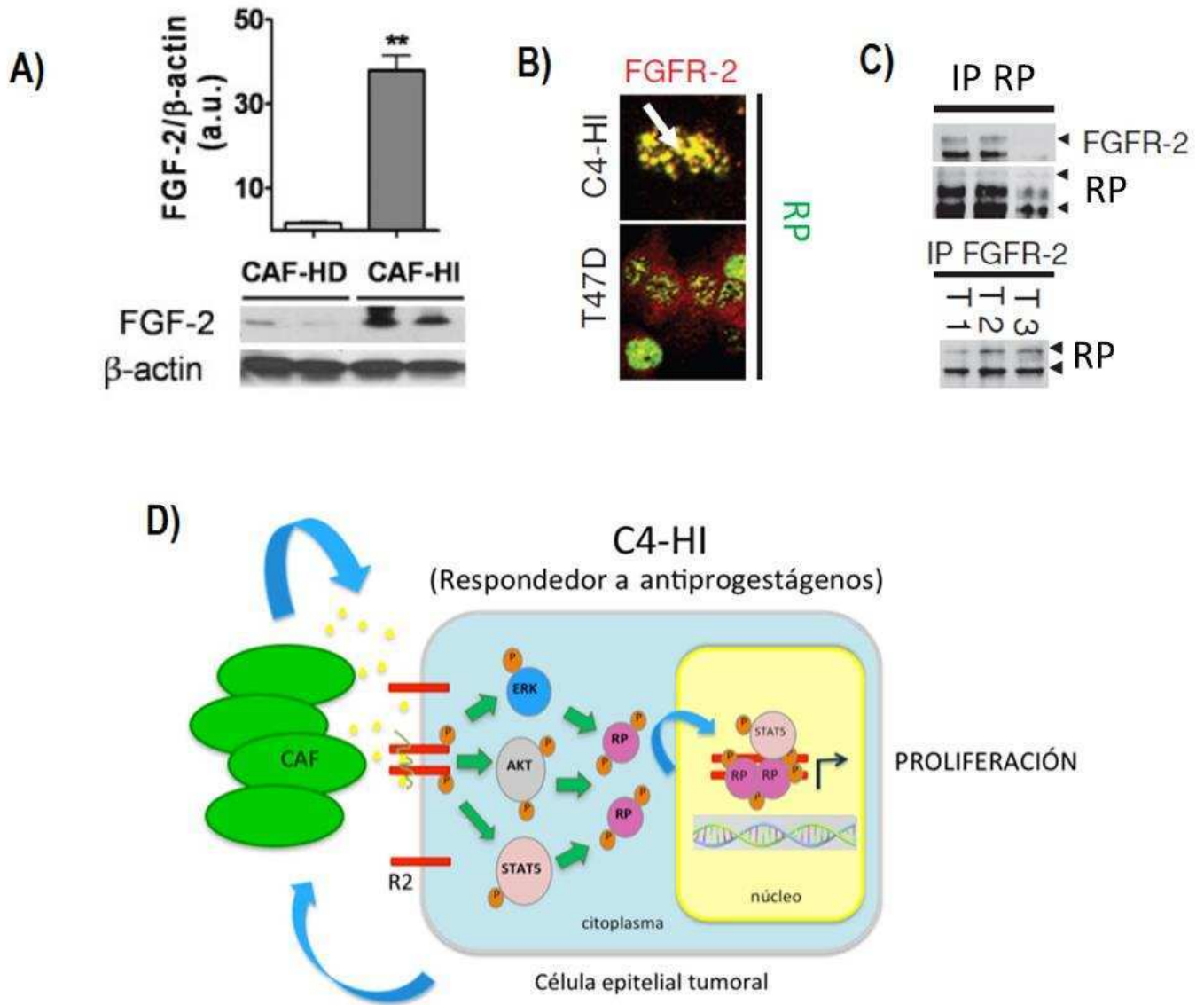


Figura a-2: (A) Expresión de FGF2 en cultivos de fibroblastos derivados de tumores HI y HD de la familia C4 del modelo murino. (B) Inmunofluorescencia para FGFR2 (en rojo) y RP (en verde) de células epiteliales de un tumor C4-HI y de la línea celular T47D. (C) Inmunoprecipitación de RP y FGFR2 y revelado para ambas proteínas a partir de extractos tumorales C4-HI. (D) Esquema de la señalización de FGF2 en tumores HI, en la que participan FGFR2, RP y STAT5.

Asimismo, como se mencionó en la *Introducción (FGF2 asociado al cáncer de mama)*, en trabajos con muestras de pacientes con cáncer de mama, sigue considerándose controvertida la asociación entre la expresión de FGF2 y el pronóstico de la enfermedad. En un trabajo de nuestro laboratorio, en el que analizamos 57 muestras de pacientes, demostramos una asociación entre la expresión de FGFR2, 3 y RE. Asimismo, observamos una tendencia a una asociación positiva entre la expresión de FGFR1 y un alto grado histológico (Cerliani *et al.* 2012).

Conjuntamente, las evidencias experimentales mencionadas en los párrafos anteriores sugieren que las alteraciones en la vía del FGF2/FGFR podrían estar asociadas a la progresión del cáncer de mama. Y dado que, hasta el momento, no existen trabajos que relacionen los niveles de FGF2 con la resistencia endocrina, postulamos nuestra hipótesis de trabajo:

Durante la adquisición de la resistencia endocrina se produce un cambio en la expresión y señalización de FGF2 que favorece el crecimiento y la progresión tumoral.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el rol de la vía FGF2/FGFR en el crecimiento y la progresión del cáncer de mama.

Objetivos específicos:

1. En carcinomas mamarios murinos con distinta sensibilidad endocrina, evaluar:
 - a. La expresión y localización de las isoformas de FGF2, FGFR1 y FGFR2.
 - b. La participación de la vía FGF2/FGFR en la proliferación celular.
 - c. La participación de los FGFR en el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica.

2. En variantes con distinta sensibilidad endocrina de la línea celular humana T47D, evaluar:
 - a. La expresión y localización de las isoformas de FGF2, FGFR1 y FGFR2.
 - b. La participación de la vía FGF2/FGFR en la proliferación celular.
 - c. La activación de las vías de transducción de señales: pFRS2/FRS2, pERK/ERK y pS6/S6.
 - d. La participación de los FGFR en el crecimiento tumoral.

3. Generar nuevos modelos de líneas celulares humanas para evaluar el rol de las isoformas de FGF2 en el crecimiento y la progresión tumoral.
 - a. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de isoformas de FGF2 sobre la proliferación celular y el crecimiento tumoral.
 - b. Evaluar la respuesta proliferativa a la terapia endocrina tanto en cultivo como *in vivo* de variantes que sobreexpresen las distintas isoformas de FGF2.
 - c. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de isoformas de FGF2 en la capacidad de invasión y diseminación metastásica.

MATERIALES Y MÉTODOS

*“Felíz aquel que lleva consigo un ideal, un Dios interno,
sea el ideal de la Patria, el ideal de la ciencia
o simplemente las virtudes del Evangelio”*

Luis Pasteur

ANIMALES

Se utilizaron ratones hembra vírgenes de dos meses de edad de dos cepas diferentes:

- BALB/c, son ratones albinos. Proviene originalmente del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata y se crían en el Bioterio del IByME. Estos ratones son inmunocompetentes y se utilizan de rutina para mantener por pasajes singeneicos los tumores mamarios murinos. Además, en esta Tesis, se utilizaron para trasplantar tumores murinos y evaluar el efecto de diferentes tratamientos.

- *NOD/LtSz-scid/IL-2R gamma null mice* (NSG), son ratones albinos y transgénicos. Proviene de los Laboratorios Jackson (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EE.UU.) y se crían en nuestro laboratorio en el Bioterio del IByME. Esta cepa combina múltiples defectos funcionales de inmunidad innata y adaptativa y, por lo tanto, permite el trasplante y crecimiento de líneas tumorales humanas (xenoinjertos). En este trabajo de Tesis, estos ratones se utilizaron para evaluar el crecimiento y la metástasis de distintas variantes de la línea celular humana T47D-YA (**Tabla m-2**).

Todos los animales se mantienen con alimento y agua *ad libitum*, a una temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un cronograma de 12 h de luz y 12 de oscuridad. Los cuidados siguieron las recomendaciones de la *Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio* (Gonder & Laber *et al.* 2007). Los ratones NSG se mantienen en condiciones de esterilidad y todos los protocolos utilizados durante la realización de esta Tesis están aprobados por el Comité de Ética del Instituto.

TUMORES MAMARIOS MURINOS

Hace ya 30 años, nuestro grupo de trabajo desarrolló un modelo experimental de cáncer de mama en ratones hembras BALB/c. La administración prolongada del progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) indujo carcinomas mamarios con una incidencia actuarial de 76% y una latencia media de 52 semanas (Lanari *et al.* 1986b; Lanari *et al.* 1986a) **Figura m-1**. Los tumores son, en su mayoría, de histología ductal, tienen la capacidad de dar metástasis en pulmón y ganglios linfáticos (Lanari *et al.* 1989) y expresan altos niveles de RE α , RE β y de RP (Soldati *et al.* 2009). Se mantienen por pasajes singeneicos en ratones hembra vírgenes BALB/c en presencia del progestágeno y poseen un comportamiento hormono dependiente (HD), ya que sólo crecen en presencia de la hormona. Con el tiempo, surgieron variantes hormono independientes (HI) que crecen en presencia o ausencia del MPA (Kordon *et*

al. 1990; Lanari *et al.* 1989; Molinolo *et al.* 1987) y conservan altos sus niveles de expresión de RE y de RP.

Algunas variantes HI regresionan en respuesta al tratamiento con estradiol o antiprogéstágenos (AP; MFP o ZK230211) y se los denomina “sensibles” (Helguero *et al.* 2003; Wargon *et al.* 2009), mientras que otras son “resistentes constitutivas” a la terapia endócrina. Asimismo, por presión selectiva en presencia de MFP, se han obtenido variantes “resistentes adquiridas”. Llamativamente, todas las variantes tumorales, incluidas las resistentes, expresan altos niveles de RH.

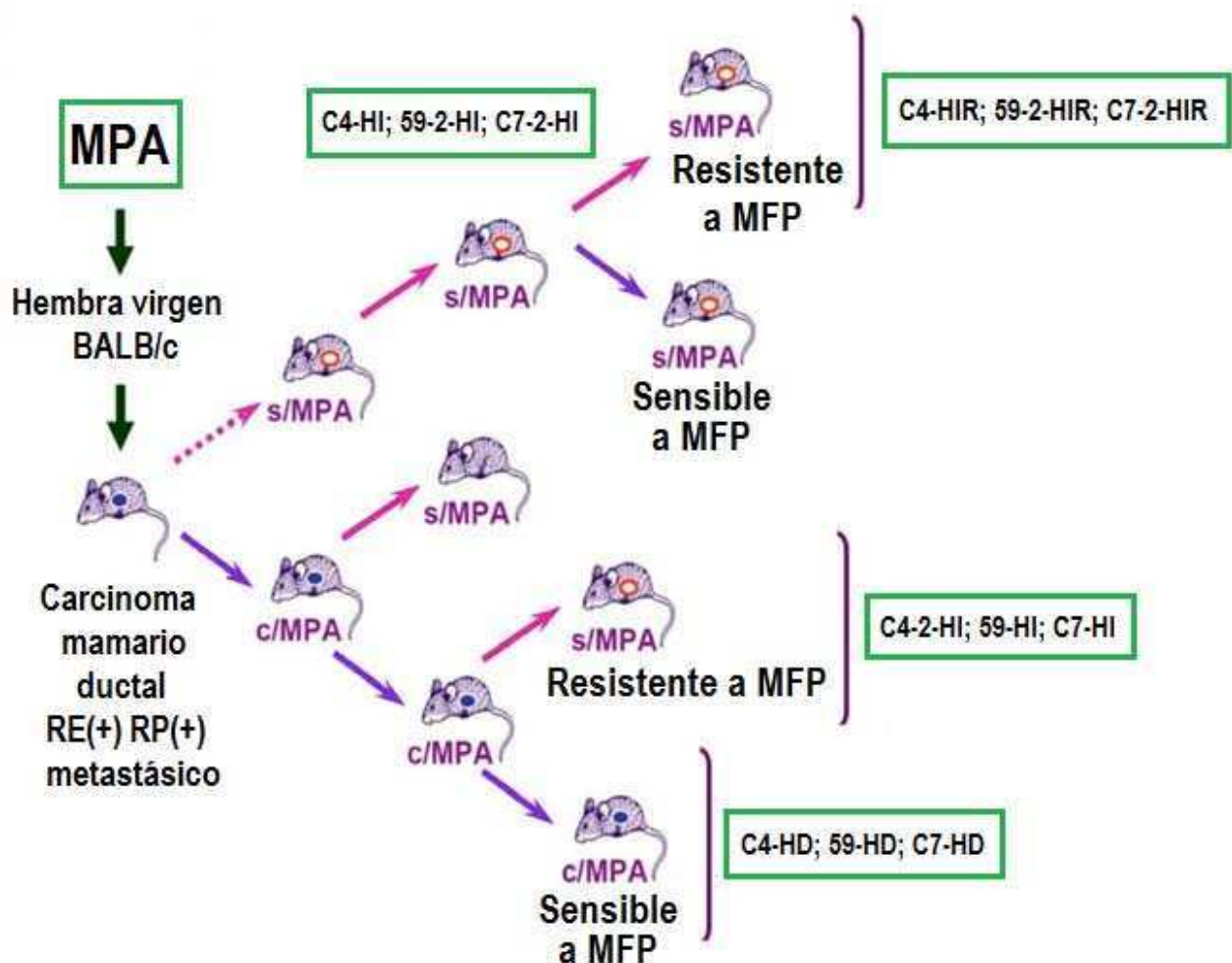


Figura m-1. Modelo experimental de inducción de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por administración prolongada de MPA en ratones hembra BALB/c. Se muestra la familia C4. Inicialmente, los tumores tenían un comportamiento progestágeno-dependiente (HD). Por pasajes sucesivos en ausencia de la hormona surgieron variantes con crecimiento autónomo, progestágeno-independientes (HI). A su vez, los tumores HI se clasifican en sensibles y resistentes a la terapia con antiprogéstágenos (MFP y ZK230211). Finalmente, estos últimos se subdividen en resistentes constitutivos o adquiridos.

Para llevar a cabo esta Tesis, utilizamos tumores pertenecientes a tres familias tumorales diferentes del modelo de carcinogénesis hormonal mamaria inducida por MPA (**Tabla m-1**).

Familia tumoral	Tumores sensibles a AP	Tumores Resistentes a AP	
		Constitutivos	Adquiridos
C4	C4-HI	C4-2-HI	C4-HIR
59	59-2-HI	59-HI	59-2-HIR
C7 (*)	C7-2-HI	C7-HI	C7-2-HIR

Tabla m-1: Variantes tumorales y sensibilidad hormonal de carcinomas mamarios murinos generadas en el laboratorio y utilizadas en esta Tesis. AP: antiprogéstágenos. (*) La familia C7 posee mayor potencial metastásico que las otras familias.

PASAJES TUMORALES Y MANTENIMIENTO DE LOS TUMORES

Todos los tumores expresan RE y RP y se mantienen por trasplantes ortotópicos en la glándula mamaria de hembras BALB/c. Para esto, se utiliza 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 con resistencia adquirida, cuando éstos alcanzaron un tamaño de 25 mm² aproximadamente se les colocó un *pellet* (Sahores et al. 2013) de MFP de 6 mg sc. en el dorso de los ratones, para mantener la presión selectiva. Para conservar las características de las líneas tumorales se mantienen criopreservados en nitrógeno líquido pequeños trozos tumorales de aproximadamente 2 mm³ de pasajes tempranos de todas las variantes.

CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES MAMARIOS

Los cultivos primarios se realizaron utilizando tumores de entre 50 y 100 mm². Los tumores se extirparon en esterilidad y se disgregaron primero en forma mecánica con tijera y luego en presencia de la solución enzimática, agitándolos a 37°C durante 40 minutos (min). La suspensión celular obtenida está compuesta principalmente por dos poblaciones, una de estirpe epitelial y otra de estirpe fibroblástica. Para separarlas se utilizó la técnica de *Pandis y colaboradores*, con algunas modificaciones (Pandis et al. 1992). Esta técnica se basa en que la velocidad de sedimentación de las células epiteliales que forman agregados celulares es mayor que la de los fibroblastos, lo que permite su separación después de varias decantaciones

diferenciales. Se colocaron las células en un tubo de centrifuga junto con 15 ml de medio de lavado (ver *Apéndice*) y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante (SN) y las células se resuspendieron en DMEM F12 con SFB 10%. La suspensión se dejó sedimentar durante 20 min; el sedimento constituye la fracción enriquecida en células epiteliales que se encuentran habitualmente en agregados y del SN se obtiene la fracción fibroblástica. A la fracción enriquecida en células epiteliales se le agregó 15 ml de medio de lavado y se resuspendieron las células. Las decantaciones fueron repetidas cada 20 min descartándose el SN cada vez, hasta que no se detectaron más células en el sobrenadante (aproximadamente 13 decantaciones). Este es el momento en que se considera que se han separado exitosamente las células epiteliales. Luego de la última decantación, las células fueron resuspendidas en medio DMEM F12 con SFB 10% y se sembraron en placas de 6 hoyos (**Figura m-2**).

Para la obtención de cultivos enriquecidos en células epiteliales, los agregados celulares se dejaron adherir durante 48 h en DMEM F12 con SFB 10%. Los cambios de medio se realizaron cada 48 h, reemplazándolo siempre por DMEM F12 con SFB 10%. Sin embargo, de acuerdo al tipo tumoral se realizaron modificaciones al protocolo original para optimizar el rendimiento.

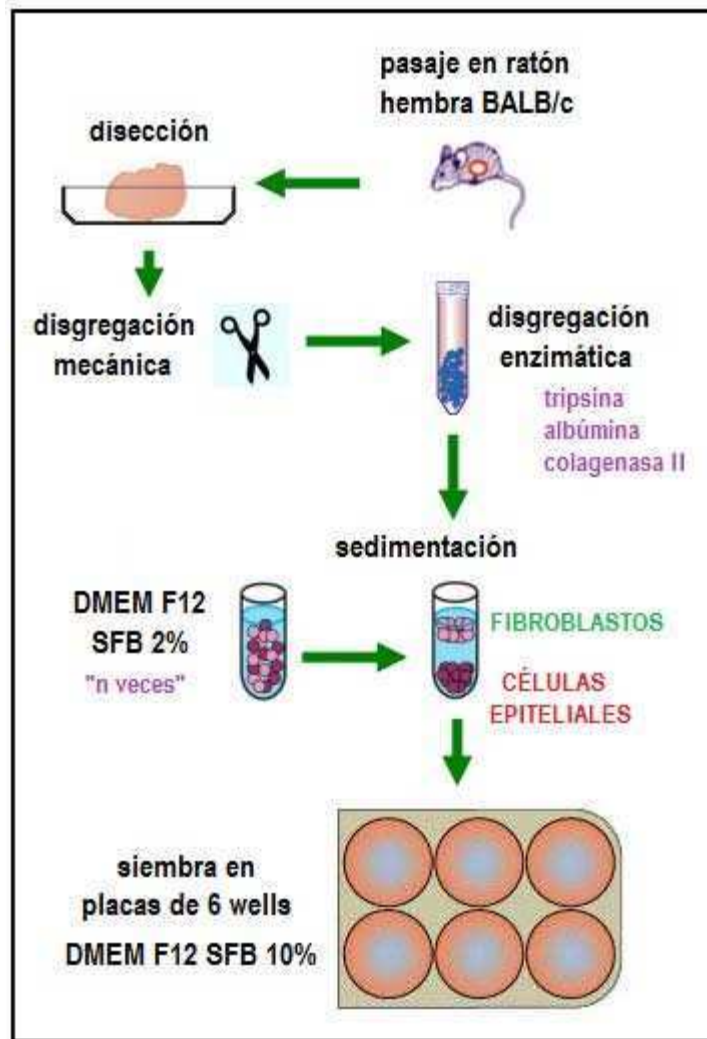


Figura m-2: Representación esquemática del cultivo de tumores primarios para la obtención de cultivos enriquecidos en células epiteliales.

LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

En esta Tesis utilizamos la línea T47D que fue desarrollada por *Keydar y colaboradores* a partir de una efusión pleural de una paciente de 54 años con un carcinoma mamario del tipo ductal infiltrante (*Keydar et al.* 1979). La línea presenta expresión de RE α , RG y RA y, dado que también expresa de forma constitutiva altos niveles de los RP, se ha convertido en un modelo muy utilizado para estudiar la acción de progestágenos en células humanas. Nuestro laboratorio adquirió la línea de la ATCC y en cultivo se mantiene en DMEM F12 con SFB 10% y 10^{-9} M insulina (Denver, Buenos Aires).

En la década del 90, el grupo de la *Dra. Horwitz* aisló por citometría de flujo el clon -Y, que no expresa RP, es insensible al agregado de progestágenos y es incapaz de transactivar promotores regulados por sitios PRE. Por tranfección estable se modificó la sublínea con vectores que expresan la isoforma RPA o RPB y generaron las variantes monoclonales -YA e -

YB, respectivamente (Jacobsen *et al.* 2002). Al igual que las T47D, estas líneas celulares mantienen la expresión de los RA y RG, aunque con menor expresión de RE α (Ghatge *et al.* 2005). Ambas líneas poseen niveles de expresión de RP similares a los de la línea T47D y, en presencia del ligando, los receptores se fosforilan y regulan negativamente. Estas líneas celulares sirven de modelos fisiológicos para el estudio de los mecanismos de acción de las isoformas de RP y su rol en el crecimiento tumoral y la resistencia a antiprogéstágenos. Las líneas celulares T47D-YA y T47D-YB fueron cedidas gentilmente por la *Dra. Horwitz* (Universidad de Colorado, EE.UU.) y se mantienen en cultivo en forma similar a las T47D, con el agregado de 200 μ g/ml de neomicina (Calbiochem) que se utiliza para mantener la selección de las células con los plásmidos tranfectados.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS
T47D-WT	<i>Keydar y colaboradores, 1979.</i>	Alta expresión endógena de RP.
T47D-Y	Universidad de Colorado, EE.UU. <i>Jacobsen y colaboradores, 2002.</i>	No expresa ninguna isoforma de RP.
T47D-YA		Sobreexpresa solamente la isoforma A de RP (RPA).
T47D-YB		Sobreexpresa solamente la isoforma B de RP (RPB).
T47D-YA-Vac	Generadas durante este trabajo de Tesis (*).	Sobreexpresa RPA.
T47D-YA-18 kDa		Sobreexpresa RPA y la isoforma de 18 kDa de FGF2.
T47D-YA-22 kDa		Sobreexpresa RPA y la isoforma de 22 kDa de FGF2.
T47D-YA-22,5 kDa		Sobreexpresa RPA y la isoforma de 22,5 kDa de FGF2.
T47D-YA-34 kDa		Sobreexpresa RPA y la isoforma de 34 kDa de FGF2.

Tabla m-2: Líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en esta Tesis. (*) Estas líneas se generaron durante la realización de esta Tesis (se describirá de forma detallada más adelante y en *Resultados*).

DESCONGELADO DE CÉLULAS DESDE NITRÓGENO LÍQUIDO

Se retiró el criotubo del tanque de nitrógeno y se colocó a 37°C para un descongelado rápido. Luego, se colocaron las células en un tubo con 10 ml de DMEM F12 con SFB 10% (ver *Apéndice*) y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Luego, se descartó el SN y el *pellet* se resuspendió en DMEM F12 con SFB 10%. Finalmente, se sembraron las células en cuatro hoyos

de una placa de 12 hoyos con concentraciones decrecientes. Se permitió la adhesión de las células al plástico durante 48-72 h y se cambió el medio por DMEM F12 con SFB 10%.

CONGELADO DE LÍNEAS CELULARES EN NITRÓGENO LÍQUIDO

Se lavaron las células con PBS 1X estéril y se incubaron durante 2-10 min a 37°C con la cantidad de tripsina-EDTA necesaria (0,25-0,2%, respectivamente) para cubrir el fondo de la placa. Una vez que las células se despegaron, se las pasó a un tubo con 10 ml de DMEM F12 con SFB 10%. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Luego, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió con medio de congelado (ver *Apéndice*). Las células se fraccionaron en criotubos y se congelaron a -70°C en recipientes aptos para la reducción gradual de temperatura. Cuando alcanzaron los -70°C, se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

REPIQUE DE LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS

Se removió el medio de cultivo de las células y se lavó con PBS 1X estéril. Luego, se incubaron las células durante 2-10 min a 37°C con tripsina-EDTA (0,25-0,2%, respectivamente) en el caso de las líneas celulares y tripsina sola (0,25%) en el caso de los cultivos primarios, suficiente para cubrir el fondo de la placa. Una vez que las células se despegaron, se las pasó a un tubo con 10 ml de DMEM F12 con SFB 10%. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Luego, se descartó el SN y el *pellet* se resuspendió con DMEM F12 con SFB 10%. Finalmente, se sembraron las células en las placas correspondientes.

INFECCIÓN LENTIVIRAL

Generación de partículas lentivirales

Para la formación de las partículas lentivirales se utilizaron tres vectores (**Figura m-3** y ver *Apéndice*):

1. Vector lentiviral *target* (pFGF2). Contiene el cADN correspondiente a la isoforma de FGF2 que se quiere estudiar, flanqueada por LTR (secuencia de nucleótidos característica que se encuentra en cada extremo de un elemento retroviral). Los plásmidos fueron gentilmente provistos por el laboratorio del *Dr. Lindemann* (Dresden, Alemania; (Valtink *et al.* 2012).
2. Vector de empaquetado (pCMV-dR8.74). Contiene genes involucrados en el empaquetamiento (gag-pol-rev-tat) flanqueados por LTRs.

3. Vector de envoltura (pMD2.G). Contiene genes que codifican para proteínas de la envoltura viral flanqueados por LTRs.

La cotransfección de los plásmidos mencionados anteriormente se realizó en la línea celular HEK 293T. Dicha línea se generó a partir de células transformadas de riñón embrionario que poseen fragmentos de adenovirus humano de tipo 5 (Ad5) en el cromosoma 19 y se la ha usado ampliamente como una herramienta de expresión de proteínas recombinantes (Thomas & Smart 2005).

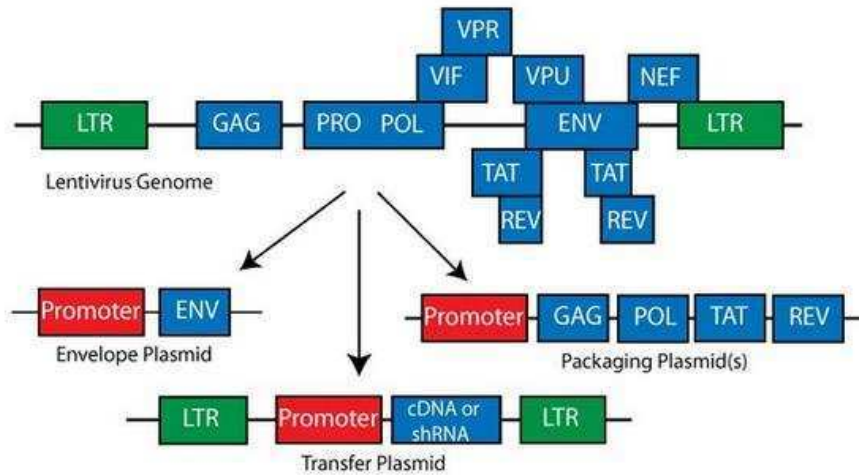


Figura m-3: Plásmidos lentivirales. En la parte superior del diagrama se ilustra una versión del genoma lentiviral (Lentivirus Genome), que incluye la región LTR y todos los componentes virales. En la parte inferior se muestran los plásmidos necesarios para generar las partículas lentivirales: un vector lentiviral (*Transfer Plasmid*), un vector de empaquetado (*Packaging Plasmid*) y un vector de envoltura (*Envelope Plasmid*). Cada uno de ellos contiene una parte del genoma viral. Adaptado de <https://www.addgene.org/lentiviral/packaging/>.

En primer lugar, se plaquearon células empaquetadoras HEK 293T (5×10^5 células/placa) en una p100. Al día siguiente se corroboró que las células hubiesen alcanzado una confluencia de 80-90% y se realizó la cotransfección. Para esto se mezclaron en un tubo los tres vectores (10 μ g del plásmido *target*, 10 μ g del plásmido de empaquetado, 5 μ g del plásmido de envoltura) y se llevó la mezcla a un volumen final de 83 μ l con NaCl (0,15 M). En otro tubo se mezclaron 750 μ l de Opti-MEM (Gibco) con 35 μ l de PEI (polietilenimina). Se mezclaron ambos tubos y luego de una incubación de 10 min a temperatura ambiente, se transfirió todo el volumen sobre las células empaquetadoras HEK 293T y se las incubó por 5 h a 37°C. Al finalizar el tiempo de cotransfección, se reemplazó el medio con 10 ml de DMEM F12 con SFB 10%. Se recolectó el medio condicionado a las 48 y 72 h, se centrifugó para eliminar restos de células muertas y se lo fraccionó y guardó a -70°C. Como resultado, se obtuvieron los medios condicionados con las partículas virales y los plásmidos de interés (**Figura m-4**).

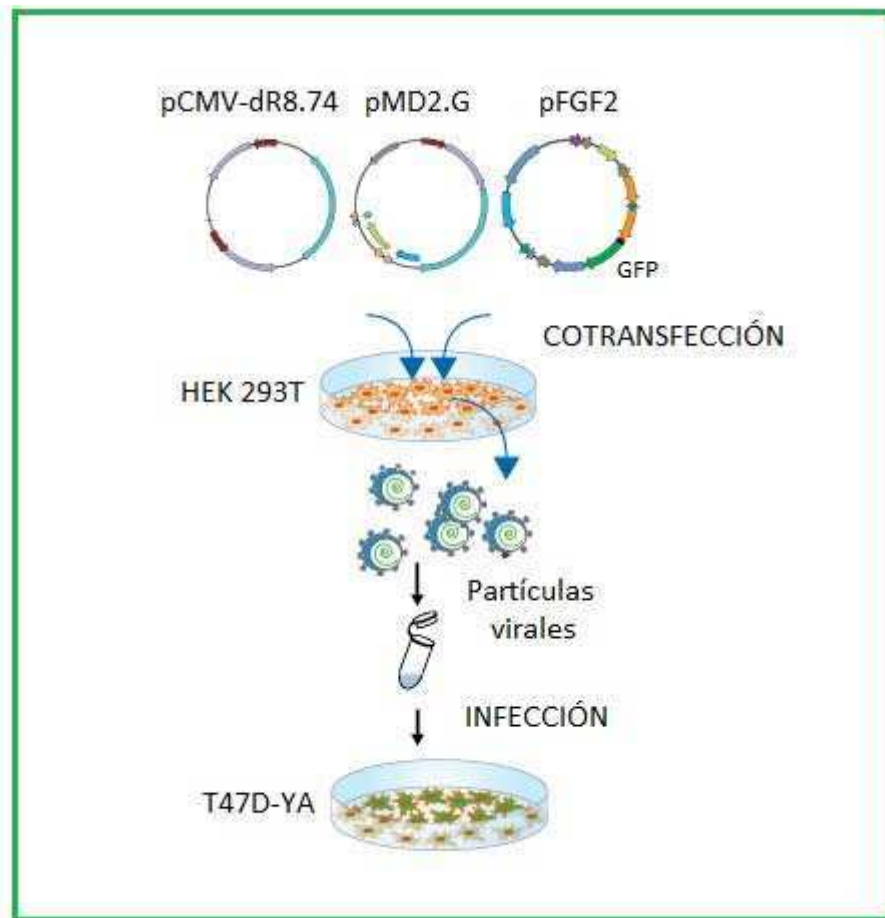


Figura m-4: Esquema que representa la generación de partículas lentivirales. pCMV-dR8.74: plásmido con genes de empaquetamiento viral; pMD2.G: plásmido con genes de envoltura viral; pFGF2: plásmido *target* con los genes que codifican para las diferentes isoformas de FGF2.

Curva de vida con el antibiótico de selección

Dado que los plásmidos pFGF2 contienen un gen de resistencia a zeocina, las líneas infectadas se seleccionaron y mantuvieron en presencia de este antibiótico. La concentración de zeocina utilizada se obtuvo a partir de una curva de vida en donde se sembraron 10.000 células por hoyo de T47D-YA en una placa de 12 hoyos que luego fueron tratadas durante 9 días con concentraciones crecientes de zeocina: 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g/ml}$. La menor concentración de antibiótico que eliminó todas las células T47D-YA en cultivo fue la de 300 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, utilizamos esta concentración para seleccionar y mantener las células infectadas.

Infección de la línea celular T47D-YA con partículas virales

Se sembraron 100.000 células por hoyo de T47D-YA en una placa de 6 hoyos en DMEM F12 con SFB 10%. Cuando las células alcanzaron 70-80% de confluencia se reemplazó el medio por 2 ml de medio de infección (medio condicionado con partículas virales diluido a la mitad con DMEM F12 con SFB 10%) y 2 µl de Polybrene (polímero catiónico que mejora la eficiencia de la infección). A las 48 h se reemplazó el medio por DMEM F12 con SFB 10% y, a partir del cuarto día, se comenzó la selección de las células infectadas con el agregado del antibiótico de selección (300 µg/ml zeocina). Luego de aproximadamente un mes de selección, se obtuvieron colonias resistentes y se confirmó la expresión estable de las isoformas de FGF2 por técnicas de *Western blot* e inmunofluorescencia (IF).

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

INCORPORACIÓN DE ³H-TIMIDINA

- ***Cultivos primarios:*** los cultivos primarios enriquecidos en células epiteliales (C4-HI, C4-HIR, 59-HI y C7-HI) se subcultivaron en placas de 96 hoyos y se incubaron durante 24 h en DMEM F12 con SFB 10%, para permitir la adhesión. Se hambreadon las células en presencia de DMEM F12 con SFBch 5% y al día siguiente, se lavaron las células con PBS 1X y se iniciaron los tratamientos correspondientes por 48 h en DMEM F12 con SFBch 1%. Durante las últimas 18 h de incubación se aplicó un pulso de 0,4 µCi de ³H-timidina (NEN, actividad específica 20 Ci/mmol) en cada hoyo. Luego los cultivos fueron tripsinizados y cosechados en un cosechador de células *Nunc* y se midió la radioactividad incorporada en un contador de centelleo líquido beta durante un minuto. Los ensayos se realizaron por octuplicado.

Las células epiteliales provenientes del tumor C4-2-HI se adhieren a la placa y dividen rápidamente para luego prácticamente detener su proliferación celular. Por lo tanto, modificamos el protocolo para hacer los ensayos de proliferación celular con este tipo de células. Las mismas se sembraron directamente en placas de 96 hoyos en DMEM F12 con SFBch 5%. Tres horas más tarde, se lavaron las células con PBS 1X y se iniciaron los tratamientos correspondientes por 48 h en DMEM F12 con SFBch 1%.

- ***Líneas celulares:*** se sembraron 5000 células por hoyo en una placa de 96 hoyos y se procedió de la misma manera que se describió más arriba para los cultivos primarios derivados de tumores mamarios murinos. Las líneas T47D-WT, -Y, -YA e -YB se sembraron

directamente en DMEM F12 con SFBch 5% y a las 24 h se comenzaron los tratamientos por 48 h en DMEM F12 con SFBch 1%.

CONTEO CELULAR

- **Líneas celulares:** se sembraron 8000 células por hoyo en una placa de 24 hoyos y se incubaron durante 24 h en DMEM F12 con SFB 10%. Al día siguiente, se lavaron las células con PBS 1X estéril y se incubaron durante cinco días con las soluciones cuyo efecto se deseaba evaluar en presencia de SFBch 5%. A las 48 h se renovó la mitad del medio de cultivo manteniendo cada uno de los tratamientos. Al quinto día las células fueron tripsinizadas y se cuantificó el total de células por hoyo en una cámara de *Neubauer*.
- Para el tiempo de duplicación, se sembraron 8000 células por hoyo en una placa de 24 hoyos y se incubaron durante 72 h en DMEM F12 con SFB 10%. Al tercer día y durante los siguientes cuatro días se contó por la mañana y por la tarde el número de células por hoyo utilizando una cámara de *Neubauer*. Se cambió el medio de cultivo tres veces por semana, siempre por DMEM F12 con SFB 10% para asegurar el crecimiento exponencial de las células.

EXTRACTOS PROTEICOS TUMORALES

Se realizaron extractos tumorales totales a partir de tumores mamarios murinos (C4-HI, C4-HIR, C4-2-HI, 59-2-HI, 59-HI, C7-2-HI, C7-2-HIR y C7-HI). Para ello, se pesaron los tumores y luego se agregó 4 veces su peso de *buffer* A, junto con inhibidores de proteasas (ver *Apéndice*). A continuación, los tumores se homogeneizaron (polytron, Teckmar) y se obtuvo un homogenato que se dejó reposar en hielo durante 30 min en agitación para favorecer la lisis. Se sonicaron los extractos tres veces durante diez segundos en hielo y luego se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se congeló inmediatamente a -70°C hasta ser utilizado en ensayos de *Western blot*. Se estimó la concentración de proteínas por el método de *Lowry*.

EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES

Se realizaron extractos celulares totales tanto de cultivos primarios de tumores mamarios murinos (C4-HI, C4-HIR, C4-2-HI, 59-HI, 59-2-HI, C7-2-HI, C7-HI y C7-2-HIR) como de líneas celulares tumorales humanas que crecen en cultivo (T47D-WT, -YA, -YB, -YA-Vac, -YA-18, -YA-22, -YA-22,5 e -YA-34 kDa).

En todos los casos, los cultivos se lavaron con PBS 1X y las células fueron recolectadas y centrifugadas a 3300 rpm por 10 min. El *pellet* de células se resuspendió en *buffer* RIPA junto con inhibidores de proteasas (ver *Apéndice*). Se incubaron los lisados en hielo durante media hora en agitación para favorecer la lisis. Se sonicaron los extractos para romper las membranas nucleares y luego se centrifugaron a 12.000 rpm (Centrífuga 5415 R, Eppendorf) durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se congeló inmediatamente a -70°C y se lo guardó hasta ser utilizado en ensayos de *Western blot*. Se estimó la concentración de proteínas por el método de *Lowry*.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS - MÉTODO DE LOWRY

Para la cuantificación de proteínas totales en los extractos proteicos celulares y tumorales se utilizó el método de *Lowry* (*Lowry et al. 1951*). Para la curva estándar se utilizaron concentraciones crecientes (10-100 µg/ml) de albúmina (BSA; Sigma Co, St. Louis, MI, EE.UU.) a partir de una solución madre de 2 mg/ml. Se utilizaron 3 y 5 µl para extractos tumorales y celulares, respectivamente. En todos los casos se llevó a volumen (100 µl) con agua destilada (ROUX) y se agregaron 900 µl de la Solución 1 (0,5 ml de CuSO₄ y 0,5 ml de tartrato de Na₂K, llevar a 50 ml con *buffer* Na₂CO₃ 2% y NaOH 0,1 N). Se agitaron las muestras con un *vortex* e incubaron durante diez minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 100 µl del reactivo Folin (Folin-Ciocalteu, Anedra), diluido a la mitad en agua destilada ROUX. Luego de 30 minutos se midió la absorbancia a 750 nm en un lector de ELISA. A partir de los valores de absorbancias se calcularon las concentraciones de proteínas de las muestras analizadas. Todas las muestras, incluidas las de la curva estándar, se realizaron por duplicado.

WESTERN BLOT

Los extractos proteicos se separaron en un gel de poliacrilamida discontinuo utilizando el sistema de *buffers* discontinuos de *Laemmli* (*Laemmli 1970*). Antes de la separación, las proteínas se diluyeron en solución desnaturizante (*Cracking Buffer*, ver *Apéndice*) y se incubaron a 100°C durante 5 min. En cada gel se sembraron las muestras correspondientes (50-100 µg de proteína/calle) junto con un marcador de pesos moleculares conocidos (PageRuler, Life Technologies, Argentina). La separación se realizó durante 20-30 min a 20 mA/gel hasta que las muestras pasaran el gel concentrador, y por aproximadamente 120 min a 25 mA/gel, en el gel separador.

Concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante dos horas a 80 V. A continuación, las membranas se bloquearon durante una hora en

solución de bloqueo (ver *Apéndice*) y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes ON a 4°C, en agitación. Al día siguiente, el anticuerpo primario se lavó con TBS-T (ver *Apéndice*) y se agregó el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa. Las bandas inmunorreactivas se revelaron mediante el agregado de un sustrato que genera una señal quimioluminiscente al ser modificado por la enzima peroxidasa (ver *Apéndice*). Para visualizar la señal, las membranas se expusieron a una placa radiográfica. Finalmente, las placas se escanearon con un escáner digital y las bandas se cuantificaron el programa *ImageJ*.

INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Los cortes tumorales se desparafinaron en xileno durante 30 min y se rehidrataron por pasajes sucesivos en soluciones de etanol/agua destilada, de concentración decreciente (etanol 100, 96 y 70%). A continuación, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10% en metanol/H₂O_d al 70%, durante 20 min. Luego de una serie de lavados con PBS 1X (ver *Apéndice*) se bloqueó con BSA 5% (Sigma Co, St. Louis, MI, EE.UU.) en PBS 1X durante una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Los cortes histológicos se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en BSA 2,5% (Sigma Co, St. Louis, MI, EE.UU.) en PBS 1X, ON a 4°C en cámara húmeda. Luego, se realizaron una serie de lavados en PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en solución de bloqueo, durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de varios lavados con PBS 1X se revelaron los anticuerpos. Las reacciones antígeno-anticuerpo se amplificaron utilizando el Complejo Avidina Biotina (ABC, *Kit Vectastain*; Vector) y la marca se reveló con 3-3 diaminobencidina (DAB, DAKO). Para contrastar la marca positiva, los núcleos se tiñeron con hematoxilina (Biopur). Para deshidratar los cortes se los pasaron por alcoholes de graduación creciente y se incubaron en xileno, para luego montarlos en medio sintético (DPX, Sigma Aldrich). Como control de especificidad de la señal del anticuerpo secundario se omitió el anticuerpo primario en algunos cortes, reemplazándolo por PBS 1X.

Los cortes histológicos se observaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse E800. Las imágenes se obtuvieron con una máquina digital Nikon asociada a este microscopio y el *software* ACT-2U. Para cada anticuerpo se procesaron las muestras a comparar entre sí en el mismo momento y en iguales condiciones de procedimiento.

INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

Se sembraron las células en placas de 24 hoyos a las que previamente se les había colocado un cubreobjetos (Cover glass, 12 mm HDA) estéril. El día anterior a ser utilizadas se cambió el medio de crecimiento por un medio con SFBch 1%. Las células se lavaron con PBS 1X frío y fueron fijadas en formalina 10%. Se lavó luego con PBS 1X y se bloqueó con SFB 10% en PBS 1X durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se incubó con el primer anticuerpo diluido 1:100 en SFB 5% en PBS 1X ON a 4°C. Se lavó con PBS 1X y se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario 1:100 en SFB 5% en PBS 1X. Se tiñeron los núcleos con DAPI (1 µg/ml) o ioduro de propidio (IP, 1 µg/ml) durante 10 min, se lavó y se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Labs). Las observaciones microscópicas se llevaron a cabo en un microscopio confocal Eclipse E800 Nikon y las fotografías se obtuvieron con una máquina digital Nikon (Coolpix, Nikon modelo E995) asociada a este microscopio y el *software* EZ-C1 2.10. Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por PBS 1X. Para cada anticuerpo se procesaron las muestras a comparar entre sí en el mismo momento y en iguales condiciones.

DETECCIÓN DE GFP

Se detectó la expresión de GFP observando directamente la fluorescencia al microscopio. Las células se fijaron con PFA 4% frío y se contratiñeron los núcleos con IP (1 µg/ml) durante 10 min. Luego, se montaron los preparados con solución de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Labs) y se procedió de la misma forma que lo descrito anteriormente para las IF.

DISEÑO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Se midieron los tumores con calibre *Vernier* (ancho y largo, mm²) dos veces por semana. Con estos datos se elaboraron las curvas de crecimiento (mm² vs. tiempo) para los diferentes tratamientos en las variantes tumorales estudiadas. Los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado.

- **Tumores murinos (aloinjertos):** como se describió anteriormente para el mantenimiento de los tumores del modelo murino, se trasplantaron trozos (2-3 mm³) del tumor que se deseaba estudiar en el flanco inguinal derecho de ratones hembras BALB/c. Los tratamientos comenzaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 25 mm².

- **Líneas celulares humanas (xenoinjertos):** se inocularon 7×10^6 en el sc. del flanco inguinal derecho de ratones hembras NSG, a las cuales se les había implantado un *pellet* de estradiol de 0,25 mg (Sahores *et al.* 2013) en el dorso 48 h antes. Los tratamientos comenzaron el día 8-12 posterior a la inoculación de las células.

TRATAMIENTO CON MFP

El tratamiento con MFP (*pellet* de 6 mg, sc. en el dorso - (Sahores *et al.* 2013) comenzó cuando los tumores murinos alcanzaron un tamaño aproximado de 25 mm² y, en el caso de los xenoinjertos, el día 8-12 posterior a la inoculación de células.

TRATAMIENTO CON BGJ398

El tratamiento con BGJ398 (10-30mg/kg/día por medio, de forma endovenosa; ev.), solo o combinado con MFP, comenzó 10 días después del trasplante o cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 25 mm². El inhibidor se administró de dos formas diferentes, según se indica en la bibliografía: **a)** se inoculó dos o tres veces por semana de forma retroorbital, **b)** se administró de forma oral (tres veces por semana) con una sonda gástrica (22G). En ambos casos, la solución madre (0,06 mg/ml; en DMSO) se diluyó en solución fisiológica para llegar a la dosis correspondiente a cada ensayo.

TOMA DE MUESTRAS

Mediante un corte sc. ventral se extirparon los tumores, se pesaron y descartaron las zonas necróticas que, por lo general, se encuentran en el centro del tumor. Las muestras destinadas a estudios de *Western blot* se guardaron inmediatamente a -70°C hasta su uso. Las muestras destinadas a estudios de inmunohistoquímica se fijaron en formalina al 10% en PBS 1X (ver *Apéndice*) para ser luego incluidos en parafina según técnicas de rutina. Para los análisis histológicos se realizaron cortes de 5 μm y tinciones de hematoxilina-eosina, PAS y Alcian Blue, según correspondiese.

ENSAYOS DE METÁSTASIS

Para el análisis de metástasis, al finalizar los experimentos se removieron los pulmones, se los insufló con formalina 10% y se fijaron durante 48 h más en formalina 10%. Finalmente, se los incluyó en parafina según técnicas de rutina. También se realizaron autopsias completas en las que se extrajeron fragmentos de otros órganos (ganglio axilar, corazón, hígado, bazo, estómago, intestinos delgado y grueso, mama, útero y ovario) en búsqueda de posibles

metástasis. Para cada grupo experimental se determinó el número total de focos metastásicos por ratón. Los focos se cuantificaron en microscópico recorriendo la totalidad del preparado con los cinco lóbulos pulmonares.

- **Tumores murinos (C7-HI):** para evaluar el efecto de BGJ398 sobre la diseminación metastásica de los tumores C7-HI, se utilizó un protocolo que nos permitió prolongar el experimento sin exceder el tamaño tumoral permitido (el diámetro mayor de los tumores no puede exceder 2 cm). Se trasplantaron fragmentos de tumor en el flanco inguinal derecho de ratones BALB/c y se los dejó crecer por 20 días, durante los cuales se realizó el primer ciclo de tratamientos. Al día 20 se removieron quirúrgicamente los tumores y se continuó monitoreando el crecimiento de los tumores recidivantes durante 20 días más. En este intervalo se realizó el segundo ciclo de tratamientos. Los ensayos se finalizaron aproximadamente al día 40.
- **Líneas celulares humanas (T47D-YA-Vac, -YA-18 e -YA-22,5 kDa):** en los experimentos donde evaluamos la capacidad metastásica de las líneas celulares derivadas de T47D-YA, los ensayos se finalizaron aproximadamente al día 59.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA LOS ENSAYOS DE ELISA

- **Extractos celulares:** se utilizaron los mismos extractos celulares que en los ensayos de *Western blot*.
- **Medios condicionados celulares:** se sembraron 30.000 células por hoyo en placas de 6 hoyos en DMEMF12 con 10% SFB hasta que alcanzaron una confluencia de 80%, aproximadamente. Luego, las células se lavaron con PBS 1X, se incubaron en medio libre de suero durante 48 h y se recolectó el sobrenadante. El mismo fue centrifugado a 1000 rpm durante 10 min para remover detritos celulares y el SN se conservó a -20°C hasta su posterior uso.
- **Suero murino:** se realizó un pinchazo (aguja 18G, BD Precision Glide) en el seno venoso mandibular de animales de cuatro meses de edad, portadores o no de tumores. Se recolectó aproximadamente 0,7-1,2 ml de sangre y se la dejó coagular. Luego, las muestras se centrifugaron dos veces a 13.000 rpm durante 20 min y se conservó el suero a -20°C hasta su posterior uso.

CUANTIFICACIÓN DE FGF2 POR ELISA

Para determinar los niveles de FGF2, tanto en los medios condicionados (MC) como en los extractos totales de células o en los sueros de ratones, se realizaron ensayos de ELISA para FGF2 (FGF basic mouse ELISA Kit ab100670, Abcam). Cabe aclarar que este *Kit* detecta todas las isoformas de FGF2. Los ensayos se realizaron dos veces y cada muestra por duplicado. Las determinaciones se realizaron según las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva estándar de FGF2 (9-600 pg/ml), y, según el tipo de muestra analizada, se sembraron diferentes diluciones de las mismas para que los valores pudieran estar comprendidos en la curva estándar:

- **Extractos celulares:** se sembraron 50 μ l de cada muestra y luego se relativizó a la cantidad de proteína total presente en cada extracto (estimada por *Lowry*).
- **MC provenientes de cultivos primarios:** se sembraron 100 μ l de cada uno.
- **MC de cultivos de las líneas celulares:** se hicieron diluciones 1/10 utilizando el *buffer* de dilución propuesto por el fabricante.
- **Sueros de ratones:** se sembraron 100 μ l de cada uno.

CONCENTRACIÓN DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS

Si bien los niveles de FGF2 detectados por la técnica de ELISA en los medios condicionados de las células infectadas con las diferentes isoformas de FGF2 fueron bastante elevados, las muestras no se encontraban lo suficientemente concentradas como para distinguir las diferentes bandas por la técnica de *Western blot*. Para estudiar las isoformas que son liberadas a los medios condicionados, se concentraron las muestras por evaporación parcial. Se colocaron los tubos abiertos con las muestras en la estufa a 50°C durante aproximadamente 6 h. Una vez evaporada aproximadamente la mitad del volumen, se utilizó la muestra según las instrucciones para *Western blot* y se sembró la totalidad del volumen (50 μ l aproximadamente).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y CUANTIFICACIONES

Para el análisis estadístico se usó el software *GraphPadPrism* (Versión 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc.). En todas las figuras se muestra con asteriscos el grado de significación estadística con respecto al grupo control y mediante letras la comparación entre grupos.

En los ensayos de *Western blot*, la intensidad de las bandas se cuantificó con el software *ImageJ* (1.345 NIH) y sólo se cuantificaron exposiciones no saturadas. Las cuantificaciones se

realizaron con los valores relativizados de por lo menos tres corridas electroforéticas de muestras independientes, salvo que se especifique lo contrario. En todos los casos, los valores se relativizaron a aquellos obtenidos para los tumores de las variantes sensibles. Las intensidades se compararon con ANOVA y *test* de *Tukey* para las comparaciones entre grupos. Se utilizó la prueba “t” de *Student* para la comparación de dos grupos entre sí.

En los experimentos de proliferación celular y recuento de células se relativizaron los valores de cada grupo experimental respecto a los obtenidos para el grupo control. Luego, los valores se compararon con ANOVA y *test* de *Tukey* para comparar grupos experimentales entre sí. Se utilizó la prueba “t” de *Student* para la comparación de dos grupos entre sí. Para los ensayos de tiempo de duplicación se realizó un ANOVA de dos vías y *test* de *Tukey* para comparar grupos experimentales entre sí.

En los experimentos de ELISA se relativizaron los valores de cada grupo experimental respecto a los obtenidos para la variante tumoral sensible o el grupo control (sin tumor), salvo que se especifique lo contrario. En el caso de los MC, primero se relativizó a la cantidad de proteína total de cada muestra (calculada por *Lowry*). Finalmente, los valores se compararon con ANOVA y *test* de *Tukey* para comparar grupos experimentales entre sí. Se utilizó la prueba “t” de *Student* para la comparación de dos grupos entre sí.

Las diferencias entre los experimentos *in vivo* se evaluaron realizando una regresión lineal para cada grupo y comparando las pendientes de las curvas. Todos los experimentos *in vivo* se repitieron dos veces, salvo que se especifique que fue un experimento preliminar, en cuyo caso, se realizó una única vez. Las diferencias entre pesos y tamaños tumorales se calcularon con la prueba “t” de *Student*.

Para calcular la cantidad de lúmenes y su diámetro en secciones tumorales (H&E) se fotografiaron 5 campos (aumento de 200X) de 5 tumores de cada grupo experimental. Luego, se utilizó el programa *ImageJ* para contar el número de lúmenes por campo y se midió el diámetro mayor de cada lumen para calcular el diámetro promedio. Para calcular el área estromal, se fotografiaron secciones tumorales (aumento de 200X) que previamente habían sido inmunomarcadas para el anticuerpo α SMA (5 campos de 5 tumores cada grupo). Se utilizó *ImageJ* para medir el área correspondiente al tejido estromal y se calculó un índice (área

marcada/área total). En todos los casos, las diferencias entre medias de dos tratamientos se evaluaron con una prueba “t” de *Student*.

Para calcular diferencias en el potencial metastásico en los tumores C7-HI se cuantificaron los 5 lóbulos pulmonares (aumento de 200X) de cada ratón en busca de focos metastásicos. Se comparó la presencia o ausencia de metástasis con el *test* de *Chi Cuadrado*. En los xenotrasplantes -YA cuantificamos la cantidad de focos metastásicos mayores a 10 células (aumento de 200X). Luego se compararon los valores con un ANOVA y *test* de *Tukey* para comparar grupos experimentales entre sí.

RESULTADOS

*“Las verdades que revela la ciencia
superan siempre a los sueños que destruye”*

Ernest Renan

RESULTADOS PARTE 1: *Carcinomas mamarios murinos*

Expresión por inmunohistoquímica de FGF2, FGFR1 y FGFR2 en carcinomas mamarios murinos con distinta sensibilidad endocrina.

Familia C4

Los tumores C4-HI derivan de un tumor C4-HD, que depende de la administración exógena de MPA para crecer. Sin embargo, esta variante crece independientemente de la administración de la hormona, es sensible a la terapia con antiprogéstágenos (**Figura r-1A**) y está compuesta por grupos cohesivos de células epiteliales rodeados de estroma (**Figura r-1B**). El tumor tiene un alto grado de diferenciación. Se observan abundantes estructuras glandulares.

La variante tumoral C4-HIR deriva de un tumor C4-HI que, por exposición prolongada con MFP, adquirió resistencia endocrina (**Figura r-1A**). El tumor presenta sólo algunas luces dentro del parénquima tumoral y se lo clasifica como moderadamente diferenciado (**Figura r-1B**).

La variante C4-2-HI también deriva de un tumor C4-HD, crece independientemente de la administración de la hormona y, desde el comienzo, presentó resistencia a la terapia endócrina (**Figura r-1A**). Este tumor presenta una histología pobremente diferenciada, con láminas de células epiteliales y escaso estroma tumoral (**Figura r-1B**).

Inmunohistoquímica:

El tumor C4-HI presenta la marca de FGF2 casi exclusivamente en el estroma tumoral, mientras que en las variantes resistentes la marca es intensa en el citoplasma del parénquima tumoral (**Figura r-2**).

Por otra parte, la variante C4-HI presenta una marca citosólica tenue de FGFR1 en el parénquima tumoral mientras que, en los tumores resistentes, la marca citosólica en el parénquima es intensa. Además de la marca citosólica, la variante C4-2-HI presenta zonas con una fuerte marca nuclear.

Para el FGFR2, la variante C4-HI presenta marcas en el citosol y en algunos núcleos del parénquima tumoral, mientras que, en ambas variantes resistentes, la marca se encuentra casi exclusivamente en los núcleos del epitelio.

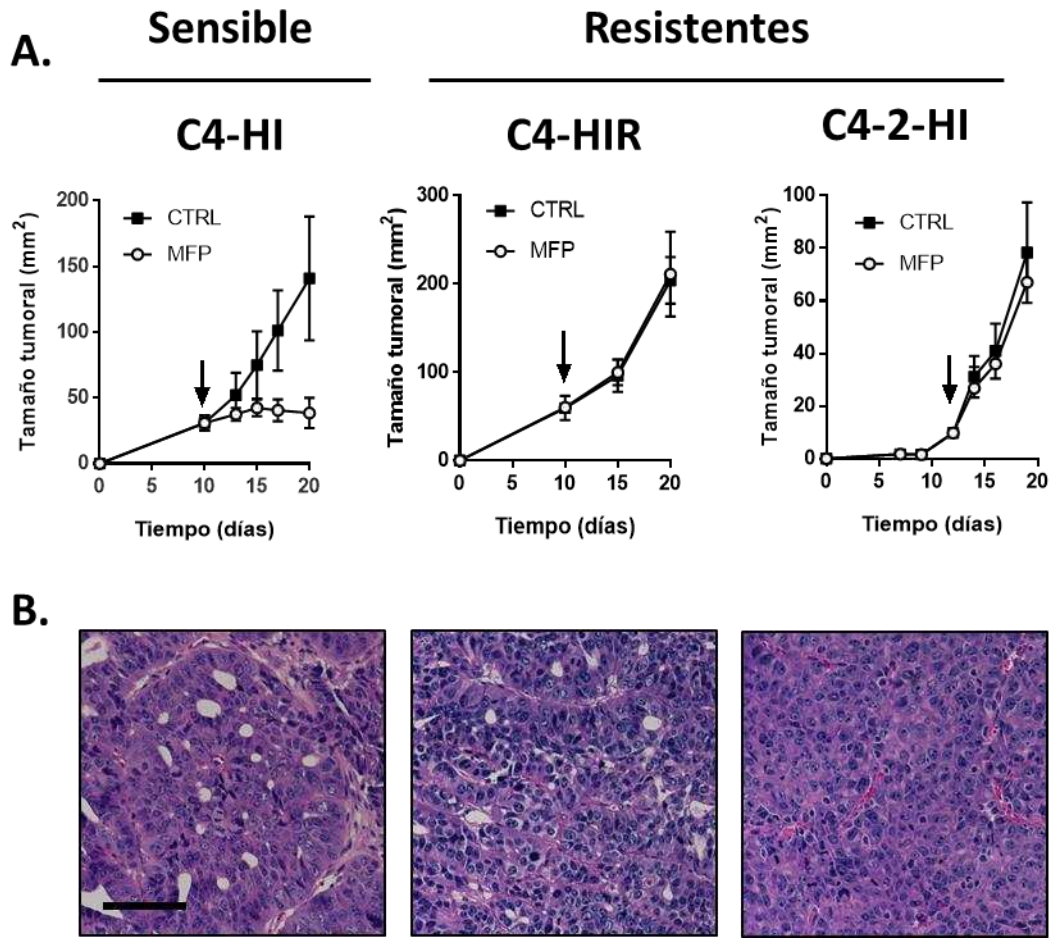


Figura r-1: (A) Curvas de crecimiento de carcinomas mamarios murinos C4-HI (sensible), C4-HIR (resistente adquirido) y C4-2-HI (resistente constitutivo). (B) Histología tumoral (H&E) de las variantes tumorales de la familia C4 control (no tratadas con MFP). Barra de magnificación: 100 μ m. *Datos tomados de experimentos previos del laboratorio.*

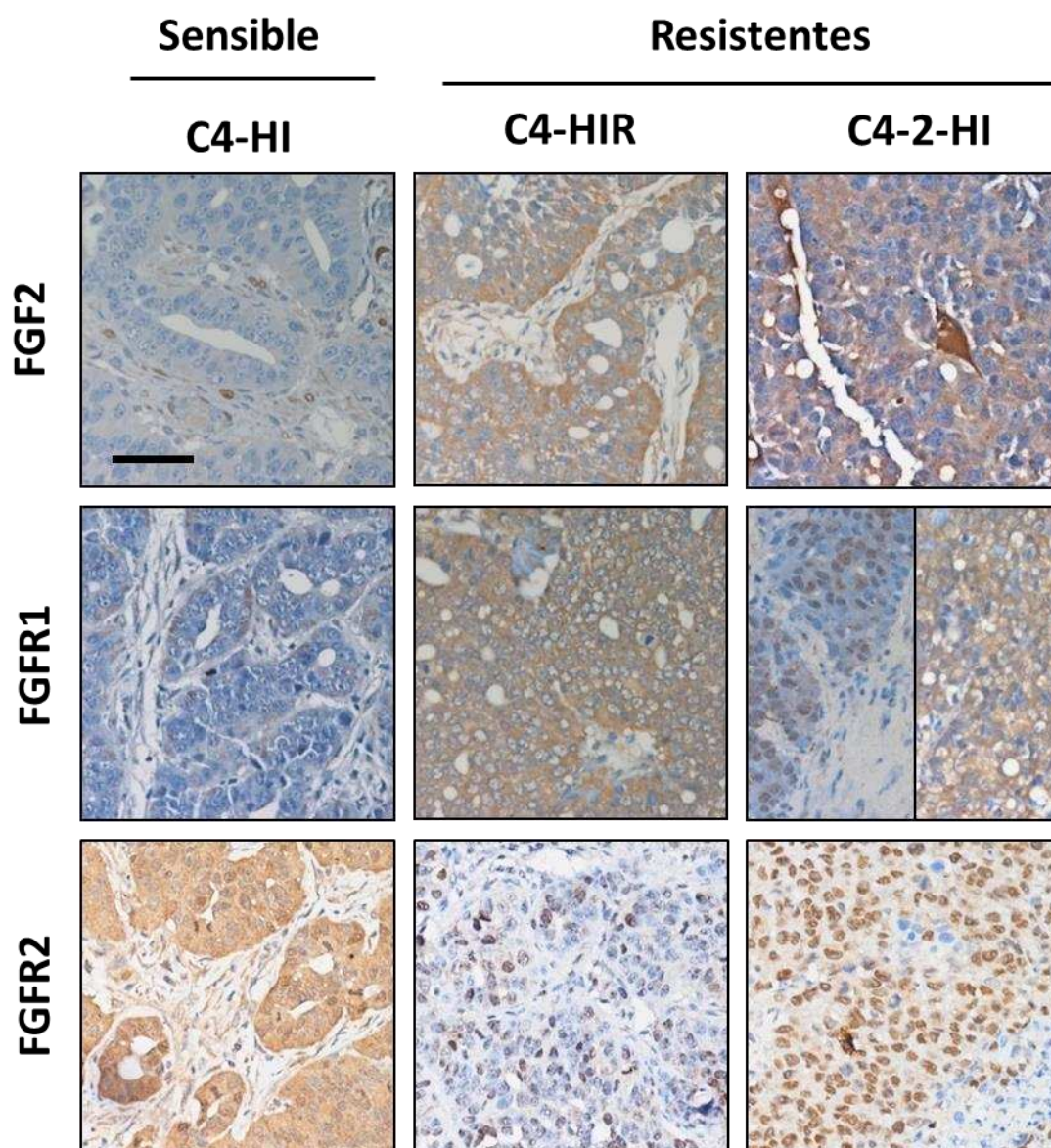


Figura r-2: Expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 determinada por inmunohistoquímica de carcinomas mamarios murinos C4-HI (sensible), C4-HIR (resistente adquirido) y C4-2-HI (resistente constitutivo). Barra de magnificación: 60 μ m.

A partir de los resultados obtenidos, nos propusimos validar la expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 en otras dos familias tumorales del modelo murino: las familias 59 y C7.

Familia 59

Como se observa en la **Figura r-3A**, esta familia cuenta con una variante sensible a la terapia endocrina (59-2-HI), una variante resistente adquirida (59-2-HIR) y una constitutiva (59-HI).

El tumor 59-2-HI es sensible a la terapia con antiprogéstágenos e histológicamente está compuesto por nidos sólidos epiteliales rodeados de estroma. En el parénquima hay formaciones glandulares y por eso se lo considera un tumor moderadamente diferenciado (**Figura r-3B**).

La variante 59-2-HIR deriva del tumor 59-2-HI que, por exposición prolongada al MFP, adquirió resistencia (**Figura r-3A**). Está compuesto por nidos de células tumorales rodeadas de finos tabiques estromales y se lo considera también un carcinoma moderadamente diferenciado (**Figura r-3B**).

El tumor 59-HI tampoco responde a la terapia endocrina (**Figura r-3A**) y su histología corresponde a la de un carcinoma ductal poco diferenciado (**Figura r-3B**). Crece en nidos epiteliales rodeados de escasa cantidad de estroma.

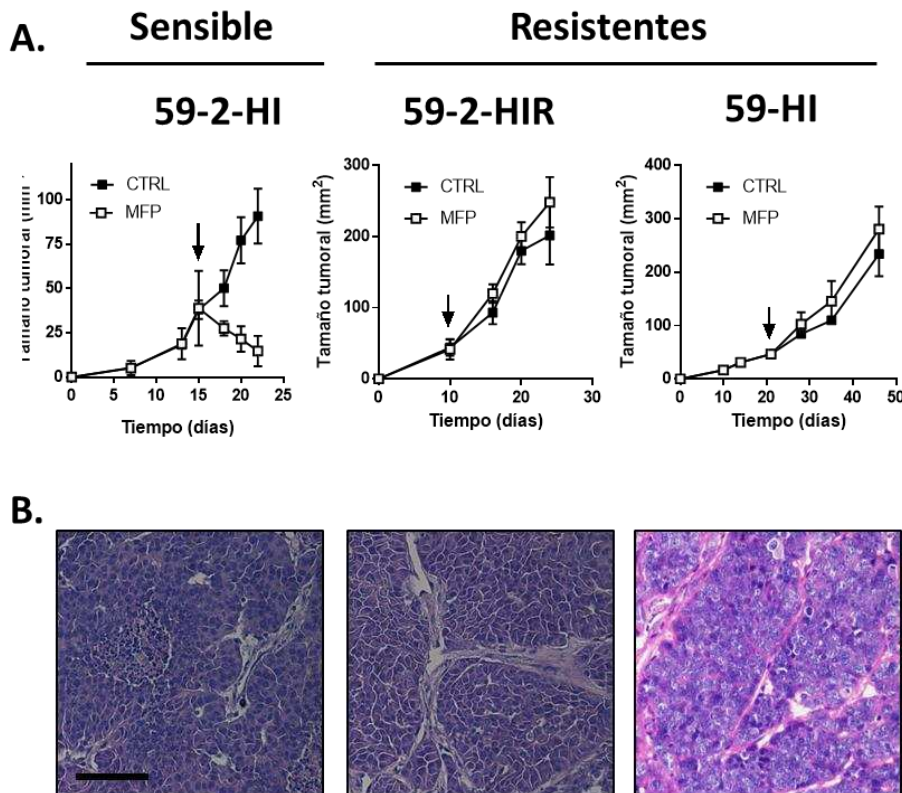


Figura r-3: (A) Curvas de crecimiento de carcinomas mamarios murinos 59-2-HI (sensible), 59-2-HIR (resistente adquirido) y 59-HI (resistente constitutivo). (B) Histología tumoral (H&E) de las variantes tumorales de la familia 59 control (no tratadas con MFP). Barra de magnificación: 100 μ m. Datos tomados de experimentos previos del laboratorio.

Imunohistoquímica:

Evaluamos la expresión de FGF2 y de sus receptores en carcinomas mamarios murinos de la familia 59 y observamos que las variantes resistentes expresan mayores niveles de FGF2 y FGFR1 en comparación con la variante sensible (**Figura r-4**).

La localización del FGF2 en los tumores resistentes es citoplasmática y epitelial en contraposición con la localización mayormente nuclear y estromal en el tumor sensible 59-2-HI.

Observamos que, en los tumores resistentes, el FGFR1 se localiza en el epitelio tumoral con una distribución citoplasmática fuerte, mientras que, en la variante sensible, la marca es más tenue.

En cuanto a la expresión de FGFR2, observamos que el parénquima de los tumores sensibles y resistentes adquiridos (59-2-HIR) presenta una marca preferentemente citosólica y que la variante resistente constitutiva presenta una marca tanto citosólica como nuclear.

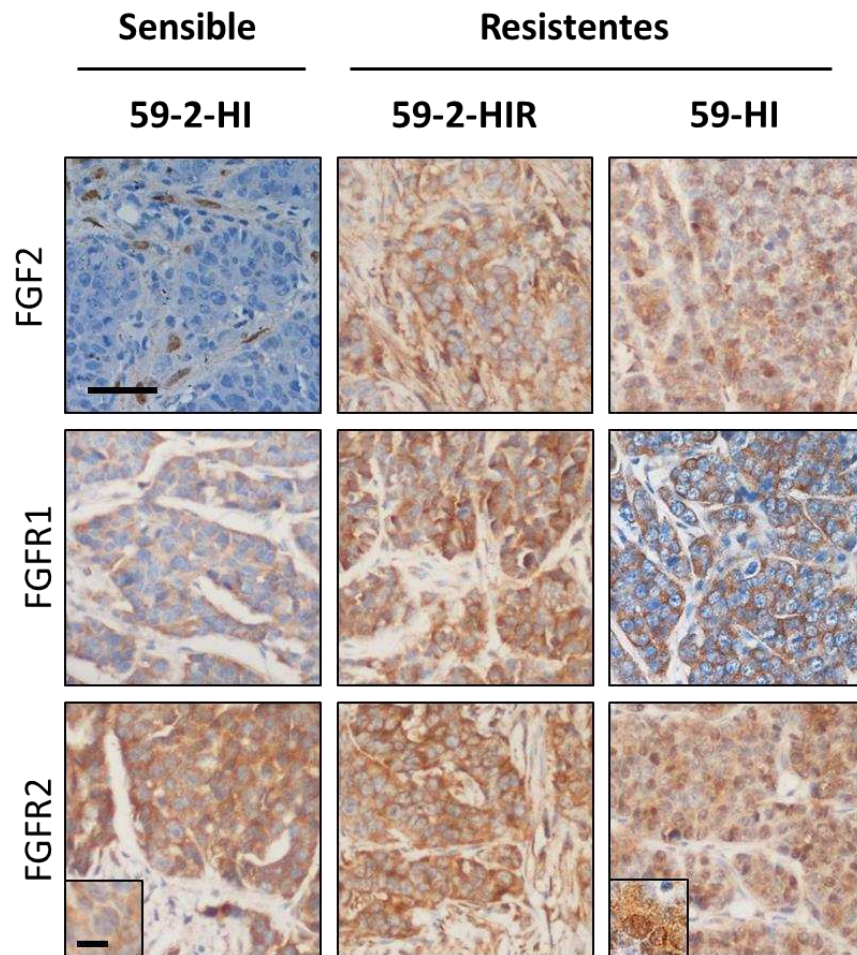


Figura r-4: Expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 determinada por inmunohistoquímica de carcinomas mamarios murinos 59-2-HI (sensible), 59-2-HIR (resistente adquirido) y 59-HI (resistente constitutivo). Barra de magnificación: 60 μ m; inset 10 μ m.

Familia C7

Luego, evaluamos la expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 en la familia C7 que, además de ser carcinomas mamarios de histología ductal y expresar receptores hormonales, son capaces de originar metástasis ganglionares y pulmonares (Vanzulli *et al.* 2005). Como se observa en la **Figura r-5A**, esta familia cuenta con una variante sensible a la terapia endocrina (C7-2-HI), una variante resistente adquirida (C7-2-HIR) y otra constitutiva (C7-HI).

Desde el punto de vista histológico, el tumor C7-2-HI es un carcinoma ductal infiltrante moderadamente diferenciado (**Figura r-5B**). Está compuesto por nidos sólidos y esbozos glandulares rodeados de finos tabiques estromales.

El tumor C7-2-HIR deriva del tumor C7-2-HI, pero es indiferenciado, con escaso número de esbozos ductales. La masa tumoral está compuesta en su totalidad por nidos sólidos de células tumorales con poco estroma interpuesto.

El tumor C7-HI es un carcinoma indiferenciado, al igual que el C7-2-HIR, y se encuentra constituido por nidos sólidos de células tumorales separadas por escasa cantidad de estroma.

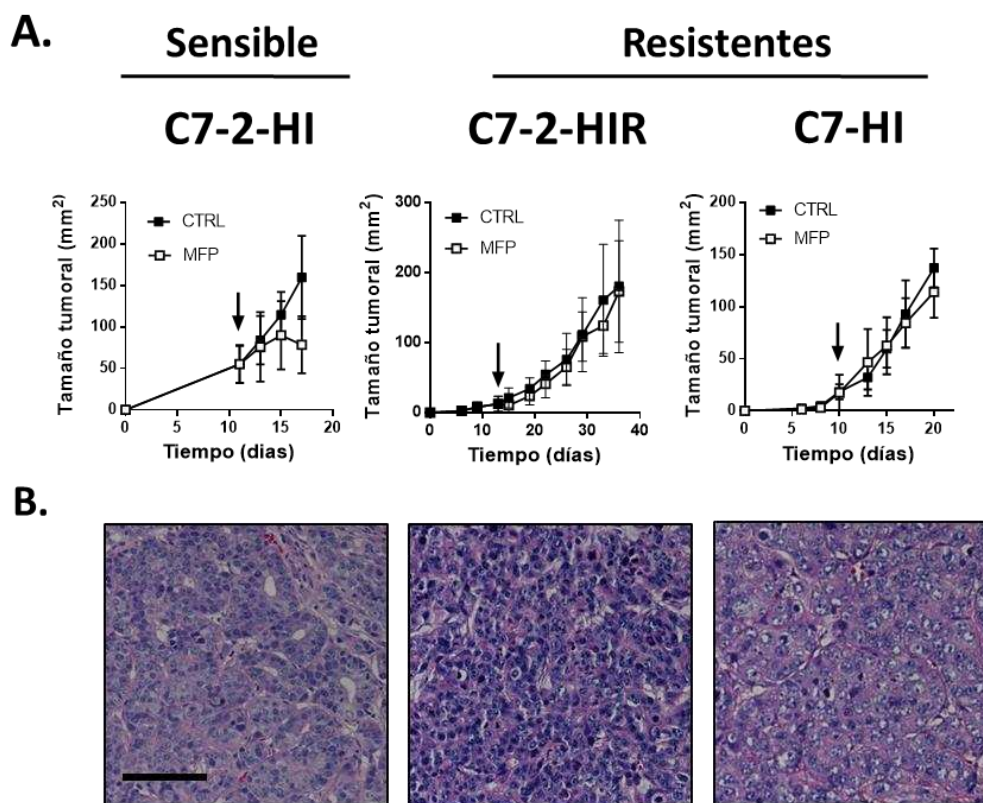


Figura r-5: (A) Curvas de crecimiento de carcinomas mamarios murinos C7-2-HI (sensible), C7-2-HIR (resistente adquirida) y C7-HI (resistente constitutivo). (B) Histología tumoral (H&E) de las variantes tumorales de la familia C7 control (no tratadas con MFP). Barra de magnificación: 100 μ m. Datos tomados de experimentos previos del laboratorio.

Inmunohistoquímica:

Detectamos una expresión intensa de FGF2, FGFR1 y FGFR2 tanto en la variante sensible como en las resistentes (**Figura r-6**).

La marca de FGF2 se encuentra tanto en el compartimento epitelial como en el estroma tumoral de las variantes resistentes, mientras que en la variante sensible se localiza principalmente en el estroma.

En cuanto al FGFR1, observamos que las tres variantes presentan una marcación citosólica en el epitelio tumoral y que los tumores resistentes adquiridos (C7-2-HIR) exhiben una marca más intensa en comparación con las otras dos variantes tumorales.

Además, los tumores resistentes expresan mayor nivel de FGFR2 con relación a la variante sensible y se evidencia un cambio en la localización de la marca. En los primeros, el FGFR2 se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo del parénquima tumoral y en la variante sensible la marca es preferentemente citosólica.

Expresión por Western blot de isoformas de FGF2 y FGFR1 en carcinomas mamarios murinos con distinta sensibilidad endocrina.

Luego, realizamos ensayos por *Western blot* para confirmar las diferencias en la expresión de las isoformas de FGF2 y FGFR1 entre las distintas variantes de las tres familias tumorales.

En las tres familias tumorales observamos bandas inmunorreactivas correspondientes a las isoformas de 17, 20, 20.5 y 30 kDa de FGF2, descritas en ratón (**Figura r-7A, B y C**). Las variantes resistentes expresan mayores niveles de FGF2 total y HMW-FGF2 respecto de las variantes sensibles. La cuantificación se realizó sumando la intensidad de todas las bandas (FGF2 total) o sólo las de 20, 20.5 y 30 kDa (HMW-FGF2). Asimismo, observamos que algunos de los tumores resistentes también presentan mayores niveles de la isoforma liviana de 17 kDa (C4-HIR, 59-HI y C7-2-HIR).

En el caso de la expresión de FGFR1, detectamos dos bandas inmunorreactivas correspondientes a las isoformas glicosilada y no glicosilada, de 125 y 97 kDa, respectivamente. La cuantificación del FGFR1 total muestra una mayor expresión en las variantes resistentes de las familias C4 y 59, respecto a las variantes sensibles. En concordancia con los resultados obtenidos por inmunohistoquímica (**Figura r-6**), no se detectaron diferencias significativas en la expresión de FGFR1 en las tres variantes tumorales C7. En esta familia, a diferencia de lo observado en las variantes sensibles de las familias C4 y 59, no se observan diferencias

significativas en la expresión de FGFR1: si bien las variantes resistentes expresan elevados niveles del receptor, la variante sensible (C7-2-HI) también presenta niveles basales altos.

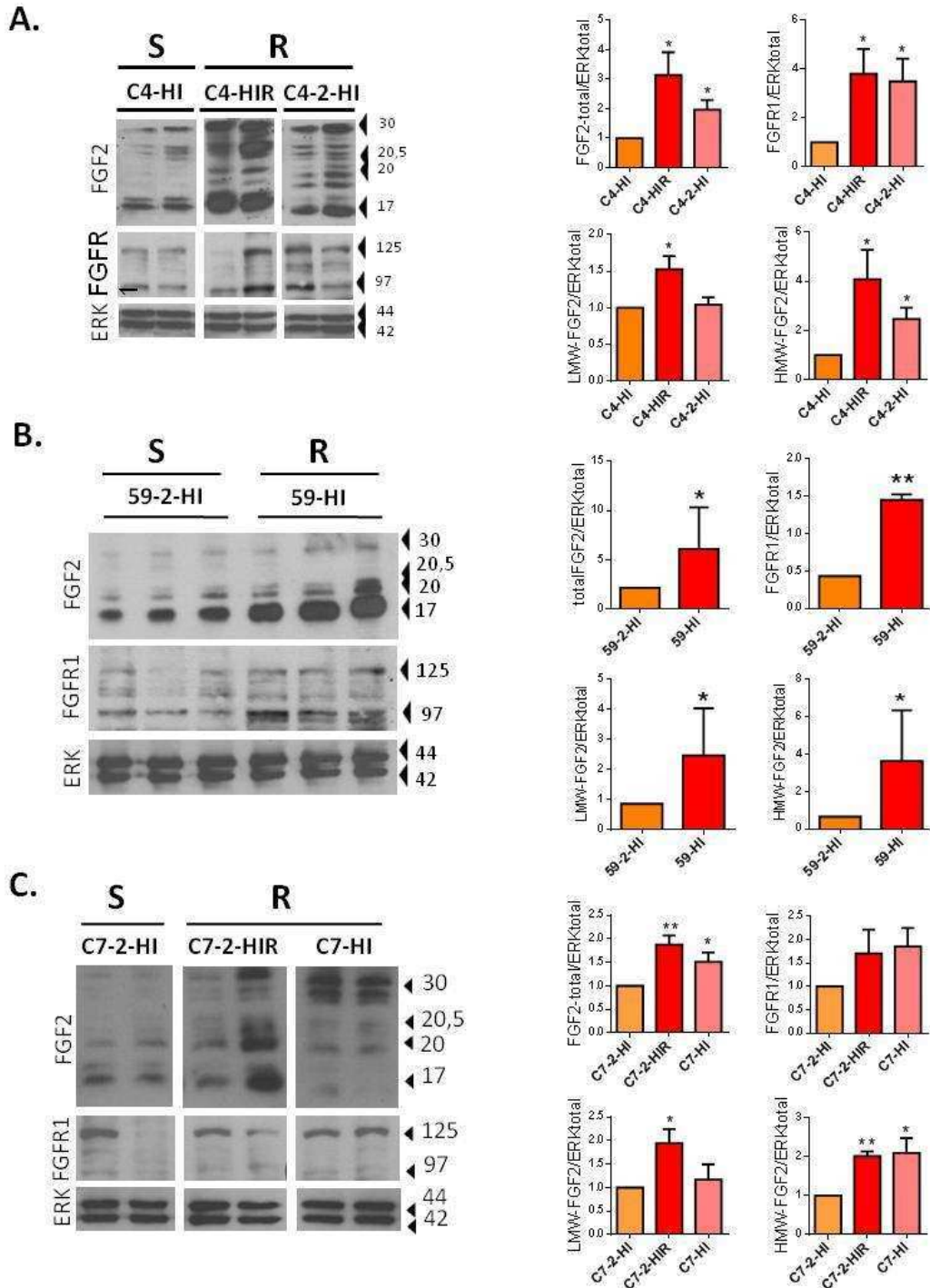


Figura r-7: Expresión de FGF2 y FGFR1 determinada por Western blot de carcinomas mamarios murinos de la familia C4 (A), 59 (B) y C7 (C). Los gels correspondientes a cada familia tumoral se cortaron y reordenaron para facilitar la lectura. Se trata del mismo gel, pero que fue sembrado en otro orden (sensibles, resistentes constitutivos y resistentes adquiridos). (A, B y C; a la derecha) Cuantificación de los niveles de FGF2-total, LMW-FGF2, HMW-FGF2 y FGFR1 a partir de tres ensayos independientes. S: Sensible; R: Resistente. Estadística: ANOVA y Tukey para comparar entre grupos. Para las cuantificaciones de la familia 59: t Test. (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$.

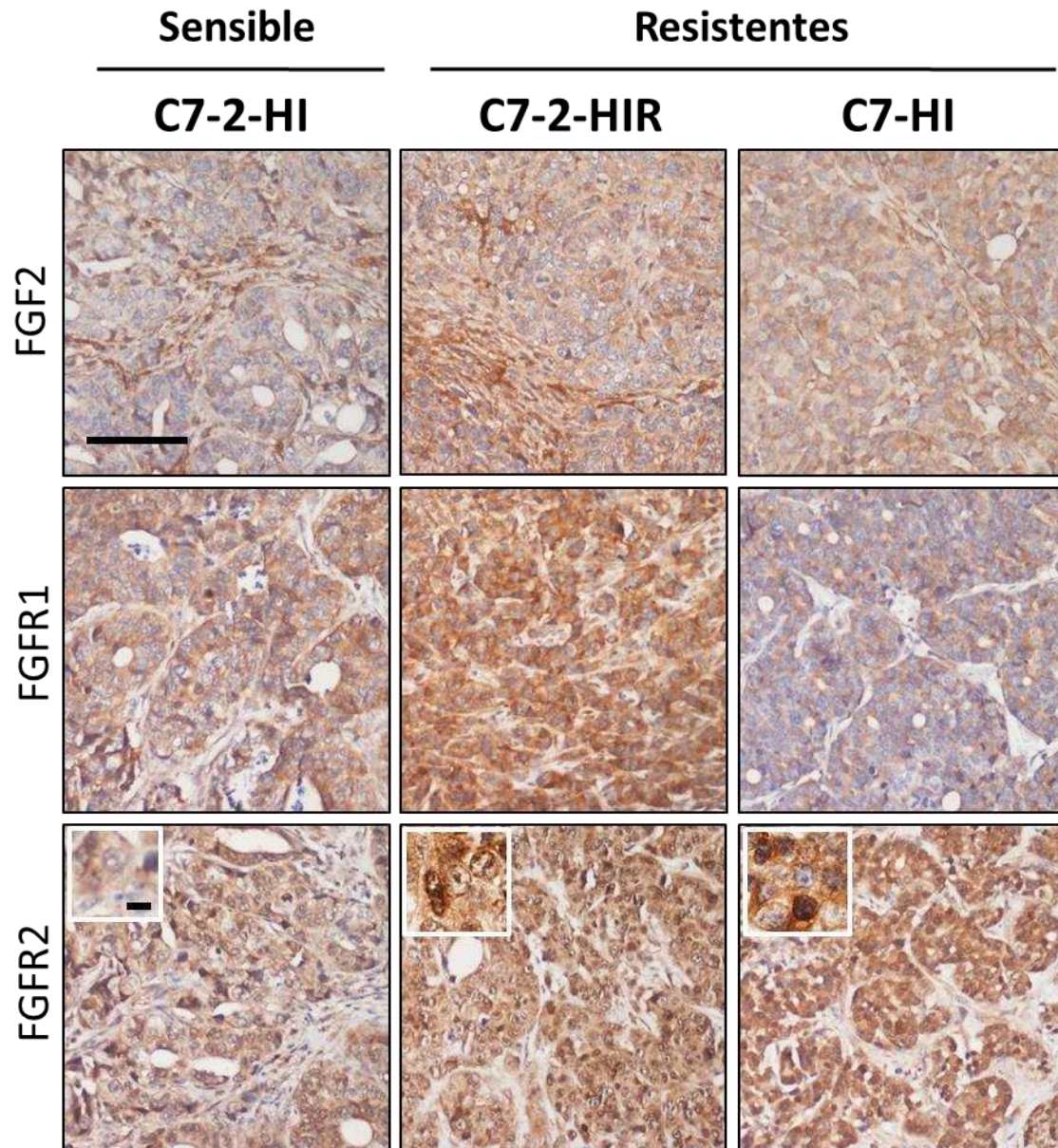


Figura r-6: Expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 determinada por inmunohistoquímica de carcinomas mamarios murinos C7-2-HI (sensible), C7-2-HIR (resistente adquirido) y C7-HI (resistente constitutivo). Barra de magnificación: 100 μ m; inset 10 μ m.

En resumen, hasta aquí observamos que: i) las variantes resistentes de tres familias tumorales, que suelen tener menor proporción de estroma y menor grado de diferenciación, expresan mayores niveles de FGF2 total y HMW-FGF2 respecto de las variantes sensibles, ii) todas las variantes resistentes expresan niveles elevados de FGFR1 respecto a los tumores sensibles, con excepción del tumor C7-2-HI (sensible) que expresa mayores niveles basales de FGFR1 y iii) cinco de las seis variantes resistentes presentan una mayor localización nuclear del FGFR2 respecto de las variantes sensibles.

Conjuntamente, los resultados sugieren que un aumento en la expresión de FGF2 (particularmente de las HMW-FGF2) y FGFR1, junto con la localización preferentemente nuclear de FGFR2, se asocian con la progresión tumoral hacia un fenotipo resistente endocrino.

Efecto de LMW-FGF2 e inhibidores de FGFR sobre la proliferación de células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores mamarios murinos sensibles y resistentes endocrinos.

Con el objetivo de estudiar la funcionalidad de la vía de FGF en la resistencia a la terapia hormonal, realizamos ensayos de proliferación celular por incorporación de ³H-timidina en cultivos primarios de las distintas variantes pertenecientes a las familias C4, 59 y C7 en presencia del factor de crecimiento y de inhibidores selectivos.

Familia C4

Observamos que el agregado de LMW-FGF2 (10 y 100 ng/ml) estimuló significativamente la proliferación de las células epiteliales C4-HI y C4-2-HI (**Figura r-8**). Sin embargo, estas concentraciones no indujeron a cambios significativos en la proliferación de células epiteliales derivadas de tumores C4-HIR, probablemente debido a que la vía se encuentra saturada con la expresión endógena elevada de LMW-FGF2 (**Figuras r-2 y r-7**).

Luego, con el fin de evaluar el rol de la vía de FGFR en la proliferación celular de las células epiteliales, estudiamos el efecto de los inhibidores de FGFR, el PD 173074 (0,01-1 μ M) y el BGJ398 (0,1-10 nM). Observamos que concentraciones de 10 nM y 1 μ M de BGJ398 y PD 173074 respectivamente, inhibieron significativamente la proliferación celular de las tres variantes tumorales en condiciones control (SFBch 1%) y, en el caso de los cultivos primarios de C4-HI y C4-2-HI, también inhibieron el aumento de la proliferación inducida por LMW-FGF2 (100

ng/ml; **Figura r-9**). Cabe destacar que el BGJ398 inhibió la proliferación celular a menores concentraciones que las necesarias con PD 173074. Estas diferencias se asocian probablemente a la acción más potente y selectiva del BGJ398 sobre los FGFR.

Estos resultados indican que la vía del FGF2/FGFR está involucrada en la proliferación celular de los tumores de la familia C4, independientemente de su respuesta a la terapia endocrina.

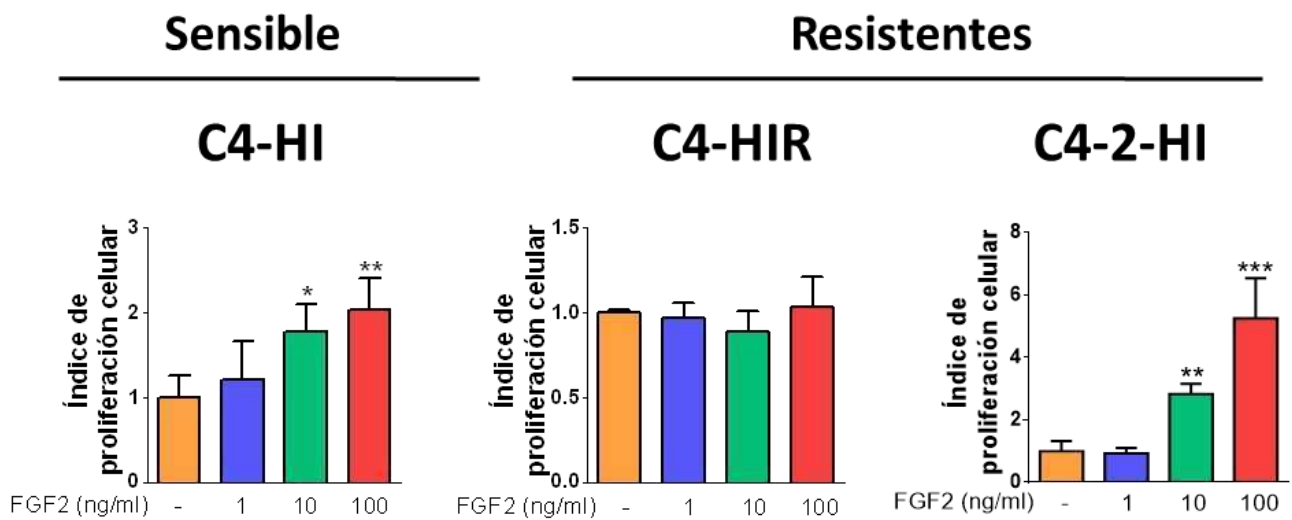


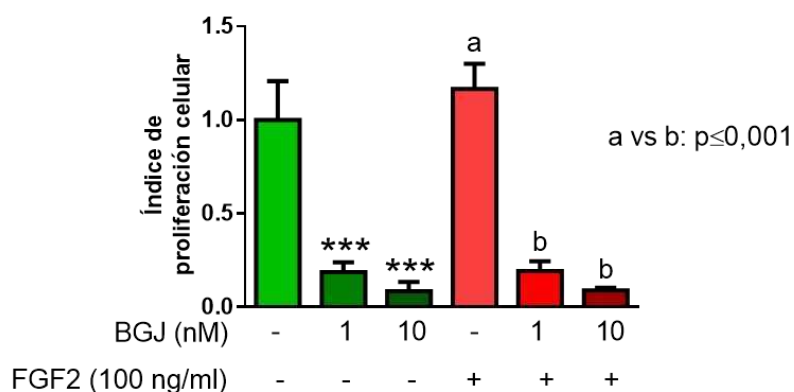
Figura r-8: Proliferación celular medida por incorporación de ^3H -timidina en cultivos primarios de las tres variantes tumorales de la familia C4: C4-HI (sensible), C4-HIR (resistente adquirido) y C4-2-HI (resistente constitutivo). Las células fueron tratadas con distintas concentraciones de LMW-FGF2 (1-100 ng/ml) por 48 h. Se muestra un ensayo representativo de tres. Estadística: ANOVA y Tukey para comparar entre grupos. (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$.

Familia 59 y C7

El agregado de LMW-FGF2 (100 ng/ml) no modificó de manera significativa la proliferación de las células epiteliales derivadas de los tumores resistentes constitutivos 59-HI y C7-HI, aunque, en algunos casos, se observó una leve tendencia estimuladora (**Figura r-10**). En ambos casos, el bloqueo de los FGFR con BGJ398 (1-10 nM) inhibió la proliferación celular, tanto en presencia como en ausencia de LMW-FGF2. Además, en ensayos preliminares observamos que el PD (0,5 y 1 μ M) también inhibió la proliferación de células epiteliales provenientes de tumores 59-HI (no se ilustra).

Estos resultados indican que la vía del FGF2/FGFR está involucrada en la proliferación celular de todas las variantes resistentes a la terapia endocrina ensayadas (familias C4, 59 y C7).

59-HI



C7-HI

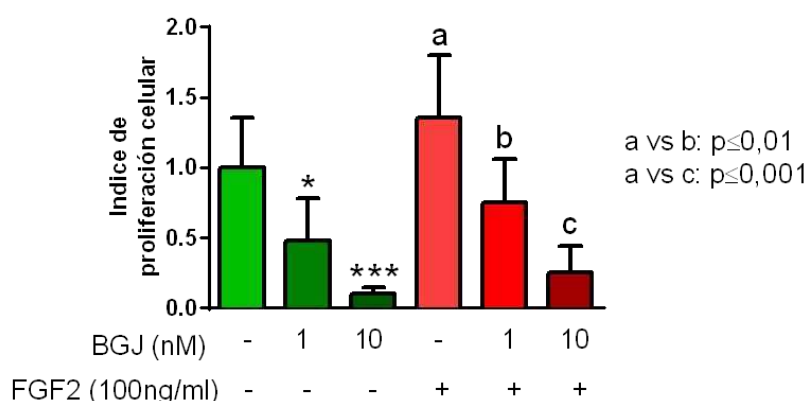


Figura r-10: Proliferación celular medida por incorporación de ^3H -timidina en células epiteliales derivadas de tumores resistentes constitutivos 59-HI y C7-HI. Las células fueron tratadas con el inhibidor de FGFR (BGJ398, 1-10 nM) en presencia, o no, de 100 ng/ml de LMW-FGF2 en SFBch 1% por 48 h. Estadística: ANOVA y Tukey para comparar entre grupos. (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Detección de FGF2 en el medio condicionado y en extractos de células epiteliales provenientes de tumores mamarios sensibles y resistentes a la terapia endocrina.

Con el objetivo de establecer si la señalización a través del FGF2 es autocrina, paracrina y/o intracrina, realizamos ensayos de ELISA. En primer lugar, buscamos determinar si existían diferencias en la liberación de FGF2 al medio condicionado en cultivos de células epiteliales con distinta sensibilidad hormonal. No observamos diferencias significativas en los niveles de FGF2 en el medio condicionado de células epiteliales C4-HIR respecto de las células sensibles C4-HI (**Figura r-11A**). Sin embargo, detectamos mayores niveles de FGF2 en el medio condicionado proveniente de células epiteliales C4-2-HI respecto a los de C4-HI y C4-HIR.

Además, determinamos por ELISA los niveles intracelulares de FGF2 en extractos de células epiteliales de las tres líneas tumorales mencionadas en el párrafo anterior. En concordancia con los resultados obtenidos por inmunohistoquímica y *Western blot*, las células epiteliales C4-HIR expresaron mayores niveles de FGF2 respecto de C4-2-HI y C4-HI (**Figura r-11B**). Estos resultados indican que los tumores resistentes adquiridos (C4-HIR) mantienen un mayor nivel intracelular de FGF2, mientras que los tumores resistentes constitutivos (C4-2-HI) preferentemente lo secretan al medio.

Luego, determinamos la concentración de FGF2 en muestras de suero de animales portadores de tumores de la familia C4. No observamos diferencias significativas en los niveles de FGF2 en el suero de ratones control (sin tumor) con respecto a ratones portadores de las diferentes variantes de tumores C4 (**Figuras r-11C y r-11D**). Estos resultados indican que las diferencias en la expresión de FGF2 halladas en muestras tumorales y en células epiteliales en cultivo no se traducen en mayor cantidad de FGF2 sérico, lo que sugiere una acción local del FGF2 tumoral.

En su conjunto, estos datos muestran que no sólo hay diferencias en la vía FGF2/FGFR entre las variantes sensibles y resistentes del modelo murino, sino también las hay entre la variante resistente adquirida y constitutiva. Además, todos los tumores resistentes evaluados expresan mayores niveles de FGF2 (particularmente las isoformas pesadas), respecto de las variantes sensibles.

La variante resistente constitutiva C4-2-HI libera FGF2 al espacio extracelular, que podría inducir el crecimiento tumoral a través de los FGFR de membrana y la angiogénesis por vías autocrinas y paracrinas, respectivamente. Por su parte, la variante adquirida C4-HIR, también expresa mayores niveles celulares de FGF2, aunque con menor liberación al espacio

extracelular, sugiriendo que, en esta variante tumoral, la señalización sería predominantemente intracrina. Estos resultados indican que los tumores resistentes podrían diferir en sus mecanismos de resistencia.

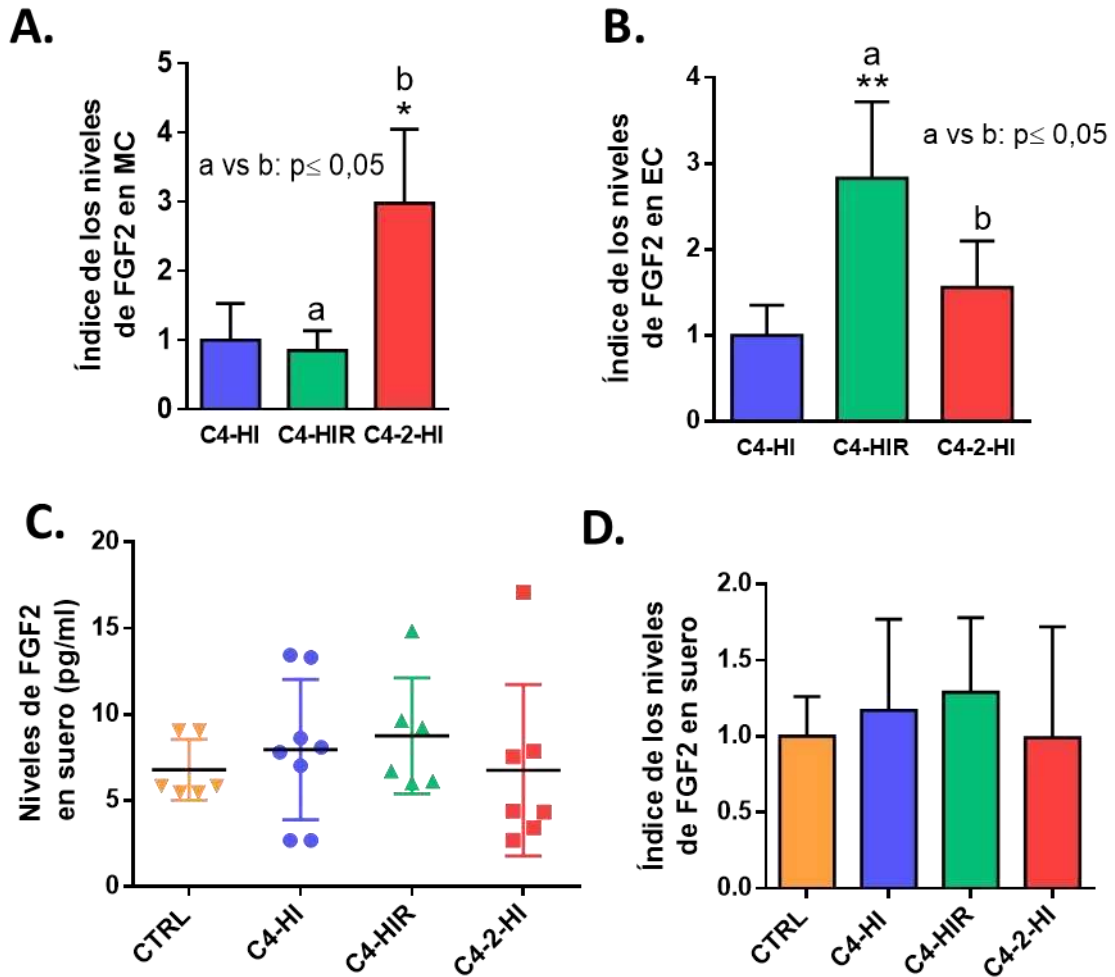


Figura r-11: (A) Liberación de FGF2 en medios condicionados (MC) de cultivos epiteliales derivados de cultivos primarios de tumores de la familia C4: C4-HI (sensible), C4-HIR (resistente adquirido) y C4-2-HI (resistente constitutivo), determinado por ELISA. Los valores fueron relativizados a los niveles del tumor C4-HI. (B) Índice de los niveles de FGF2 en extractos totales (EC) de células epiteliales provenientes de cultivos primarios de los mismos tumores. (C) Niveles de FGF2 (pg/ml) en suero de ratones control y en ratones portadores de tumores de la familia C4. (D) Índice de los niveles de FGF2 relativizado a los niveles en los animales control. Estadística: ANOVA y Tukey para comparar entre grupos. (**) $p \leq 0,01$. (*) $p \leq 0,05$.

Efecto del BGJ398 sobre el crecimiento de tumores mamarios murinos sensibles y resistentes a la terapia endocrina.

Tumor C4-HI (sensible):

Observamos que el tratamiento con BGJ398 (30 mg/kg/día por medio; endovenoso -ev-) redujo parcialmente la tasa de crecimiento, así como el tamaño y el peso final de los tumores C4-HI (**Figura r-12A**). Como mencionamos anteriormente, el tumor C4-HI es una variante moderadamente diferenciada con un epitelio tumoral que presenta luces y estroma interpuesto (**Figura r-1**). El análisis histológico reveló que los tumores tratados con el bloqueante de FGFR presentaron un aumento en el componente estromal, así como en el número y tamaño de los lúmenes (**Figura r-12B y C**). Todos éstos son signos compatibles con estadios avanzados de diferenciación tumoral.

Para determinar la composición de la población estromal, cuantificamos la expresión de α SMA por inmunohistoquímica y observamos que el tratamiento con el bloqueante causó un aumento significativo en el área positiva para este marcador de fibroblastos activados (**Figuras r-12B y r-12C**). Por otro lado, estudiamos la expresión de MUC1, que es una glicoproteína asociada a la membrana celular, usualmente expresada en los bordes apicales de las células mamarias epiteliales secretorias. Observamos un aumento en la intensidad de la marca citoplasmática de MUC1 en las células epiteliales tumorales tratadas con BGJ398. El aumento en la cantidad y el tamaño de los lúmenes, acompañado del aumento en la marcación de α SMA y MUC1, sugiere un fenotipo más diferenciado en aquellos tumores tratados con el inhibidor.

Tumor C4-HIR (resistente adquirido) y C4-2-HI (resistente constitutivo):

El tratamiento con BGJ398 (30 mg/kg/día por medio; ev) no indujo cambios significativos ni en la tasa de crecimiento ni en el peso tumoral de ninguna de las dos variantes tumorales resistentes (**Figura r-13A**). Sin embargo, en el caso de los tumores C4-HIR, el bloqueante produjo mayor diferenciación tisular, que se refleja en un aumento en la cantidad de luces en el parénquima tumoral (**Figura r-13B y C**). En el caso del tumor C4-2-HI, el análisis histológico también pareció indicar mayor cantidad de estroma y de lúmenes. Con el objetivo de caracterizar la composición tumoral y la diferenciación tisular en presencia del inhibidor, realizamos inmunomarcaciones para α SMA y MUC1. No observamos cambios en la expresión de α SMA en la variante C4-HIR, mientras que el tumor C4-2-HI aumentó su componente estromal con el tratamiento con BGJ398 (**Figura r-14**). En ambas variantes, el bloqueo de los FGFR causó un aumento en la expresión de MUC1 en el citoplasma de las células epiteliales tumorales.

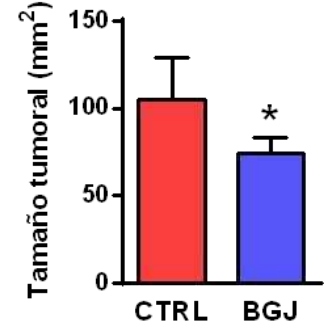
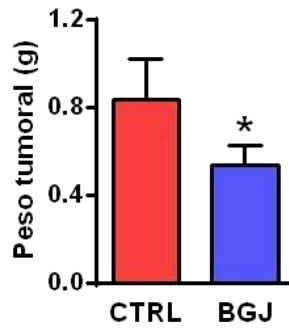
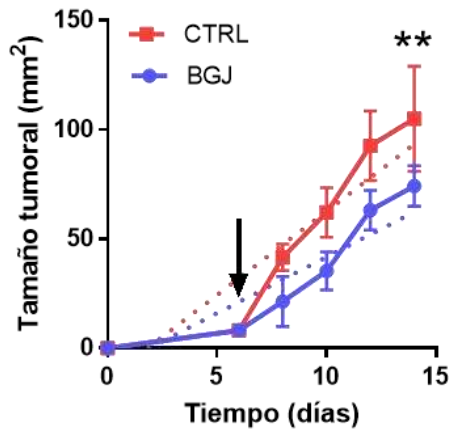
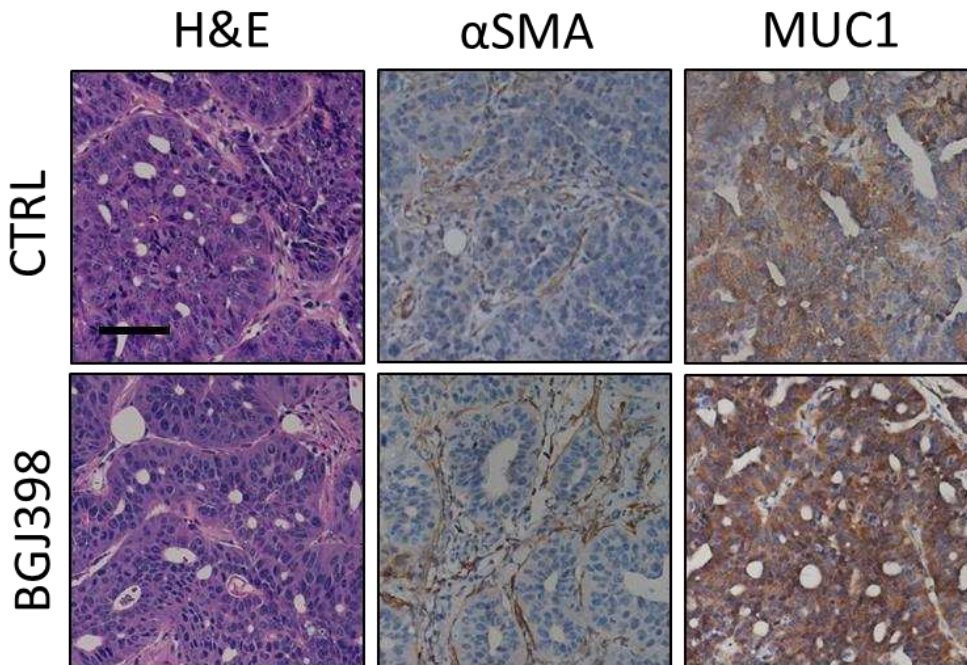
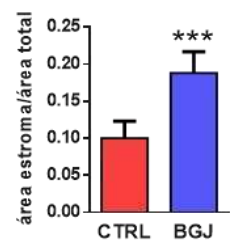
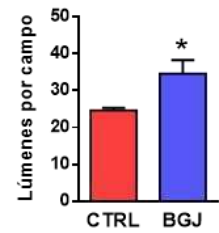
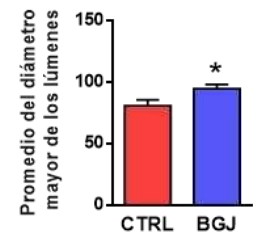
A.**B.****C.**

Figura r-12: Efecto del BGJ398 (30 mg/kg/día por medio, ev.) sobre el crecimiento de tumores C4-HI (sensibles). **(A)** Curvas de crecimiento, el peso y el tamaño final de los tumores al finalizar el ensayo (día 15). La flecha indica el día que se comenzó el tratamiento con el BGJ398 o con el vehículo. **(B)** Histología (H&E) y expresión de α SMA y MUC1 determinada por inmunohistoquímica en tumores C4-HI tratados con BGJ398 o vehículo. **(C)** Cuantificación de la cantidad, diámetro de las luces en el parénquima tumoral y del área estromal calculada a partir de la inmunomarcación para α SMA. Se muestra un experimento representativo de dos. Estadística: regresión lineal y comparación de las pendientes de las curvas de crecimiento. Para los otros gráficos: *t Test*. (***) $p \leq 0,001$; (*) $p \leq 0,05$. Barra de magnificación: 100 μ m.

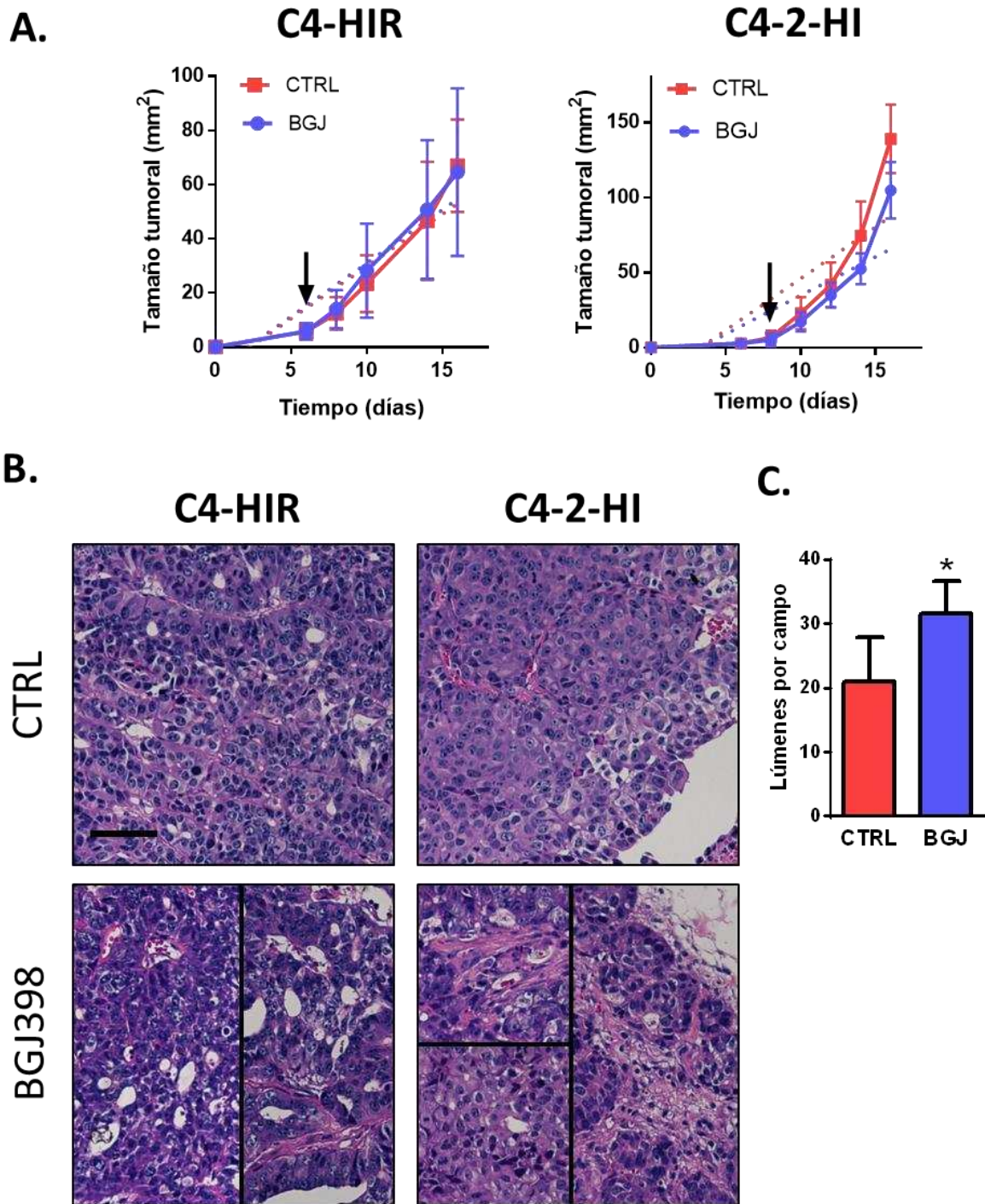


Figura r-13: (A) Efecto del BGJ398 (30 mg/kg/día por medio, ev.) sobre el crecimiento de tumores resistentes C4-HIR (resistentes adquiridos) y C4-2-HI (resistentes constitutivos). Las flechas indican el día que se comenzó el tratamiento con el BGJ398 o con el vehículo. (B) Histología (H&E) de tumores tratados con BGJ398 o vehículo. (C) Cuantificación de la cantidad de luces en el parénquima de tumores C4-HIR. Se muestra un experimento representativo de dos. Estadística: regresión lineal y comparación de las pendientes de las curvas de crecimiento. Para la cantidad de lúmenes por campo: *t Test*. (*) $p \leq 0,05$. Barra de magnificación: 100 μm .

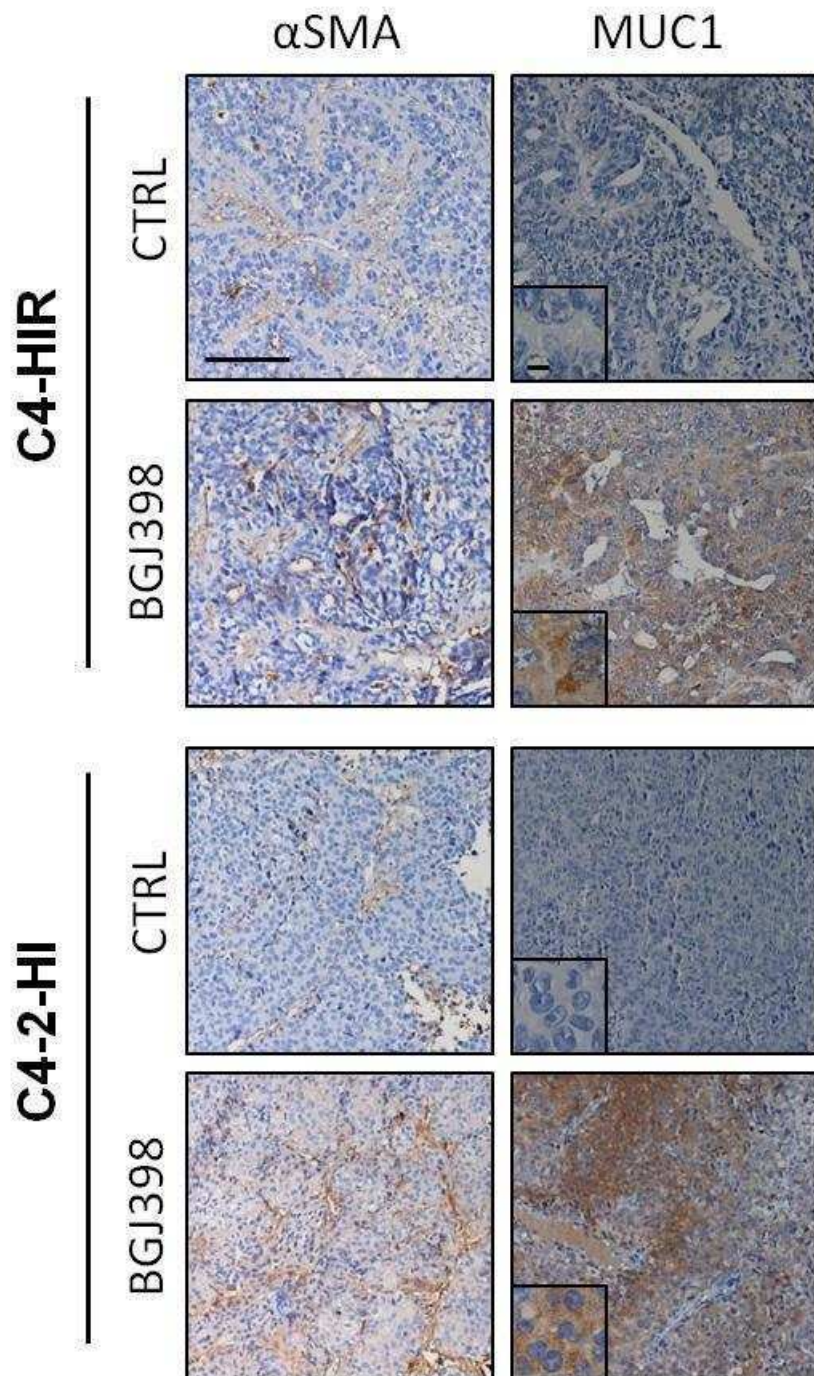


Figura r-14: Expresión de α SMA y MUC1 determinada por inmunohistoquímica de carcinomas mamarios murinos C4-HIR (resistente adquirido) y C4-2-HI (resistente constitutivo) tratados con BGJ398 (30 mg/kg/día por medio, ev) o vehículo. Barra de magnificación: 100 μ m. Inset 10 μ m.

En función de estos resultados y de que el bloqueo de FGFR en cultivo fue capaz de inhibir la proliferación celular también en el tumor metastásico C7-HI, decidimos estudiar el efecto del BGJ398 sobre el crecimiento *in vivo* de esta variante tumoral.

Tumor C7-HI (resistente constitutivo):

El tratamiento con BGJ398 (30mg/kg/día por medio; ev) disminuyó la tasa de crecimiento, así como el tamaño y el peso tumoral al finalizar el experimento respecto del grupo control (**Figura r-15A**). El análisis histológico reveló principalmente un aumento significativo en el componente estromal y se observaron zonas con presencia de una secreción positiva para ácido peryódico schiff (PAS; no se ilustra), que revela todo tipo de carbohidratos como glucógeno y mucopolisacáridos (**Figura r-15B**). Además, observamos una mayor diferenciación glandular en el epitelio, reflejada por un aumento en el número de lúmenes (**Figura r-15C**). Por inmunomarcación detectamos que el tratamiento con el inhibidor induce un aumento significativo en el área positiva para α SMA, que indica la presencia de fibroblastos activados en el estroma tumoral (**Figura r-15B y C**). Más aún, los tumores tratados con BGJ398 presentan mayor expresión de MUC1, tanto en el estroma como en las secreciones del parénquima tumoral (**Figura r-15B**).

Los resultados obtenidos con el tratamiento con BGJ398 muestran que el bloqueante afecta la arquitectura tumoral, promoviendo un mayor grado de diferenciación y, por ende, un menor grado histológico. Sin embargo, los efectos sobre el crecimiento tumoral fueron pequeños respecto a la clara inhibición de la proliferación celular observada en cultivo. En conjunto, estos hallazgos sugieren que, in vivo, el BGJ398 no sería un inhibidor efectivo de esta vía o que la vía que conduce el crecimiento tumoral es la intracrina, independiente de los FGFR.

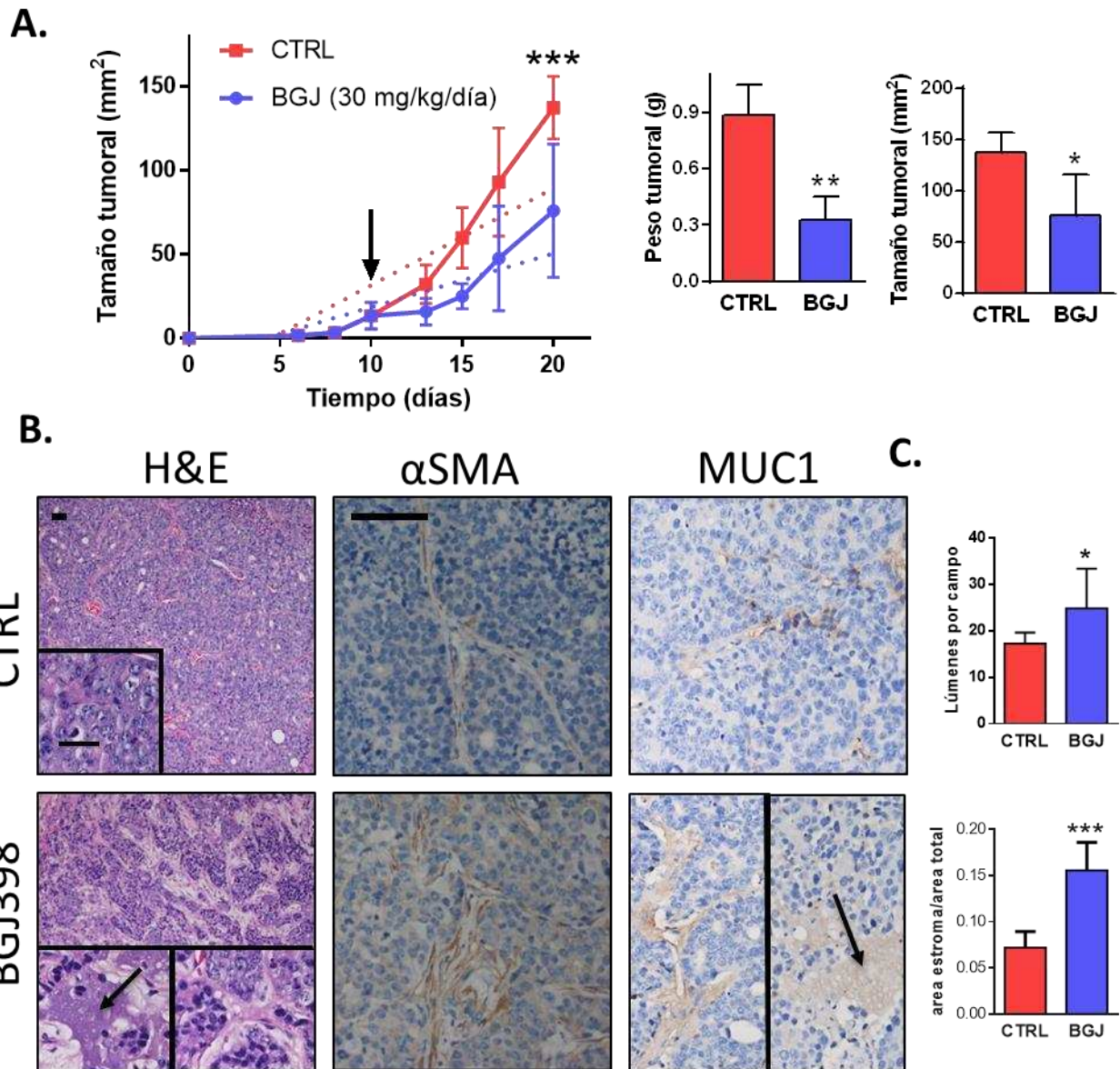


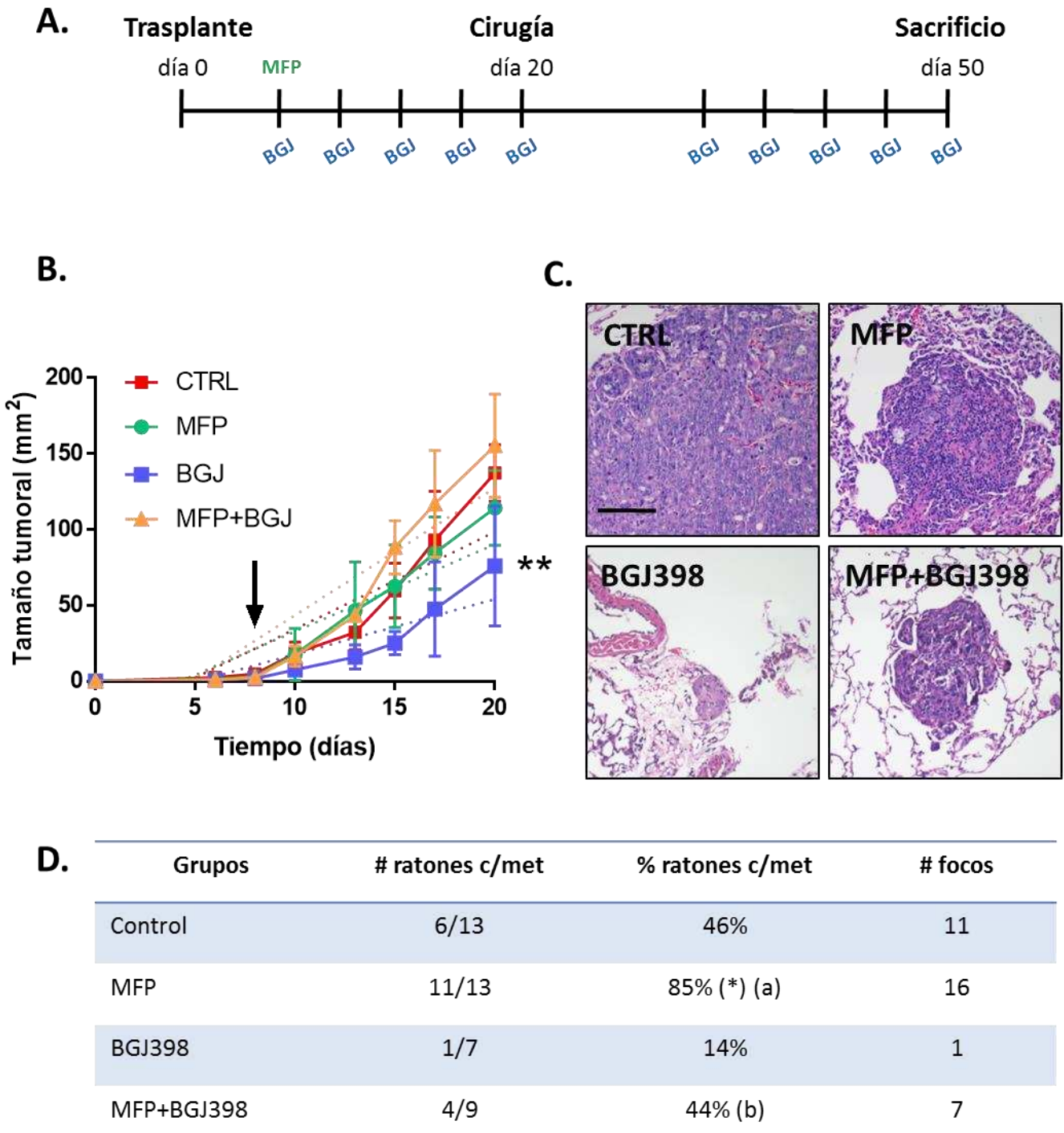
Figura r-15: Efecto del BGJ398 (30 mg/kg/día por medio, ev.) sobre el crecimiento de tumores C7-HI (resistentes constitutivos). **(A)** Curvas de crecimiento, el peso y el tamaño final de los tumores al día de la cirugía (día 21). La flecha indica el día que se comenzó el tratamiento con el BGJ398 o con el vehículo. **(B)** Histología (H&E) y expresión de α SMA y MUC1 determinada por inmunohistoquímica de tumores C7-HI tratados con BGJ398 o vehículo. Barra de magnificación: 100 μ m. Inset 50 μ m. **(C)** Cuantificación de la cantidad de luces y del área estromal calculada a partir de la inmunomarcación para α SMA. Se muestra un experimento representativo de dos. Estadística: regresión lineal y comparación de las pendientes de las curvas de crecimiento. En (A, B y C): *t* Test. (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$.

Efecto del BGJ398 sobre la diseminación metastásica de tumores resistentes constitutivos C7-HI.

En consideración a que el tratamiento con BGJ398 indujo cambios en la diferenciación de la mayoría de los tumores evaluados y que logró inhibir, al menos parcialmente, el crecimiento de tumores primarios C7-HI, nos interesó estudiar el efecto del bloqueo de los FGFR sobre la diseminación metastásica en esta variante tumoral. En sus orígenes, el tumor C7-HI presentaba una menor tasa de crecimiento que la actual y era capaz de generar metástasis espontáneas en aproximadamente dos meses (ver *Materiales y Métodos*). Con el tiempo y los sucesivos trasplantes, adquirió mayor velocidad de crecimiento, de manera que los ratones deben ser sacrificados antes de que los tumores logren diseminarse. Con el objetivo de detectar focos metastásicos, modificamos el esquema experimental para prolongar el ensayo sin excedernos del tamaño tumoral límite sugerido por el Comité de Ética del Instituto. Además, agregamos dos grupos experimentales: un grupo tratado con MFP (*pellet* de 6 mg) y otro con la terapia combinada (MFP+BGJ398). La incorporación de estos grupos se debió a datos previos del laboratorio, en los que se había observado una mayor incidencia de metástasis en ratones portadores de tumores C7-HI tratados con MFP respecto a ratones con tumores C7-HI sin tratar (Álvarez *et al.* 2015 - Abstract San Antonio Meeting y SAIC).

Trasplantamos en el flanco inguinal de ratones hembras BALB/c el tumor C7-HI y, una vez que el tumor alcanzó un tamaño de aproximadamente 10-20 mm², administramos 5 dosis de BGJ398 (30 mg/kg/día por medio; *ev*) y/o MFP (*pellet* de 6 mg). Al día 20, operamos los ratones y removimos cuidadosamente los tumores (tamaño entre 70-150 mm²; **Figura r-16B**). Luego de la cirugía, realizamos un segundo ciclo de 5 dosis de BGJ398 (30 mg/kg/día por medio; *ev*; **Figura r-16A**). Al finalizar el ensayo (aproximadamente al día 50), analizamos los pulmones en búsqueda de focos metastásicos.

Como era de esperar, el tratamiento con BGJ398 inhibió la tasa de crecimiento de los tumores primarios C7-HI respecto del grupo control (**Figura r-16B**). Si bien experimentos previos del laboratorio indicaban que la MFP puede tener un leve efecto proliferativo en tumores C7-HI, en este caso, ni la monoterapia ni la terapia combinada, produjeron cambios significativos respecto al grupo control. El resultado obtenido con la terapia combinada indica que prevalece el efecto proliferativo de la MFP por sobre el inhibitorio del bloqueante.



Luego, analizamos el efecto de los tratamientos sobre la diseminación metastásica, que es otro aspecto de la progresión tumoral. En la tabla de la **Figura r-16D** se detallan los valores correspondientes al número de ratones con metástasis pulmonares y la cantidad de focos metastásicos por grupo, tomando en conjunto los resultados de dos ensayos. Como era de esperar, en base al trabajo de *Álvarez y colaboradores*, observamos un aumento significativo del número de metástasis en los ratones tratados con MFP respecto del grupo control. En el grupo tratado sólo con BGJ398 observamos una tendencia inferior del número de metástasis respecto del control (ns; $p=0,1541$). Es importante destacar que BGJ398 incluso logró interferir parcialmente en el efecto prometastásico de la MFP, ya que el tratamiento combinado (MFP+BGJ398) disminuyó significativamente la diseminación metastásica respecto al grupo MFP. En la **Figura r-16C** se ilustra una metástasis pulmonar representativa de cada grupo experimental. Los ensayos de metástasis exigen contar con muchos animales y, por lo tanto, sería necesario aumentar el número de ratones tratados con BGJ398 para establecer si la tendencia observada con la monoterapia es significativa. Sin embargo, estos resultados sugieren que la vía de FGF, que señala a través de sus FGFR, participa tanto en la diseminación metastásica *per se* como en la inducida por MFP.

RESUMEN DE RESULTADOS (PARTE 1)

En resumen, en esta primera parte demostramos que tanto las variantes tumorales sensibles del modelo murino, como las variantes resistentes mantienen una vía de FGFR activa que favorece la proliferación celular. Además, los tumores resistentes expresan mayor nivel de FGF2, particularmente de las isoformas pesadas. Con respecto a los receptores, el FGFR1 y el FGFR2 están aumentados y poseen una localización preferentemente nuclear en las variantes resistentes comparadas con los tumores sensibles. Los resultados expuestos sugieren que el eje FGF2/FGFR estaría promoviendo el crecimiento de los tumores preferentemente a través de un loop paracrino o autocrino/intracrino en tumores sensibles y resistentes a la terapia hormonal, respectivamente.

El BGJ398 indujo a distintos grados de diferenciación en todos los tumores ensayados, lo que indica una asociación particular para cada variante entre la actividad de los FGFR y el grado de diferenciación tumoral. En los tumores resistentes, estos cambios histológicos serían independientes del efecto proliferativo o no serían suficientes para contribuir a la disminución en la tasa de crecimiento tumoral. Además, los resultados preliminares obtenidos con el tumor C7-HI indican que la vía de FGF2/FGFR cumple un rol importante, no sólo en el crecimiento tumoral, sino en su grado de diferenciación y, sobre todo, en la diseminación metastásica.

Conjuntamente, estos resultados sugieren que la vía FGF2/FGFR cumple un rol fundamental en la progresión tumoral de distintas familias tumorales del modelo murino de carcinogénesis mamaria.

RESULTADOS PARTE 2: Línea celular humana T47D

Conjuntamente, los resultados expuestos anteriormente sugieren que, al menos en los modelos murinos estudiados, existiría una asociación entre la resistencia a la terapia hormonal y la expresión y activación de la vía FGF2/FGFR.

Los experimentos descritos a continuación están orientados a validar en un modelo humano los resultados obtenidos en el modelo murino.

Expresión de FGF2/FGFR en líneas celulares humanas con distinta sensibilidad endocrina.

Como describimos en *Materiales y Métodos*, la línea celular de cáncer de mama humano T47D-WT se clasifica como luminal A ya que se caracteriza por ser RE (+), RP (+) y HER2 (-). A partir de esta línea, el grupo de la *Dra. Horwitz* clonó una sublínea sin expresión de los RP (T47D-Y). Esta variante fue tranfectada con un plásmido para que sobreexpresara exclusivamente la isoforma A (T47D-YA) o B (T47D-YB) de los RP (Jacobsen *et al.* 2002; **Figura r-17A**). En trabajos de nuestro laboratorio, demostramos que las líneas con expresión de isoforma A o B de RP son sensibles o resistentes al tratamiento endocrino, respectivamente (Wargon *et al.* 2015). Por lo tanto, en este trabajo de Tesis utilizaremos las células T47D-WT e -YA como líneas sensibles y las células T47D-YB como resistentes.

En primer lugar, buscamos homologar en la línea celular humana T47D los resultados obtenidos en los tumores mamarios murinos. En el humano se han descrito cinco isoformas de FGF2 de 18, 22, 22,5, 24 y 34 kDa, denominándose a la de 18 kDa como LMW-FGF2 y al resto de las isoformas como HMW-FGF2 (ver *Introducción*). Primero, evaluamos por *Western blot* la expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 en extractos proteicos totales de las líneas celulares T47D-WT, -YA e -YB. Observamos que las T47D-YB expresan mayores niveles de FGF2 que las líneas T47D-WT e -YA (**Figuras r-17B y r-17C**). Además, al analizar en detalle la expresión de las diferentes isoformas de FGF2, vimos que la línea T47D-YB posee niveles elevados de las isoformas pesadas HMW-FGF2, fundamentalmente de las isoformas intermedias (22, 22,5 y 24 kDa) en relación a las otras líneas. De manera similar a lo observado en los tumores del modelo murino, aquí también detectamos mayores niveles de FGFR1 y FGFR2 en la línea resistente endócrina T47D-YB en comparación con las líneas sensibles T47D-WT e -YA (**Figuras r-17B y r-17C**).

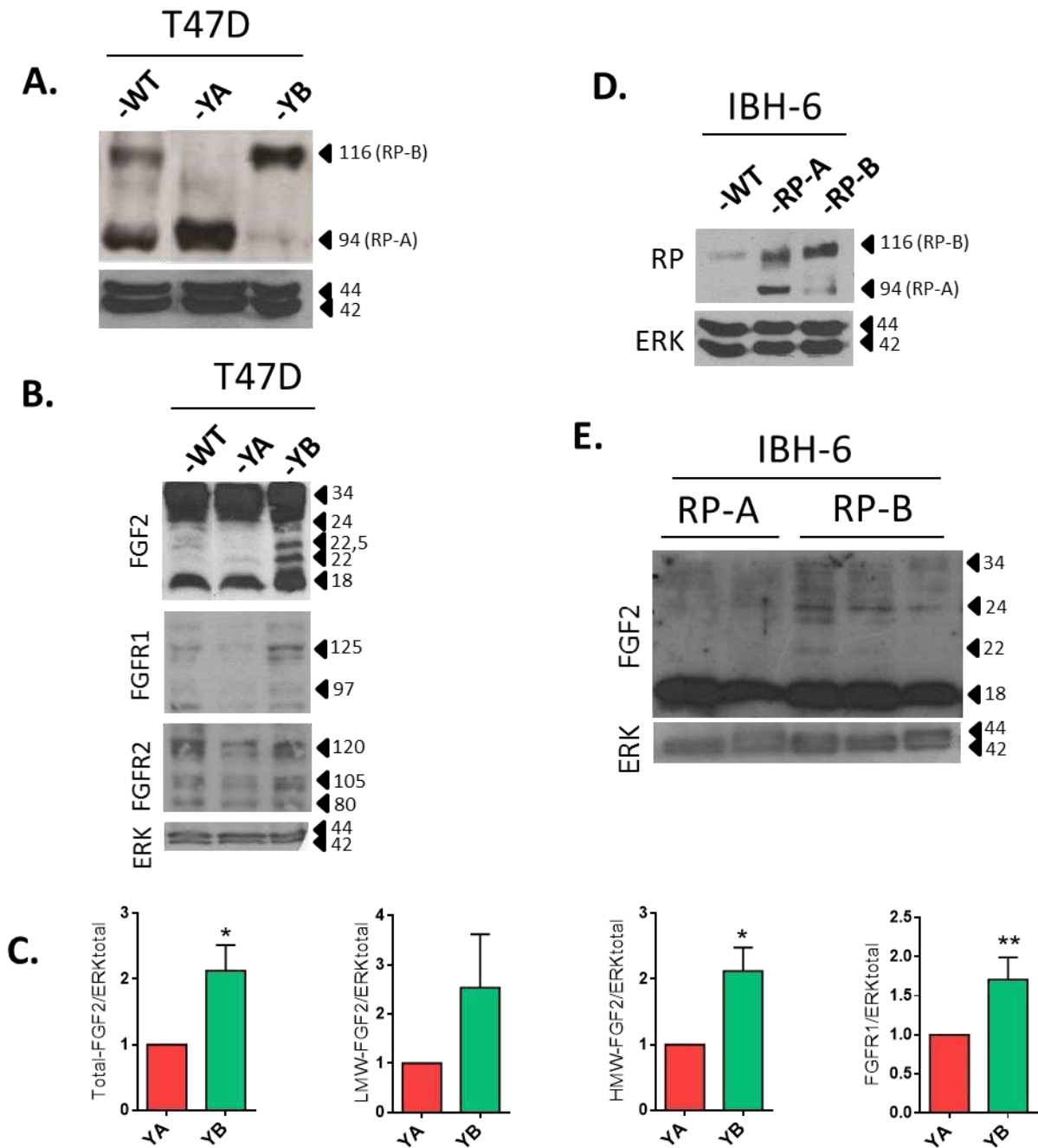


Figura r-17: (A) Expresión de RP determinado por *Western blot* de las líneas celulares T47D-WT, -YA e -YB. (B) Expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 en las mismas líneas celulares. (C) Cuantificación de los *Western blot*. Estadística: *t Test*. (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$. (D) Expresión de los RP de extractos totales de las líneas celulares IBH-6-WT, -RP-A y -RP-B. (E) Expresión de FGF2 en extractos proteicos citosólicos de tumores IBH-6-RP-A y -RP-B creciendo en ratones NSG.

En concordancia con lo observado en las líneas derivadas de T47D, se obtuvieron resultados similares con extractos proteicos de tumores derivados de la línea celular de cáncer de mama humano IBH-6 modificadas genéticamente para sobreexpresar la isoforma A o B del RP (Wargon *et al.* 2015); IBH-6-PR-A o -PR-B; **Figuras r-17D y r-17E**).

Los resultados obtenidos por *Western blot* en dos líneas celulares humanas validan lo observado en los tumores del modelo murino y permiten establecer una asociación entre la mayor expresión de FGF2 y la resistencia endocrina.

Expresión y localización de FGF2, FGFR1 y FGFR2 en las líneas celulares T47D-YA e -YB.

Por inmunofluorescencia detectamos la expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 en las líneas T47D-YA e -YB. Observamos mayores niveles del ligando y de FGFR1 en el citosol de las células resistentes -YB (**Figura r-18**). En cuanto al FGFR2, la marca fue mayoritariamente nuclear en ambas líneas, aunque la variante resistente presenta mayor intensidad.

Luego estudiamos la expresión de los mismos marcadores por inmunohistoquímica en xenotrasplantes de ambas líneas que crecen en ratones NSG. Observamos un patrón similar: los tumores sensibles expresan menores niveles de FGF2 y FGFR1 en el citoplasma del parénquima tumoral en relación a la variante resistente (**Figura r-19**). Además, si bien detectamos células positivas, tanto en el citoplasma como en el núcleo de ambos tipos tumorales, la marcación nuclear para FGFR2 fue más intensa en los tumores resistentes.

Finalmente, evaluamos por ELISA los niveles totales de FGF2, tanto en extractos celulares (EC) como en medios condicionados (MC) de las líneas T47D-YA e -YB (**Figura r-20A y B**). Cabe destacar que el *Kit* detecta todas las isoformas de FGF2 (Wang *et al.* 2015). Identificamos mayor nivel de FGF2 en el MC de la línea resistente -YB respecto de la línea sensible -YA. Si bien hubo una tendencia a un mayor nivel celular de FGF2 en la línea -YB respecto a la -YA, esta diferencia no fue significativa.

Conjuntamente, estos resultados indican que la línea resistente no sólo posee mayor nivel de FGF2 intracelular respecto a la línea sensible, sino que también libera mayores cantidades del ligando fuera de la célula. Además, los niveles de FGFR1 y FGFR2 (principalmente nuclear) también son superiores en la línea T47D-YB en comparación con la variante sensible. Postulamos que, en la línea resistente, el FGF2 podría actuar principalmente de manera autocrina e intracrina y así favorecer el fenotipo resistente endocrino.

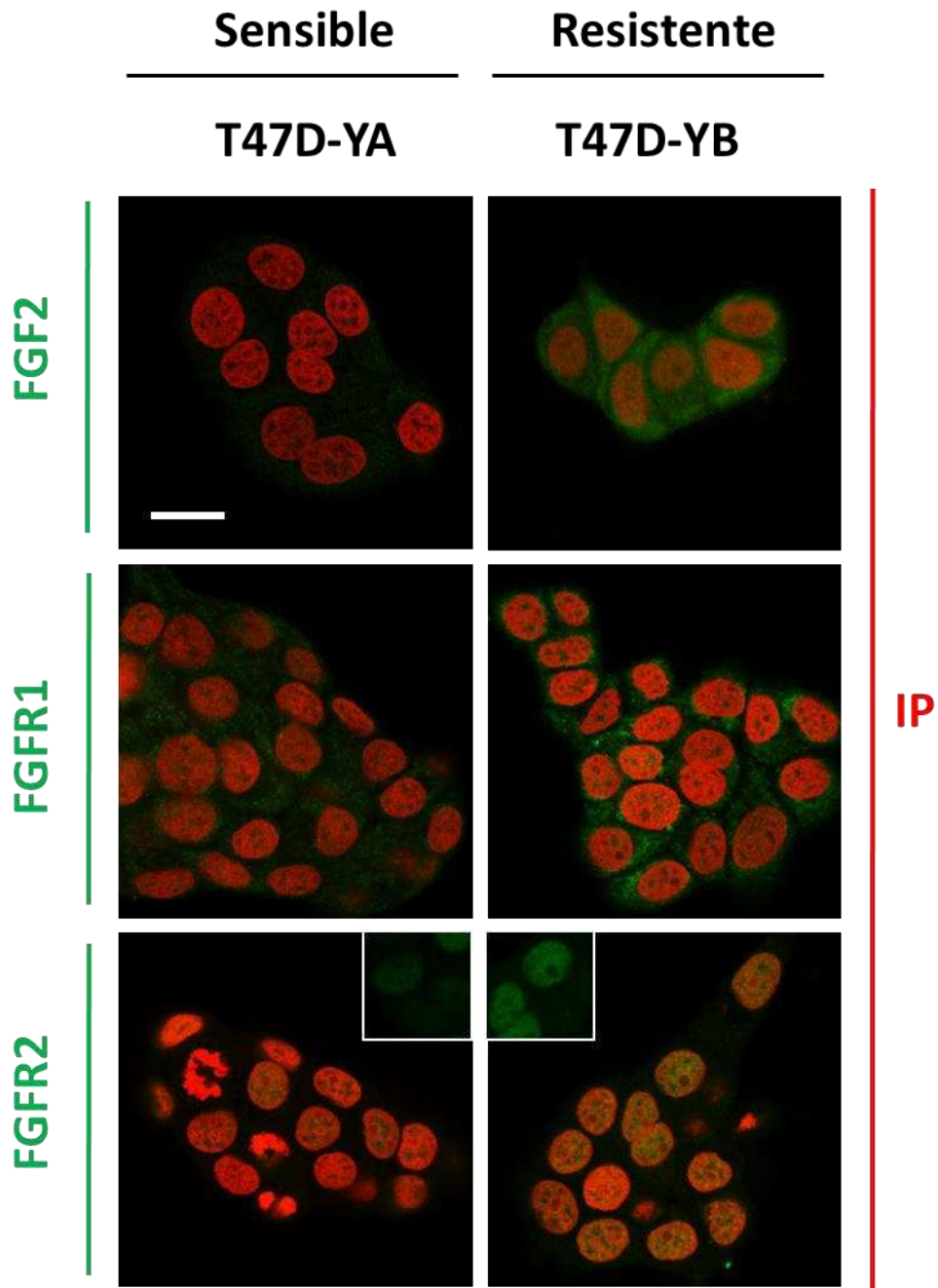


Figura r-18: Expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 de las líneas celulares de carcinomas mamarios humanos T47D-YA (sensible) y T47D-YB (resistente) por inmunofluorescencia. En verde se marcan las proteínas FGF2, FGFR1 y FGFR2 y los núcleos se contratiñeron (en rojo) con ioduro de propidio (IP). Barra de magnificación: 20 μ m. En el *inset* sólo se ilustra la marca verde para la proteína FGFR2.

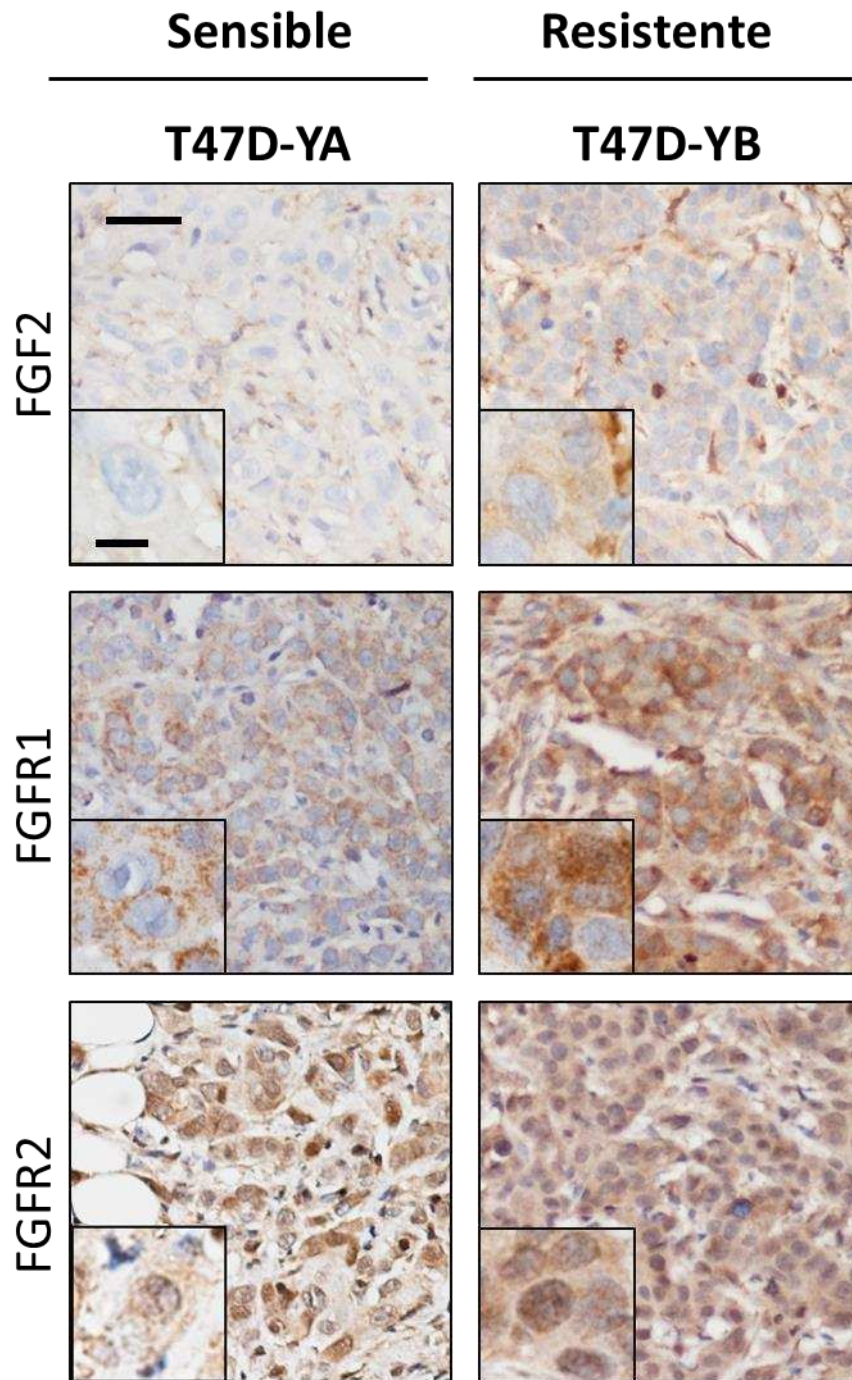


Figura r-19: Expresión de FGF2, FGFR1 y FGFR2 en xenotrasplantes de las líneas celulares de carcinomas mamarios humanos T47D-YA (sensible) y T47D-YB (resistente) por inmunohistoquímica. Barra de magnificación: 40 μm ; inset 10 μm .

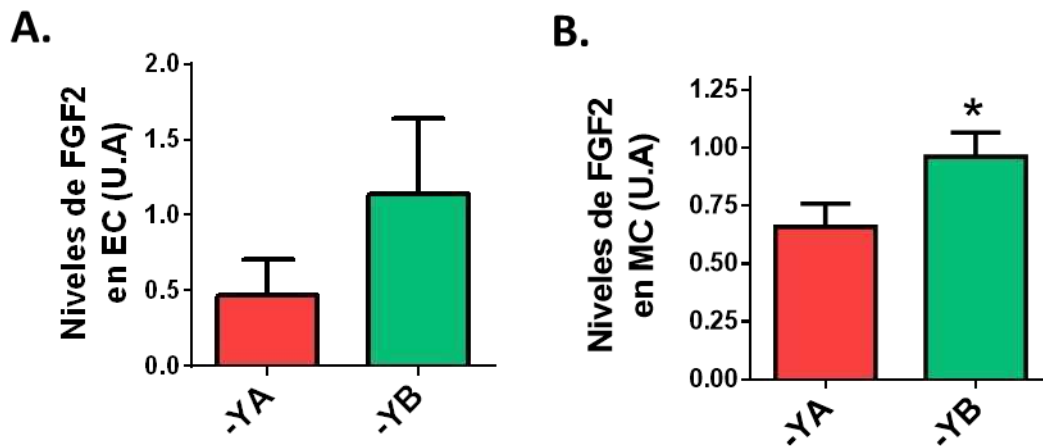
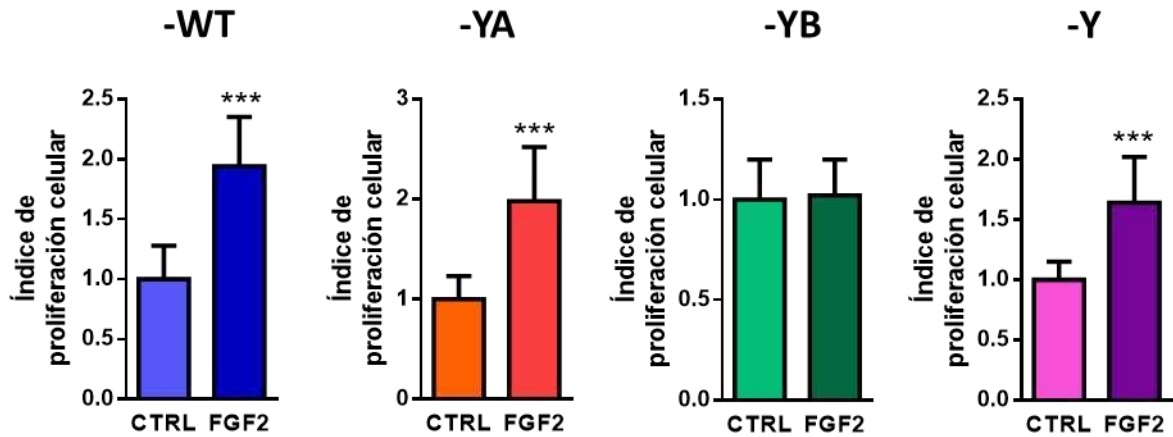


Figura r-20: Niveles de FGF2 en extractos celulares (A) y medios condicionados (B) de las líneas celulares T47D-YA e -YB, determinado por ELISA. Estadística: *t Test*. (*) $p \leq 0,05$.

Efecto de LMW-FGF2 e inhibidores de FGFR sobre la proliferación de variantes de la línea celular T47D con distinta sensibilidad hormonal.

Luego, evaluamos la funcionalidad de la vía de FGF en las tres líneas celulares mencionadas (T47D-WT, -YA e -YB). Realizamos ensayos de proliferación celular por incorporación de ^3H -timidina y observamos que el tratamiento con 100 ng/ml de LMW-FGF2 estimuló la proliferación de las líneas T47D-WT e -YA, mientras que no produjo cambios significativos en la proliferación celular de las células -YB (**Figura r-21A**). Para excluir la posibilidad de que la densidad celular enmascarara el efecto del LMW-FGF2 y en consideración de que es esta isoforma la que principalmente se libera fuera de la célula (Mignatti & Rifkin 1991; Mignatti *et al.* 1992), repetimos el experimento con diferentes densidades de células T47D-YB por hoyo. Observamos que el LMW-FGF2 no estimuló la proliferación celular de forma significativa, tanto en condiciones de baja como de alta densidad celular (**Figura r-21B**). Además, considerando que en la variante que no expresa los RP (T47D-Y), el LMW-FGF2 también indujo la proliferación celular (**Figura r-21A**), podemos decir que el efecto proliferativo del factor es directo, independiente de los RP.

A.



B.

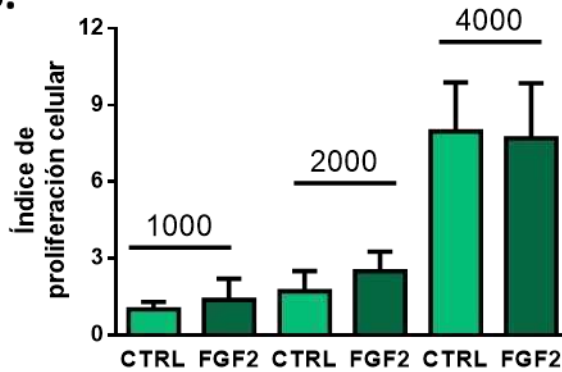


Figura r-21: (A) Proliferación celular medida por incorporación de ^3H -timidina en las líneas celulares T47D-WT, -YA, -YB e -Y. En todos los casos se sembraron 5000 células por hoyo en SFBch 5% y a las 24 h se las trató con SFBch 1% o 100 ng/ml de LMW-FGF2 en SFBch 1% por 48 h. **(B)** Se sembraron 1000, 2000 y 4000 células T47D-YB por hoyo en SFBch 5% y a las 24 h se las trató con SFBch 1% o 100 ng/ml de FGF2 en SFBch 1% por 48 h. Estadística: *t* Test (***) $p \leq 0,001$.

A continuación, bloqueamos la vía de FGFR y observamos que 10 nM de BGJ398 inhibió la proliferación celular basal en las cuatro líneas celulares estudiadas, independientemente de la expresión de isoformas de los RP (**Figura r-22**). Todas las concentraciones de BGJ398 ensayadas inhibieron la proliferación celular inducida con LMW-FGF2 en las líneas T47D-WT, -YA e -Y.

Por lo tanto, podemos concluir que la vía de FGF2, a través de sus FGFR, es funcional y favorece la proliferación celular en el modelo de T47D, independientemente de la expresión de los RP, de la proporción de sus isoformas o de los niveles de FGF2, FGFR1 y FGFR2.

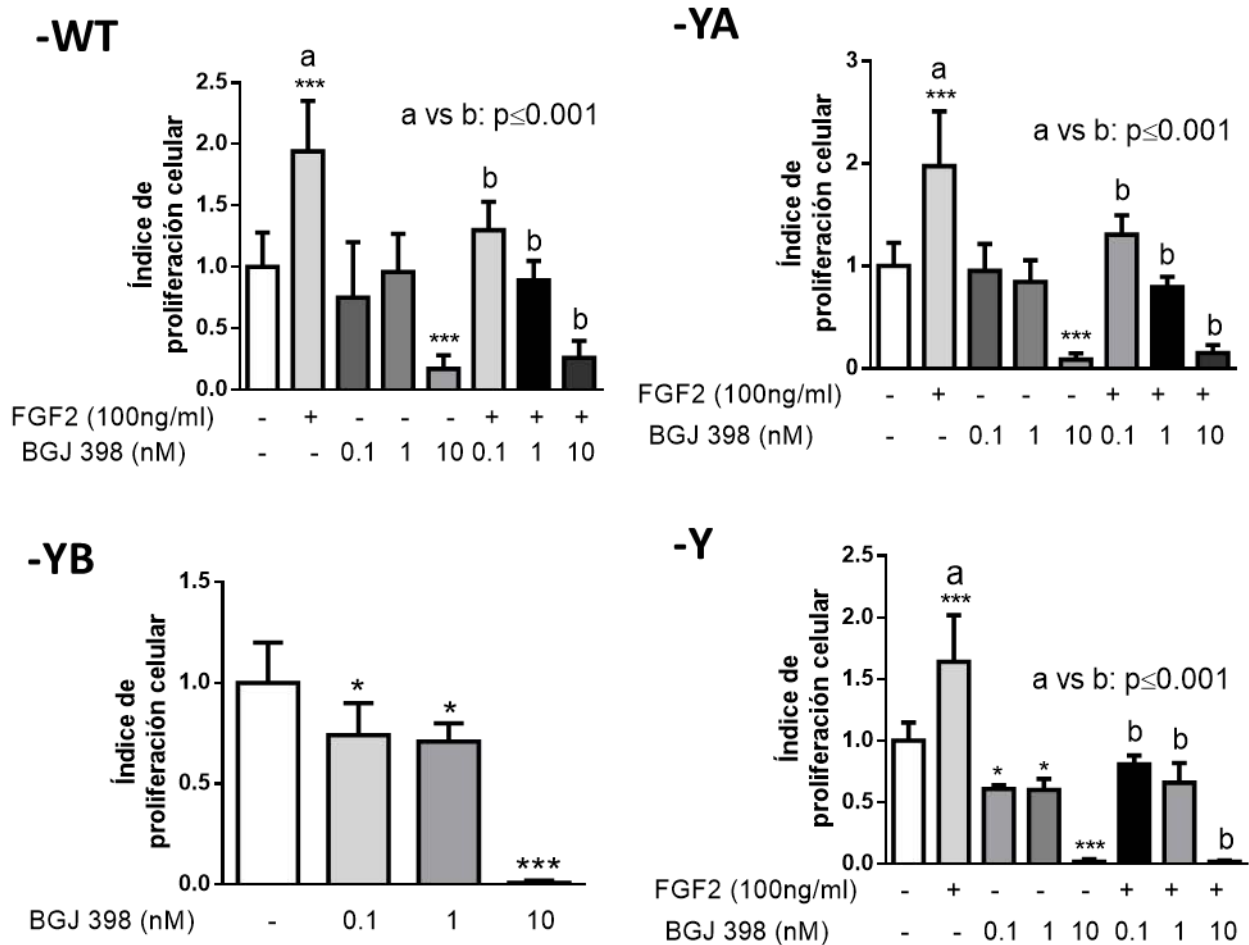


Figura r-22: Proliferación celular medida por incorporación de ^3H -timidina en las líneas celulares T47D-WT, -YA, -YB e -Y. Las células fueron tratadas con BGJ (0,1-10 nM) en presencia o no de 100 ng/ml de LMW-FGF2 por 48 h. Estadística: ANOVA y Tukey para comparar entre grupos. (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$.

En conjunto, estos ensayos indican que hay una mayor expresión de FGF2 en la línea celular resistente T47D-YB y que el agregado exógeno del factor de crecimiento no induce a la proliferación celular de esta línea. Sin embargo, como el bloqueo de los FGFR inhibe la proliferación celular, tanto en las variantes sensibles como en la resistente, concluimos que la vía es funcional en todas las líneas celulares. Postulamos que, en la línea resistente -YB, los niveles elevados de FGF2 endógeno estarían saturando la vía por señalización autocrina o intracrina y, por lo tanto, el agregado de LMW-FGF2 exógeno no es capaz de estimular la proliferación celular.

Estado de activación de las vías río abajo de la activación de los FGFR de membrana.

Se ha descrito que la vía tradicional de acción del FGF2, principalmente de la isoforma de 18 kDa, es a través de su unión a los FGFR de membrana y que presenta mayor afinidad por el FGFR1 (Ibrahimi *et al.* 2004b). A partir de la unión del ligando a su receptor, se produce la dimerización y activación de los receptores que se transfosforilan, y reclutan y fosforilan la proteína adaptadora FRS2, entre otras. Este proceso desencadena una cascada de transducción de señales capaz de activar diferentes vías, como pERK/ERK y pAKT/AKT (Powers *et al.* 2000).

En primer lugar, evaluamos el estado de activación basal de algunas de las proteínas mencionadas en el párrafo anterior. Estudiamos la expresión basal de la proteína adaptadora FRS2 y su variante fosforilada (pFRS2) y detectamos un incremento significativo de ambas en la línea T47D-YB respecto a la variante sensible -YA (**Figuras r-23A y r-23B**). Esto indica que la vía se encuentra basalmente activada en la línea resistente. Al estudiar las vías río abajo de FRS2, observamos mayor nivel basal de pS6 (marcador río abajo de la vía de AKT) en la línea resistente respecto a las sensibles. Por el contrario, no encontramos diferencias significativas ni en la activación basal ni en la expresión de pERK/ERK en las tres líneas celulares analizadas. Estos resultados sugieren que la línea resistente tiene basalmente activa la vía de FGFR, principalmente a través de la fosforilación de FRS2 que, a su vez, activaría la vía de AKT.

Con el fin de determinar la capacidad de LMW-FGF2 para activar las vías de transducción de señales, evaluamos el efecto del tratamiento breve con este factor (100 ng/ml) en las tres líneas celulares. Observamos que el tratamiento durante 10 minutos con LMW-FGF2 tiende a aumentar la fosforilación de pFRS2, pERK y pS6 en las líneas sensibles -WT e -YA. La línea resistente -YB sólo presentó activación significativa en pERK/ERK, siendo esta la vía que presentó un nivel basal disminuido respecto de las líneas sensibles (**Figura r-23A**).

Estos resultados indican que la línea resistente tendría constitutivamente activa la vía de FGF2 a través de sus FGFR de membrana activando, por lo menos la cascada de AKT. En las líneas sensibles, el agregado de LMW-FGF2 activa las vías de ERK y AKT y gatilla señales de proliferación. Cabe destacar que estos resultados refuerzan la hipótesis de que el agregado exógeno de LMW-FGF2 no es capaz de promover la proliferación celular en la línea celular resistente porque la vía ya se encuentra basalmente activada, probablemente por una vía intracrina que promueve la activación constitutiva de AKT.

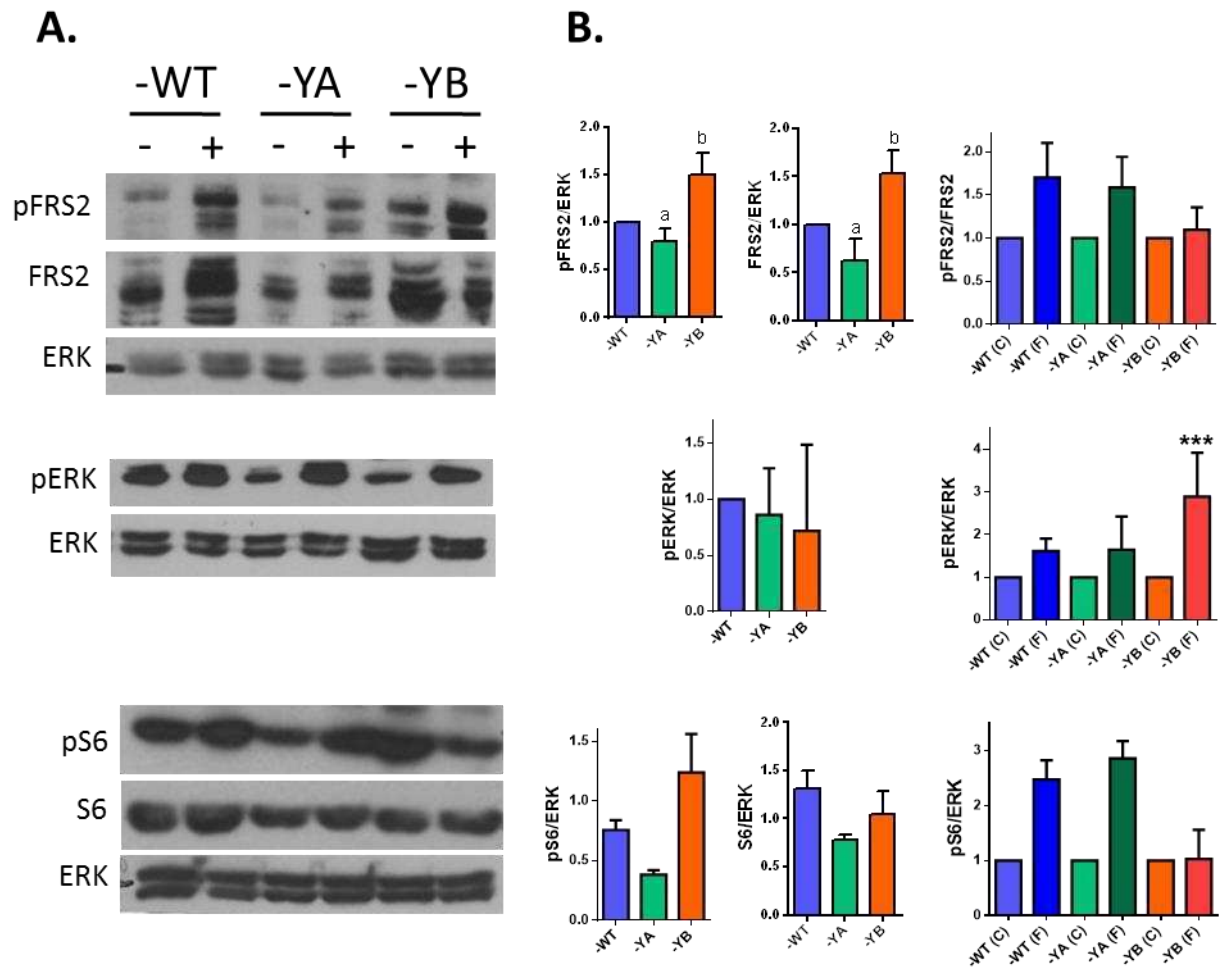


Figura r-23: (A) Expresión de pFRS2/FRS2, pERK/ERK, pS6/S6) y FGFR1 determinado por *Western blot* de las líneas celulares T47D-WT, -YA y -YB con o sin tratamiento con LMW-FGF2 100 ng/ml por 10 minutos. (B) Cuantificación de los *Western blot* relativizado a la línea -WT o al control sin tratar en cada caso. Estadística: Las cuantificaciones se realizaron en base a por lo menos 3 geles independientes, excepto para S6/pS6 (2 geles). Para la comparación en condiciones basales, los valores se relativizaron a los obtenidos para la línea -WT. En el caso de la activación de vías por agregado de LMW-FGF2, las intensidades se relativizaron a los valores de cada línea en condiciones control. Las intensidades se compararon con ANOVA y *Tukey* para las comparaciones de grupos entre sí. (***) $p \leq 0,001$; a vs b: $p \leq 0,05$.

Efecto del BGJ398 en el crecimiento tumoral de la línea celular resistente T47D-YB.

En virtud de que, en cultivo, las tres líneas celulares son sensibles al bloqueo de los FGFR, estudiamos el efecto del BGJ398 sobre el crecimiento de xenotrasplantes T47D-YB en ratones hembra NSG. Para ello, inoculamos 6×10^6 células en el sc de ratones NSG y cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 30 mm^2 , comenzamos el tratamiento con BGJ398 (18 mg/kg/día por medio; *ev*). No observamos diferencias significativas ni en la tasa de

crecimiento ni en el peso final de los tumores tratados con el bloqueante respecto de los tumores T47D-YB tratados con el vehículo (**Figura r-24A**). Como se ilustra en la **Figura r-19**, el tumor -YB es un carcinoma indiferenciado compuesto por planchas de células tumorales con muy escaso estroma interpuesto que alberga vasos sanguíneos (**Figura r-24B**). En el análisis de la histología de los tumores tratados con el inhibidor no se observaron cambios significativos ni en la arquitectura del parénquima ni del estroma tumoral.

Si bien el tratamiento con BGJ398 no resultó en cambios en la histología o en la diferenciación tumoral, evaluamos las marcaciones para α SMA y MUC1. Los tumores tratados con BGJ398 no presentaron cambios en cuanto a la intensidad de MUC1 (**Figura r-24B**). Sin embargo, después del tratamiento observamos un aumento considerable en la cantidad de estroma reactivo, evidenciado por la marcación con α SMA.

En resumen, estas observaciones indican que, si bien el BGJ398 inhibe la proliferación celular de la línea T47D-YB en cultivo, in vivo, el tratamiento no afecta el crecimiento tumoral y tampoco modifica significativamente su arquitectura. No obstante, el inhibidor aumenta la marca para α SMA, lo que sugiere que la droga es capaz de acceder al tumor y genera un efecto, aunque menos marcado que el observado en los tumores del modelo murino.

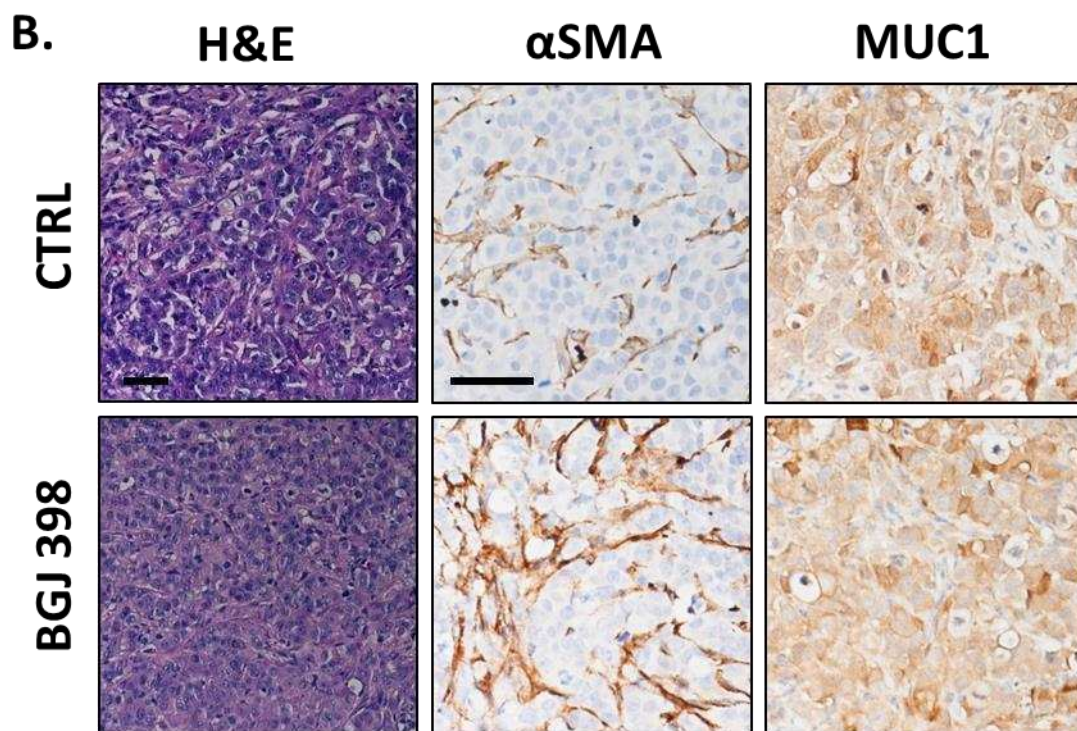
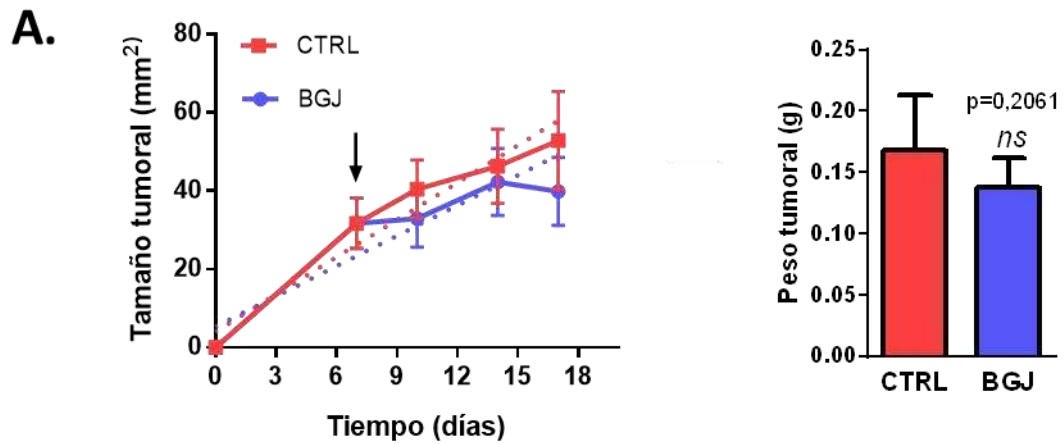


Figura r-24: (A) Efecto del BGJ398 (18 mg/kg/día por medio) sobre el crecimiento de células T47D-YB creciendo en ratones NSG. Se inocularon 6×10^6 células en el flanco derecho de ratones NSG hembras ($n=4$ por tratamiento). Estadística: regresión lineal y comparación de pendientes. Para comparar los pesos tumorales: *t Test*. (B) Histología (H&E) y expresión de α SMA y MUC1 determinada por inmunohistoquímica en xenotrasplantes T47D-YB tratados con BGJ398 o con vehículo. Barra de magnificación: 60 μm .

Generación de variantes que sobreexpresen las distintas isoformas de FGF2.

Con el objetivo de evaluar el rol de las isoformas de FGF2 en la sensibilidad hormonal y la capacidad metastásica, infectamos la línea celular sensible T47D-YA con los plásmidos p6NST50 (control vacío, no contiene la secuencia que codifica para una isoforma de FGF2), pFGF2-18 kDa (LMW-FGF2, sobreexpresa la isoforma de 18 kDa) y pFGF2-22,5 kDa (HMW-FGF2, sobreexpresa la isoforma de 22,5 kDa). Para ello se utilizó el sistema de infección lentiviral, como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los plásmidos que utilizamos para trabajar contienen, además, una secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente de medusa (*GFP, Green Fluorescent Protein*) y un gen de resistencia al antibiótico zeocina (ver el mapa del plásmido en el *Apéndice*).

Control del éxito de la infección.

- **Expresión de GFP**

Se aprovechó la fluorescencia del gen reportero GFP para comprobar por microscopía de fluorescencia que todas las líneas infectadas hubiesen incorporado el plásmido de interés. En todos los casos observamos emisión de fluorescencia verde (**Figura r-25A, panel superior**), lo que indirectamente sugiere la expresión del plásmido p6NST50 o pFGF2.

- **Western blot**

A continuación, corroboramos por *Western blot* la expresión de las isoformas del FGF2 en extractos celulares totales de cada una de las líneas generadas. Observamos la sobreexpresión de la isoforma correspondiente al plásmido utilizado en cada infección (**Figura r-25B**). Cabe mencionar que, junto con la expresión de la isoforma esperada de 22,5 kDa, se observa, aunque en menor medida, la expresión de isoformas de menor peso molecular, probablemente debido a que el FGF2 induce la expresión de su propia proteína y que las isoformas se regulan por traducción alternativa a partir de un mismo mensajero (Prats *et al.* 1989).

Es importante remarcar que la morfología de las líneas no se alteró después de la infección y selección de las distintas variantes (no se ilustra). Además, la tinción con faloidina (que marca polímeros de actina) no evidenció diferencias significativas en cuanto a su citoesqueleto entre las líneas celulares generadas (no se ilustra).

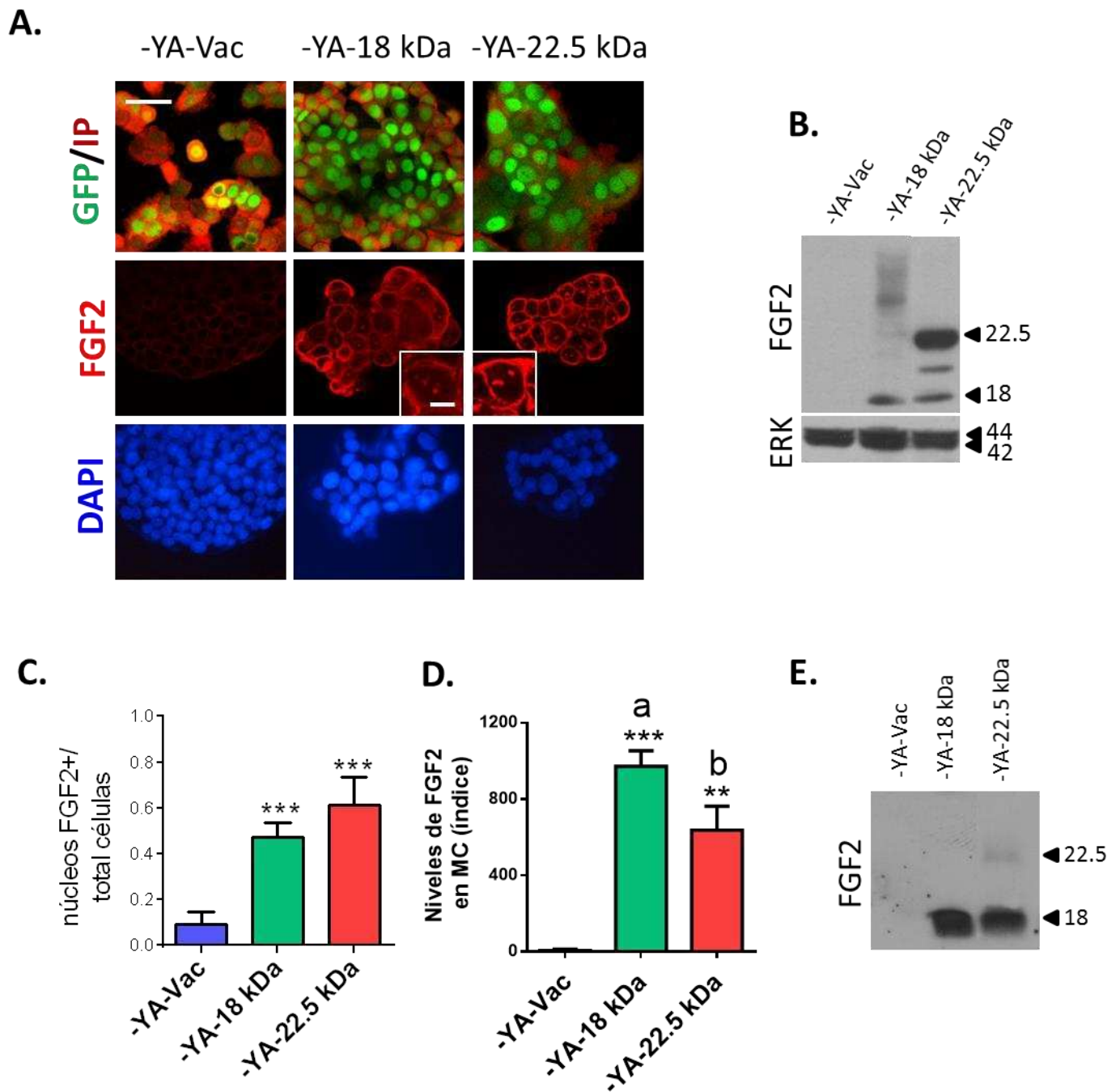


Figura r-25: (A) Expresión de GFP en las líneas celulares T47D-YA generadas luego de la infección con los plásmidos pFGF2. Se contratiñeron los núcleos (en rojo) con yoduro de propidio (IP). El IP se observa citoplasmático, en vez de nuclear, debido a la fijación con PFA 4%. Las fijaciones convencionales con formalina 10% o etanol 70% permiten la entrada del IP al núcleo, pero borran la marca de GFP. Barra de magnificación: 40 μ m; inset 7 μ m. (B) Expresión de las diferentes isoformas de FGF2 en extractos celulares de las líneas generadas, determinado por *Western blot*. (C) Cuantificación de los núcleos positivos para FGF2 en relación al total de células por campo. (D) Niveles de FGF2 en medios condicionados (MC) de las líneas celulares, determinado por ELISA. Estadística: ANOVA y *Tukey* para las comparaciones de grupos entre sí. (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; a vs b $p \leq 0,05$. (E) Expresión de FGF2 en los MC, determinado por *Western blot*.

Localización/liberación del FGF2 expresado en las líneas celulares generadas.

Con el objetivo de determinar la localización subcelular y/o extracelular del FGF2 de las líneas generadas, realizamos ensayos de inmunofluorescencia, ELISA y *Western blot*.

En primer lugar, realizamos ensayos de inmunofluorescencia y corroboramos que, efectivamente, hay sobreexpresión de FGF2 en las líneas celulares -YA-18 y -22,5 kDa respecto al control vacío (-YA-Vac, **Figura r-25A, panel del medio**). La cuantificación de la marca observada reveló un aumento en el citoplasma/membrana celular junto con una mayor expresión nuclear (**Figura r-25C**). Esto demuestra que, tanto la isoforma típicamente nuclear de 22,5 kDa (HMW-FGF2) como la isoforma citoplasmática (LMW-FGF2) también se localizan en el núcleo.

Luego, evaluamos si el FGF2 expresado en las líneas celulares infectadas tiene la capacidad de ser liberado fuera de la célula. Para ello, utilizamos un *kit* comercial de ELISA para determinar la concentración de FGF2 en medios condicionados (MC) de las líneas celulares generadas. Detectamos una mayor liberación de FGF2 en las líneas -YA-18 e -YA-22,5 kDa respecto a la línea -YA-Vacío (**Figura r-25D**). Además, la línea que sobreexpresa la isoforma de 18 kDa libera mayores niveles de FGF2 respecto de la línea que sobreexpresa la isoforma de 22,5 kDa. Como los niveles de FGF2 liberados eran muy elevados, realizamos un *Western blot* de estos MC concentrados (ver *Materiales y Métodos*) para discernir entre las isoformas presentes. Observamos que, en coincidencia con la bibliografía existente (Renko *et al.* 1990), la isoforma predominante en el MC fue la de 18 kDa y también observamos una banda, aunque menos intensa, correspondiente a la isoforma de 22,5 kDa (**Figura r-25E**).

Proliferación celular de las variantes generadas con sobreexpresión de isoformas de FGF2.

Para evaluar el efecto de sobreexpresar las diferentes isoformas de FGF2 sobre la proliferación celular, realizamos ensayos de recuento celular en dos condiciones de cultivo diferentes: **a)** en medio mínimo, SFBch 1% y **b)** en condiciones óptimas de proliferación, SFB 10%. Observamos una mayor proliferación de las líneas -YA-18e-YA-22,5 kDa respecto a la línea control (vector vacío) en ambas condiciones de cultivo (**Figuras r-26A y r-26B**), lo que implica que ambas isoformas promueven la proliferación celular, aún en condiciones favorables de cultivo. Además, observamos que, en suero mínimo, la isoforma 22,5 kDa confiere una mayor capacidad proliferativa que la isoforma liviana (**Figura r-26A**).

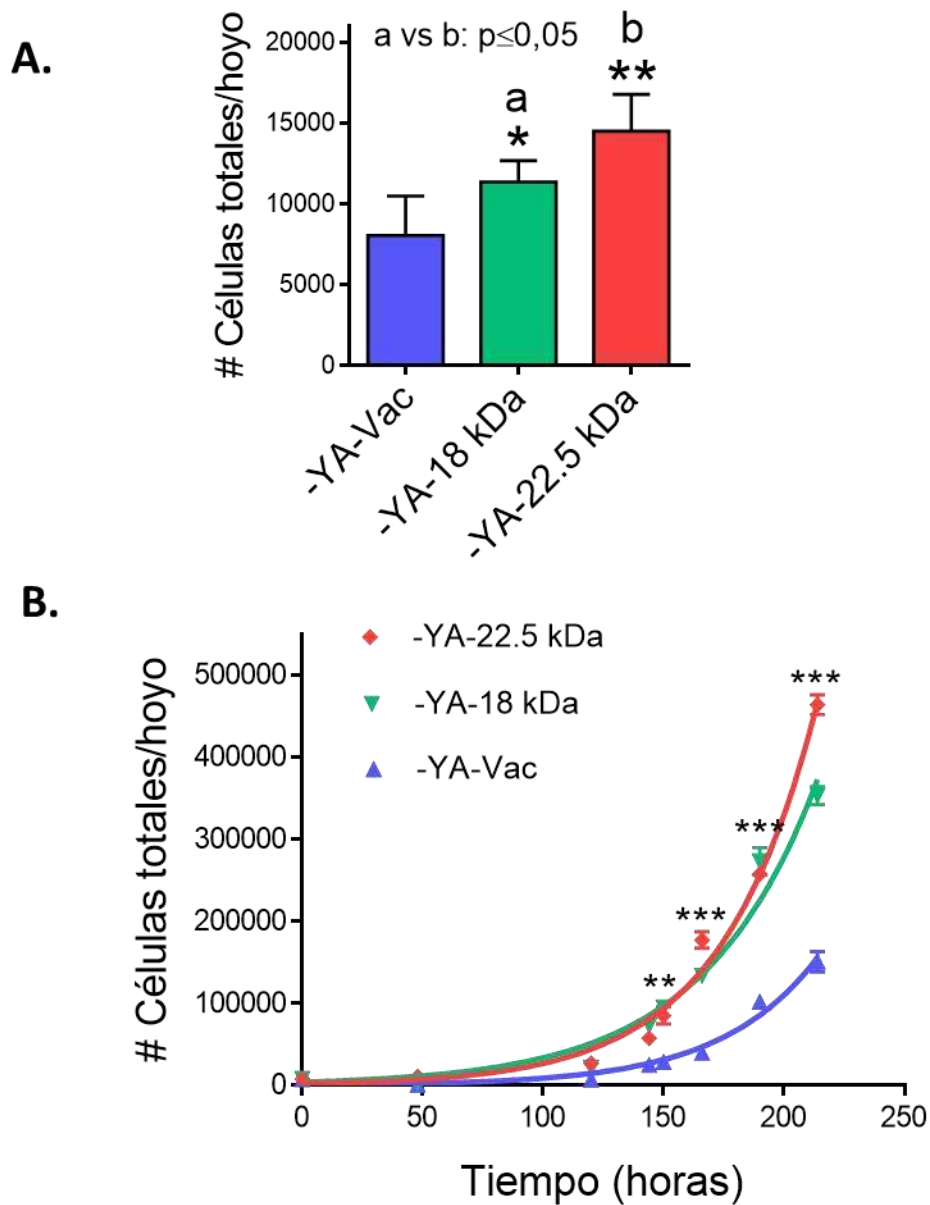


Figura r-26: Evaluación de los niveles de proliferación basal en cultivo de las variantes generadas con sobreexpresión de isoformas de FGF2. Se contó la cantidad de células por hoyo luego de 5 días de crecimiento en medio mínimo (SFBch 1%) **(A)** o luego de 9 días de crecimiento en medio completo (SFB 10%) **(B)**. Se sembraron 5000 células por hoyo. Los ensayos se realizaron tres veces y cada muestra por sextuplicado. Estadística: **(A)** ANOVA y *Tukey* para las comparaciones de grupos entre sí. **(B)** ANOVA de dos vías y *Tukey* para las comparaciones de grupos entre sí. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$.

Evaluación de la tasa de crecimiento, la histología tumoral y la capacidad invasiva de las líneas T47D-YA-Vacía, T47D-YA-18 e -YA-22,5 kDa.

Debido a que la sobreexpresión de las isoformas 18 y 22,5 kDa estimuló un aumento en la tasa de proliferación en cultivo, decidimos evaluar el efecto sobre el crecimiento de xenotrasplantes en ratones NSG. Según bibliografía, para lograr que la línea celular T47D se establezca y crezca *in vivo*, es necesario tratar previamente los ratones con estradiol (Liang *et al.* 2007; Sartorius *et al.* 2003). Para ello, se colocó un *pellet* subcutáneo con la hormona (ver *Materiales y Métodos*) y 48 h más tarde, se inocularon 7×10^6 células en el flanco inguinal derecho de los ratones. Al cabo de aproximadamente dos meses, las células que sobreexpresan la isoforma 22,5 kDa formaron tumores de mayor tamaño y peso en comparación con las otras dos líneas celulares (**Figura r-27A**). Además, a simple vista, estos tumores presentaron mayor vascularización y hemorragias locales (**Figura r-27B, panel superior**).

- 1) T47D-YA-Vacío: estos tumores son mayormente indiferenciados, sin esbozos ductales y similares al parental T47D-YA (**Figura r-27B, panel inferior**). El tumor está compuesto por nidos de células epiteliales dispuestos en grupos, separados por finos tabiques de estroma que albergan vasos sanguíneos. El tumor presenta signos de invasión en su frente de crecimiento y al igual que el tumor -YA, crece dentro de los conductos mamarios. En cuanto al análisis citológico, las células son homogéneas entre sí, con citoplasma eosinófilo y núcleos centrales de gran tamaño, con uno o dos nucléolos. Los núcleos son claros debido a la presencia de varias vacuolas intracelulares. Hay mitosis dispersas, con predominio de apoptosis.

- 2) T47D-YA-18 kDa: estos tumores crecen casi estrictamente dentro de los conductos mamarios de forma similar a los tumores T47D-YA-Vacío (**Figura r-27B**). En cuanto al análisis histológico, corroboramos que la mayor parte del tumor tiene un crecimiento intraductal y que menos del 10% es infiltrante. En el análisis citológico del sector infiltrante se observa que este tumor se asemeja a los tumores -YA-Vacío, aunque los núcleos celulares no son tan pequeños. El tumor tiene estroma interpuesto y moderado número de mitosis.

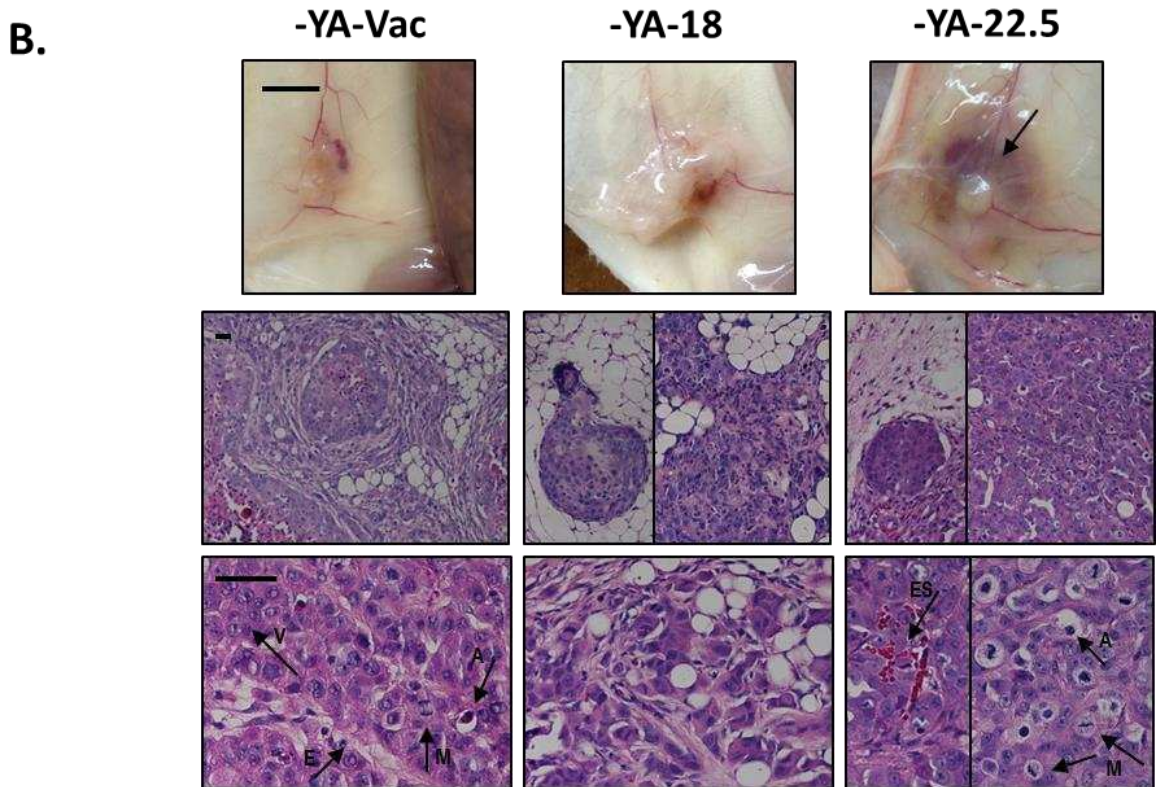
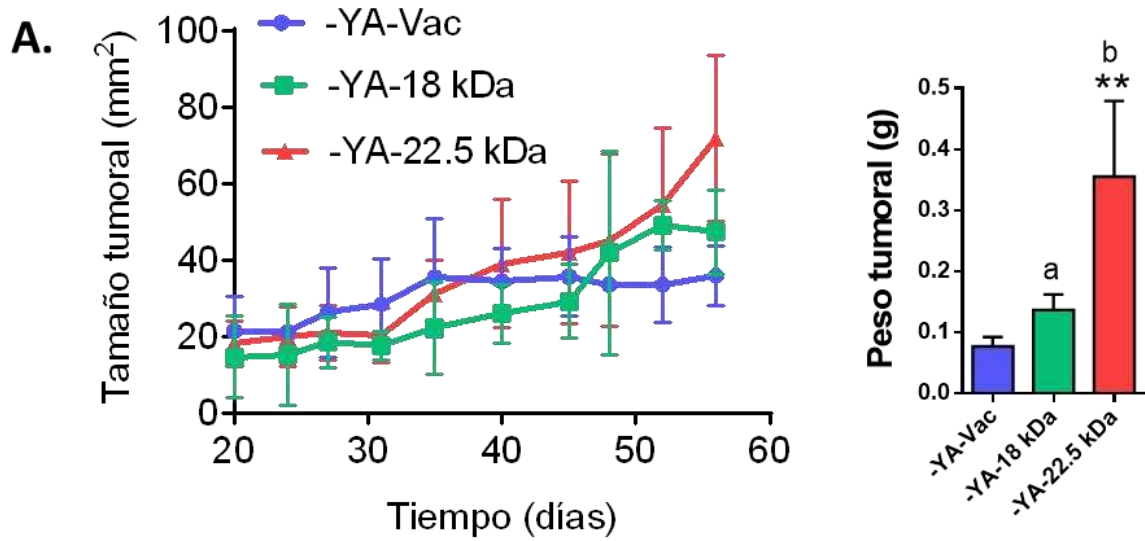


Figura r-27: (A) Evaluación de la tasa de crecimiento tumoral de las líneas -YA-Vac, -YA-18 e -YA-22,5 kDa. Se inocularon 7×10^6 células en el flanco derecho de ratones NSG hembra ($n=5$ por línea celular). Estadística: regresión lineal y comparación de pendientes. Para el peso tumoral se realizó ANOVA y *Tukey* para comparar entre grupos. (**) $p \leq 0,01$; a vs b $p \leq 0,05$ **(B, panel superior)** Observación macroscópica de los tumores al finalizar el experimento. Barra de magnificación: 5 mm. **(B, panel inferior)** Histología (H&E) de los xenotrasplantes. Con una flecha se señalan las apoptosis (A), mitosis (M), vacuolas (V), estroma (E) y eritrocitos (ES). Barra de magnificación: 30 μ m. Se muestra un experimento representativo de dos.

3) T47D-YA-22,5 kDa: estos tumores presentan un alto grado de agresividad local, evidenciada por numerosas embolias intra y peritumorales, alta invasión del tejido adiposo, muscular y de los paquetes nerviosos (**Figura r-28A**). Debido a ello, resulta difícil compararlos con los otros tumores (-YA-Vacío e -YA-18 kDa) y por esta razón nos limitamos a comparar solamente los bordes infiltrantes de cada variante tumoral. En concordancia con el crecimiento acelerado y el mayor tamaño tumoral al finalizar el ensayo, estos tumores presentan un gran número de mitosis y apoptosis (**Figuras r-27B**). Además, poseen un mayor contenido de vasos sanguíneos y eritrocitos, probablemente debido a los elevados niveles intratumorales de FGF2 (**Figuras r-27B y 28Aii y iii**). En cuanto al análisis citológico, los núcleos celulares son más grandes y están poco condensados, con la cromatina dispersa. De hecho, el tamaño de las células es irregular en comparación con los tumores -YA-Vacío.

Resulta interesante mencionar que, en ensayos preliminares con las líneas -YA-22 e -YA-34 kDa, observamos una histología similar a la obtenida con la línea -YA-22,5 kDa, que incluyó invasión del tejido muscular, alto número de mitosis atípicas, neovascularización y embolias tumorales (**Figura r-28B**). Estas embolias, aunque de menor calibre y cantidad, también se observaron en xenotrasplantes -YA e -YB (no se ilustra). En conjunto, nuestras observaciones sugieren que la sobreexpresión de las HMW-FGF2 sería capaz de inducir un fenotipo más invasor.

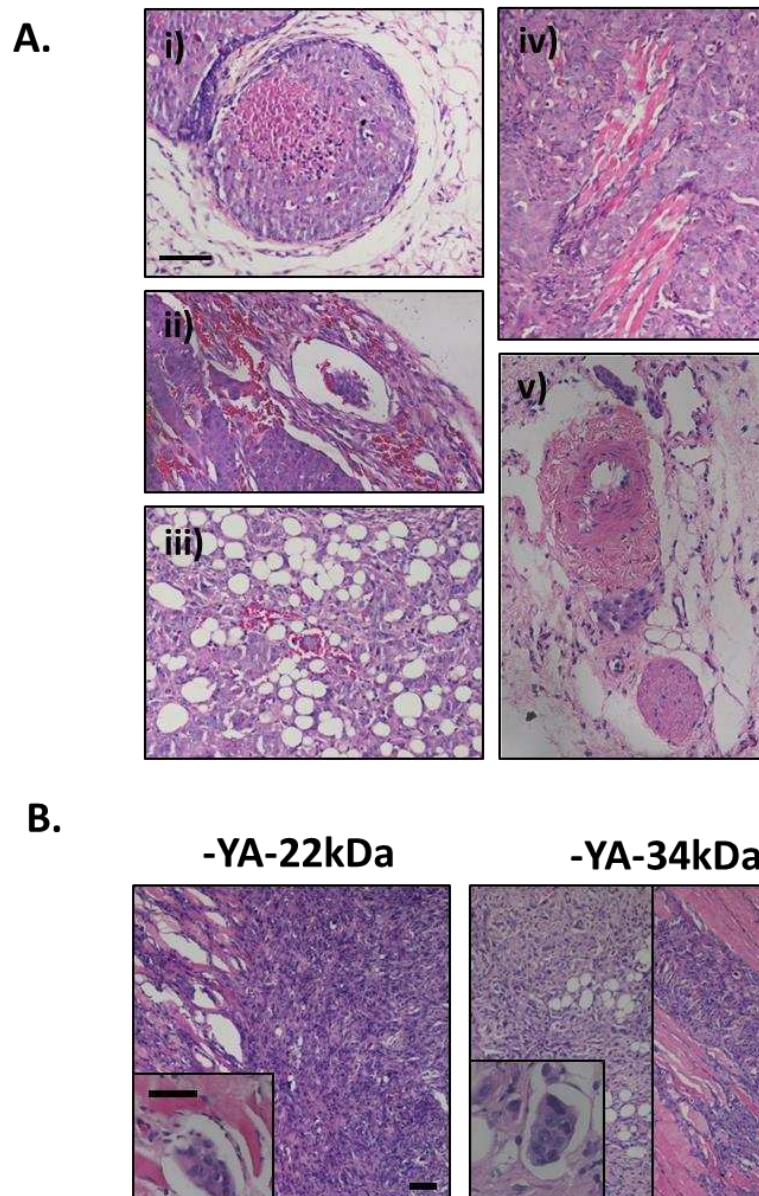


Figura r-28: (A) Se observan ejemplos de las características invasoras de los xenotrasplantes derivados de la línea celular -YA-22,5 kDa: (i) embolia intratumoral (ii) y peritumoral, (iii) invasión de tejido adiposo y (iv) muscular y (v) una invasión del paquete nervioso. Barra de magnificación: 70 μ m. (B) Histología (H&E) de xenotrasplantes de las líneas -YA-22 e -YA-34 kDa. Barra de magnificación: 100 μ m; inset 30 μ m.

Evaluación de la respuesta proliferativa a la terapia endócrina en cultivo de las variantes generadas con sobreexpresión de isoformas de FGF2.

A continuación, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de las diferentes isoformas de FGF2 en la resistencia a la terapia endócrina en cultivo. Conforme a nuestra hipótesis de trabajo, esperábamos que las líneas que sobreexpresan FGF2 fueran resistentes al tratamiento con

MFP. Observamos que el tratamiento con el antiprogéstágeno indujo una inhibición en el número de células totales en la línea -YA-Vacío, pero no afectó la línea-YA-18 kDa (**Figura r-29A**). Llamativamente, la MFP indujo un aumento significativo en la proliferación celular de la línea -YA-22,5 kDa.

Para investigar la especificidad del efecto, estudiamos la resistencia a otro antiprogéstágeno, el acetato de telapristona (ver *Introducción*), y observamos resultados similares a los obtenidos con MFP para las tres líneas celulares (**Figura r-29B**). Por último, evaluamos si la resistencia endocrina es cruzada, es decir, si se observa un efecto similar frente al tratamiento con un modulador selectivo del receptor de estrógenos, el tamoxifeno (ver *Introducción*). Nuevamente, observamos que los resultados fueron similares; el tratamiento con el antiestrógeno inhibió la proliferación de la línea control -YA-Vacío, la línea -YA-18 kDa no se alteró y la línea -YA-22,5 kDa estimuló su proliferación celular (**Figura r-29C**).

Por otro lado, la sobreexpresión de FGF2 no parece afectar los niveles de expresión de RPA (**Figura r-29D**). Estos resultados sugieren que, en las líneas celulares generadas, la sobreexpresión de isoformas de FGF2 genera resistencia hormonal por un mecanismo independiente de la expresión de los RP.

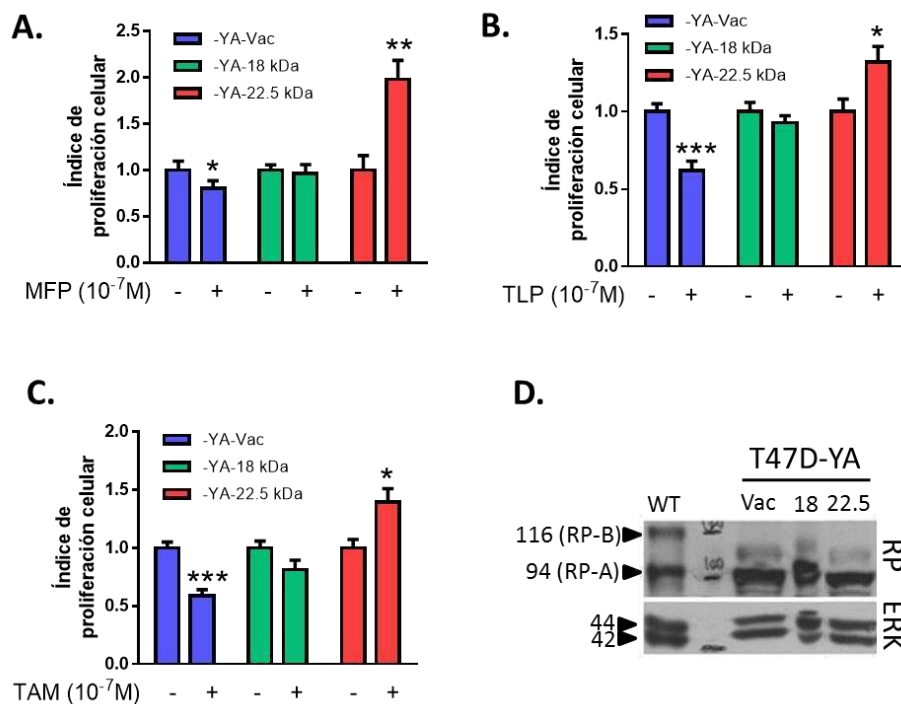


Figura r-29: (A) Efecto de la sobre-expresión de FGF2 sobre el tratamiento con mifepristona (MFP) (A), acetato de telapristona (TLP) (B) y tamoxifeno (TAM) (C) en cultivo de las líneas T47D-YA-Vacío, -18 y -22,5 kDa. Los ensayos fueron realizados tres veces y cada muestra por octuplicado. Estadística: *t Test* (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$. (D) Expresión de los RP en extractos totales de líneas celulares T47D-WT y las T47D-YA infectadas con los distintos plásmidos pFGF2, determinada por *Western blot*.

Evaluación del efecto de la terapia endocrina sobre el crecimiento tumoral de las variantes generadas con sobreexpresión de isoformas de FGF2.

Hasta el momento, indujimos resistencia hormonal en cultivo a una línea celular originalmente sensible al tratamiento endocrino, T47D-YA, por sobreexpresión de las isoformas de 18 y 22,5 kDa del FGF2. En vista de los resultados expuestos en los modelos murino y humano, evaluamos el crecimiento tumoral y la sensibilidad hormonal de xenotrasplantes de las líneas 1) T47D-YA-Vacío, 2) T47D-YA-18 kDa y 3) T47D-YA-22,5 kDa.

- 1) T47D-YA-Vacío: el tratamiento con MFP indujo una disminución en la tasa de crecimiento y en el peso tumoral al finalizar el experimento respecto al grupo control tratado con vehículo (**Figura r-30A**). En el nivel macroscópico, los tumores tratados con el antiprogéstágeno fueron considerablemente más chicos que los tumores control (**Figuras r-30A y r-30B**). Como mencionamos anteriormente (**Figura r-27B**), el análisis histológico reveló que los tumores -YA-Vacío están poco diferenciados (**Figura r-30C**). Este tumor crece mayoritariamente dentro de los conductos, donde no hay ni estroma ni vascularización y consecuentemente, existen amplias zonas de necrosis. En algunas zonas, el tumor logra infiltrarse entre los conductos e invade el tejido graso de la mama, donde se observan figuras mitóticas y apoptóticas. La zona principal del tumor tiene pocos vasos sanguíneos y escaso estroma, en tanto los bordes infiltrantes no presentan casi estroma. Los tumores-YA-Vacío tratados con MFP también son indiferenciados y crecen preferentemente dentro de los conductos mamarios. Se observa un aumento en el componente estromal a expensas de la cantidad de células tumorales. Los núcleos tienen la cromatina más condensada y no se distinguen nucléolos, lo que sugiere menor actividad nuclear.

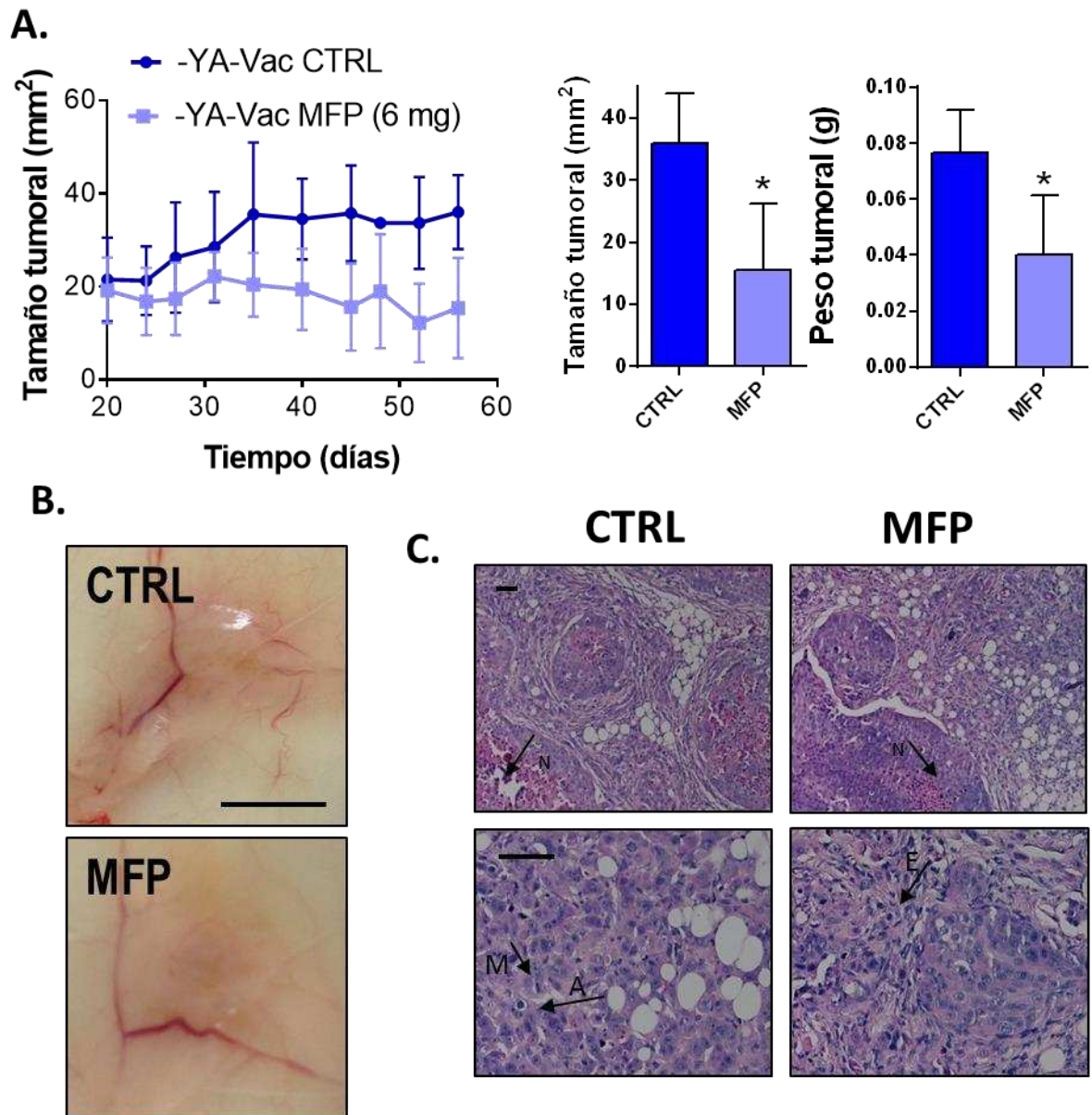


Figura r-30: (A) Crecimiento tumoral de xenotrasplantes T47D-YA-Vacío en el flanco derecho inguinal de ratones hembra NSG con y sin MFP (*pellet* 6 mg; n=5 por tratamiento). Estadística: regresión lineal y comparación de las pendientes de las rectas. Para los otros gráficos: *t Test*. (*) $p \leq 0,05$. (B) Observación macroscópica de los tumores al finalizar el experimento. Barra de magnificación: 5 mm. (C) Histología de los xenotrasplantes (H&E). Con flechas se muestran zonas de necrosis (N), algunas figuras mitóticas (M) y apoptóticas (A) y el aumento del estroma. Barra de magnificación: 50 μ m. Se muestra un experimento representativo de dos.

2) T47D-YA-18 kDa: el tratamiento con MFP no incidió en la tasa de crecimiento o en el peso final de los tumores respecto al grupo control (**Figura r-31A**). Confirmamos que esta variante crece preferentemente dentro de los conductos mamarios, aunque posee zonas infiltrantes que invaden el tejido adiposo mamario (**Figura r-31C**). El tratamiento con MFP causó un crecimiento casi exclusivamente intraductal, con escasos signos de invasión del tejido adyacente.

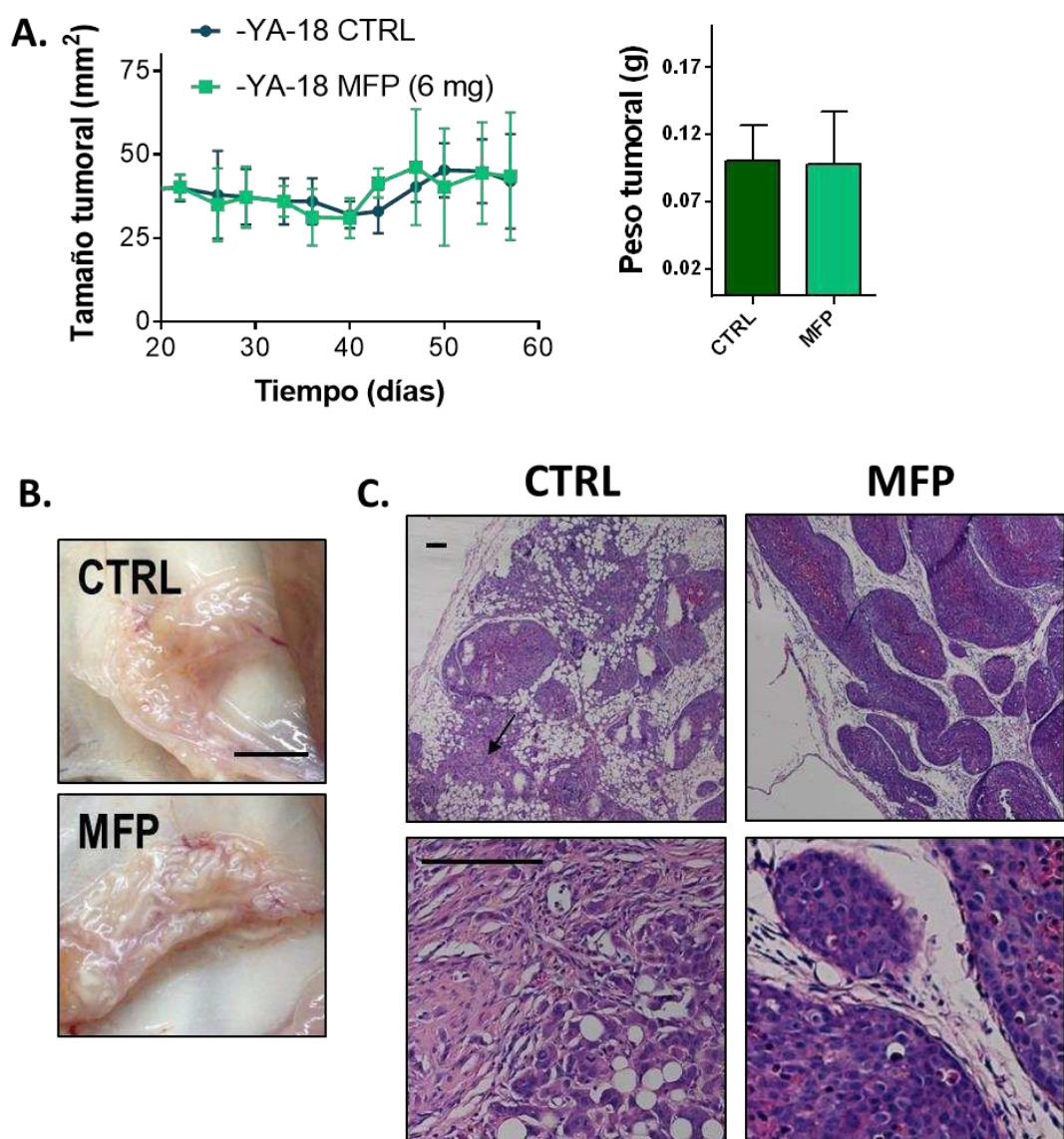


Figura r-31: (A) Crecimiento tumoral de xenotrasplantes T47D-YA-18 kDa en el flanco derecho inguinal de ratones hembra NSG con y sin MFP (*pellet* 6 mg) (n=5 por tratamiento). Estadística: regresión lineal y comparación de las pendientes de las rectas. Para los pesos tumorales: *t Test*. (B) Observación macroscópica de los tumores al finalizar el experimento. Barra de magnificación: 5 mm. (C) Histología de los xenotrasplantes (H&E). Con flechas se muestran zonas de infiltración hacia el tejido adiposo mamario. Barra de magnificación: 100 μ m. Se muestra un experimento representativo de dos.

- 3) T47D-YA-22,5 kDa: el tratamiento con MFP no afectó ni la tasa de crecimiento ni el peso final de los tumores respecto al grupo control (**Figura r-32A**). En este ensayo, corroboramos que los tumores -YA-22,5 kDa poseen una alta tasa de crecimiento en comparación con las otras variantes, dado que después de dos meses alcanzó casi los 100 mm², mientras que los tumores -YA-Vacío y -YA-18 kDa no superaron los 40 y 50 mm², respectivamente (**Figuras r-30A y r-31A**). En el nivel macroscópico tampoco observamos diferencias en cuanto al tamaño o la apariencia de los tumores tratados con el antiprogéstágeno en relación a los tumores control (**Figura r-32B**). En cuanto al análisis histológico, el tratamiento con MFP indujo un aumento en la cantidad de estroma intratumoral, aunque no afectó significativamente la histología del parénquima tumoral. En ambos grupos, los tumores presentaron claros signos de invasión, ejemplificados por embolias intratumorales y en tejidos adyacentes como la piel y glándula mamaria (no se ilustra). Además, observamos un gran número de mitosis y apoptosis, lo que indica mayor velocidad de crecimiento. Con respecto a la citología, las células son muy irregulares en cuanto a tamaño, algunas son exclusivamente núcleo y otras son multinucleadas.

Evaluación del efecto de la terapia endocrina sobre la capacidad metastásica de las variantes generadas con sobreexpresión de isoformas de FGF2.

El análisis histológico de los xenotrasplantes nos permitió concluir que las tres variantes son capaces de generar embolias intratumorales y en la piel. Sin embargo, el grado nuclear y la agresividad local fueron significativamente diferentes y por estas razones, decidimos evaluar la presencia de metástasis a distancia en todos los ratones portadores de tumor. Además, como sabemos que los tumores presentan sensibilidad diferencial al tratamiento con MFP, evaluamos el efecto de la terapia endocrina sobre la diseminación metastásica.

Evaluamos la presencia de focos metastásicos en cortes histológicos de los cinco lóbulos pulmonares de todos los ratones portadores de tumor. Las tres variantes tumorales fueron capaces de generar tanto embolias como micrometástasis en los pulmones (**Figura r-33A**). Sin embargo, si tomamos en cuenta el número de focos metastásicos con más de 10 células, el número fue mayor en los ratones con tumores -YA-22,5 kDa respecto de los -YA-Vacío y -YA-18 kDa (**Figura r-33B**). Además, dos de los ratones portadores de tumor -YA-22,5 kDa presentaron metástasis axilares (no se ilustra).

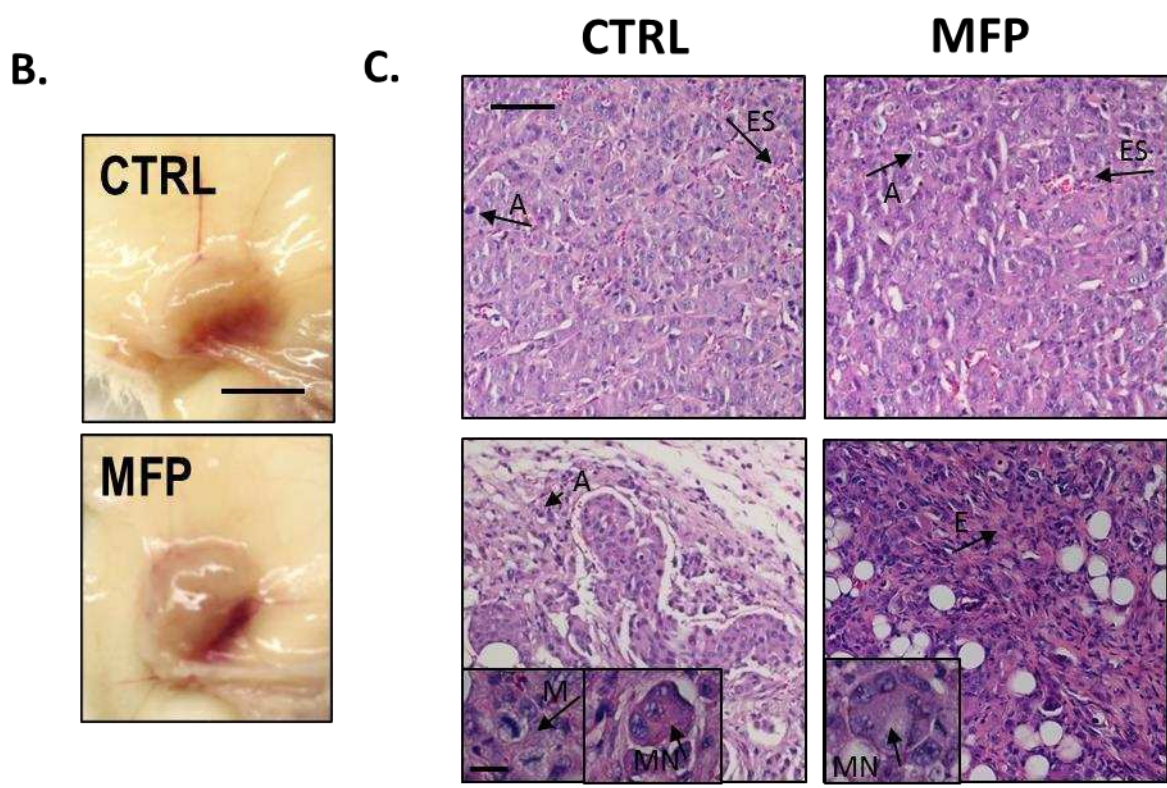
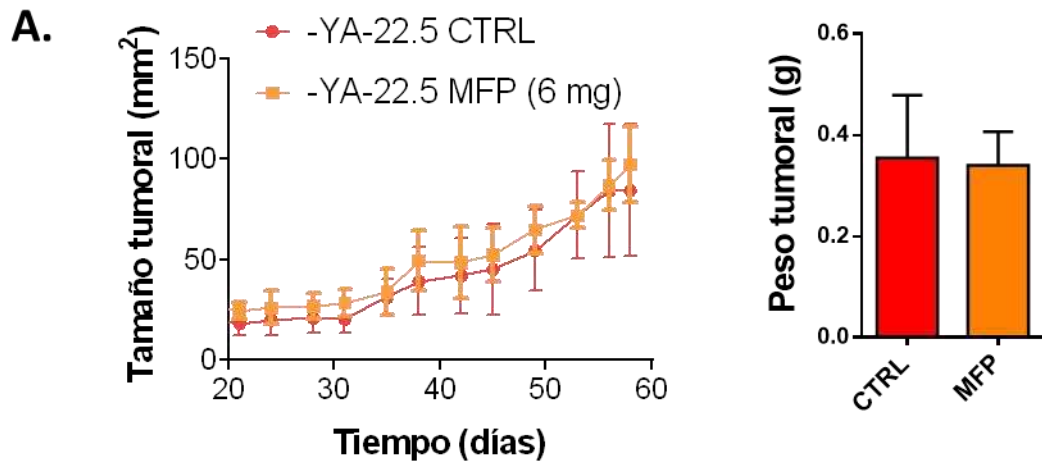


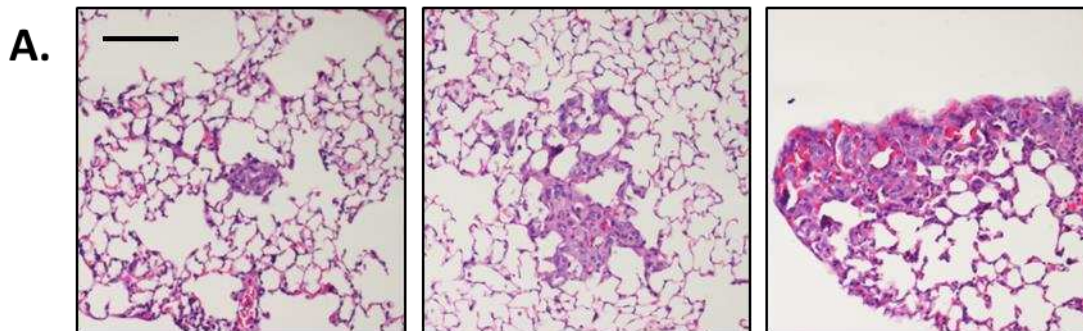
Figura r-32: (A) Crecimiento tumoral de xenotrasplantes T47D-YA-22,5 kDa en el flanco derecho inguinal de ratones hembra NSG con y sin MFP (*pellet* 6 mg; n=5 por tratamiento). Estadística: regresión lineal y comparación de las pendientes de las rectas. Para los otros gráficos: *t Test*. (B) Observación macroscópica de los tumores al finalizar el experimento. Barra de magnificación: 8 mm. (C) Histología de los xenotrasplantes (H&E). Con flechas se señalan eritrocitos (ES), apoptosis (A), mitosis (M) y células multinucleadas (MN). Barra de magnificación: 100 μ m; inset 10 μ m. Se muestra un experimento representativo de dos.

Si realizamos un análisis similar con el tratamiento con MFP, no detectamos diferencias significativas. Sin embargo, se observan tendencias inhibitorias del número de focos para las

líneas YA-Vacío e -YA-18 kDa y una tendencia estimuladora con la línea -YA-22,5 kDa (**Figuras r-33B y r-33C**). Futuros ensayos que permitan aumentar el número de ratones permitirán confirmar o rechazar estas tendencias.

En conjunto, estos resultados señalan que las isoformas de 18 y 22,5 kDa de FGF2 inducen resistencia endocrina en cultivo e in vivo. Ambas isoformas promueven la proliferación celular en cultivo y una mayor tasa de crecimiento tumoral, en relación a la variante infectada con el plásmido control. Sin embargo, es la isoforma pesada la que potencia realmente este efecto, dado que se alcanzan tamaños tumorales significativamente mayores con respecto a las otras dos variantes tumorales. Postulamos que la isoforma de 22,5 kDa probablemente gatille señales intracrinas que favorecen la proliferación de la célula tumoral y la resistencia endocrina.

En cuanto a la capacidad de invasión, las tres variantes tumorales infiltran el tejido adyacente, en mayor o menor medida, y son capaces de generar metástasis pulmonares. Sin embargo, en cuanto al grado de agresividad local, la variante que sobreexpresa la isoforma liviana posee un fenotipo intermedio entre la variante -YA-Vacío (con pocos signos de invasión) y la variante que sobreexpresa la isoforma de 22,5 kDa (con claros signos de invasión). Los tumores -YA-22,5 kDa invaden de forma más agresiva el tejido adyacente (incluido el músculo) y hacen metástasis tanto en el ganglio axilar como en el pulmón. Por todo esto, proponemos que la isoforma de 18 kDa tiene menor injerencia en la capacidad invasiva propia de los tumores, mientras que las isoformas HMW-FGF2, o al menos la de 22,5 kDa, conferiría un fenotipo más agresivo.



B.

	-YA-Vacío		-YA-18 kDa		-YA-22.5 kDa	
	CTRL	MFP	CTRL	MFP	CTRL	MFP
# de ratones con metástasis pulmonares	4/5	3/5	6/6	5/6	6/6	7/7
# met. totales	15	9	30	9	42	108
# de ratones con met \geq a 10 células	4/5	2/5	4/6	0/6	6/6	7/7
# met. totales \geq a 10 células	12	6	6	0	36	64

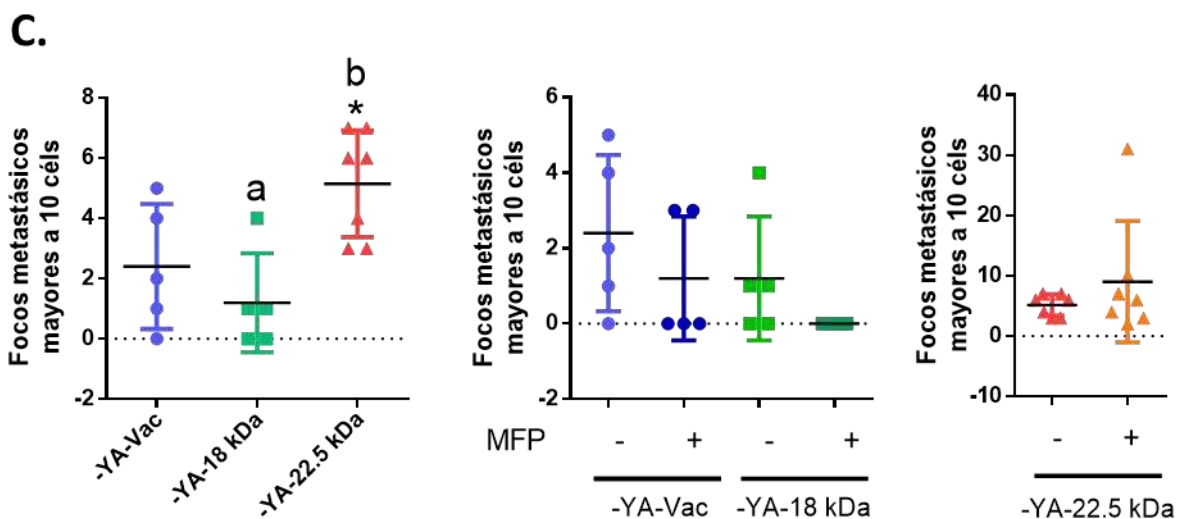


Figura r-33:(A) Histología (H&E) de los pulmones y focos metastásicos provenientes de ratones portadores de xenotrasplantes T47D-YA-22,5 kDa. Barra de magnificación: 100 μ m. (B) Recuento de la cantidad de ratones con metástasis pulmonares (met). (C) Cuantificación del número de focos metastásicos (met) de más de 10 células de dos experimentos. Estadística: ANOVA y *Tukey* para comparar entre dos grupos. a vs b: $p \leq 0,01$; (*): $p \leq 0,05$.

Efecto de altos niveles séricos de FGF2 sobre el crecimiento de tumores -YA-Vacío.

Con el fin de evaluar si la presencia de un tumor que sobreexpresa las diferentes isoformas de FGF2 afecta los niveles circulantes de este factor, analizamos por ELISA los niveles de FGF2 en el suero de ratones portadores de tumores -YA-Vacío, -YA-18 e -YA-22,5 kDa. Detectamos niveles significativamente mayores de FGF2 en el suero de ratones portadores de tumores -YA-22,5 kDa en relación a los ratones con los tumores control -YA-Vacío e -YA-28 kDa (**Figura r-34A**).

Como mencionamos anteriormente, la línea T47D-YA necesita la administración exógena de estradiol para crecer *in vivo*. Por lo tanto, evaluamos si el tumor -YA-22,5 kDa es capaz de crecer en ausencia de la hormona. En un ensayo preliminar observamos que no sólo crece en ausencia de estradiol, sino que alcanza un mayor tamaño comparado con tumores que crecen en presencia de la hormona (no se ilustra). En base a este resultado y a que los ratones portadores de tumores -YA-22,5 kDa liberan mayores cantidades de FGF2 al torrente sanguíneo, evaluamos la tasa de crecimiento de tumores -YA-Vacío e -YA-22,5 kDa inoculados en flancos contralaterales del mismo ratón (**Figura r-34B**). Al igual que en el ensayo preliminar, observamos que la línea que sobreexpresa la isoforma de 22,5 kDa fue capaz de crecer en ausencia de la administración exógena de estradiol (**Figura r-34C**). Curiosamente, los resultados con la variante -YA-Vacío también fueron similares y el tamaño tumoral final fue superior a los observados en presencia de la hormona (**Figuras r-27A y 30A**). Además, determinamos que la presencia del tumor-YA-22,5 kDa en un flanco no es capaz de modificar el crecimiento tumoral de la línea -YA-Vacío en el flanco contralateral. Estos hallazgos sugieren que el efecto proliferativo del FGF2 es local y que no alcanzan altos niveles sistémicos para estimular el crecimiento de esta variante tumoral.

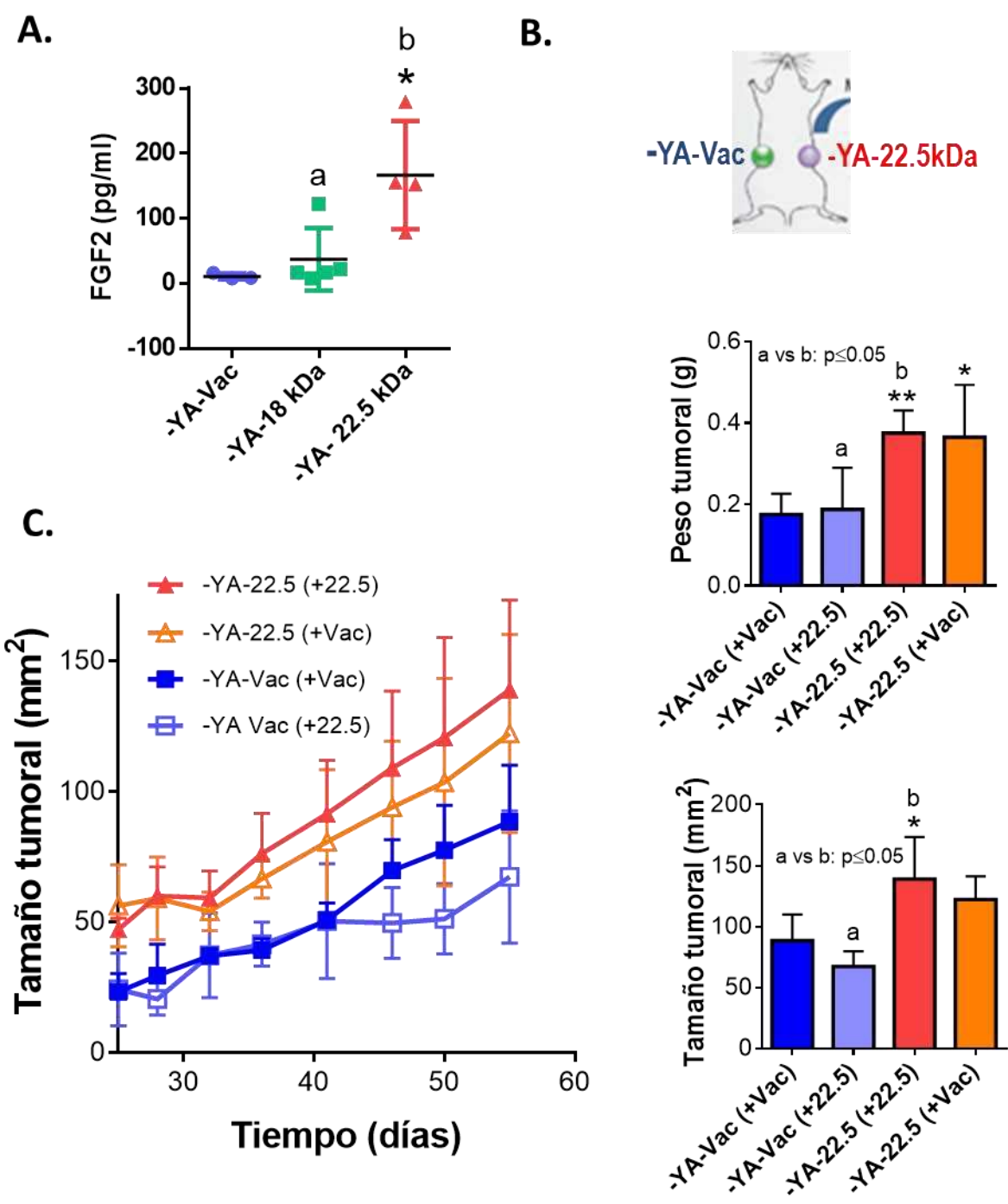


Figura r-34: (A) Niveles de FGF2 en suero de ratones portadores de tumores, determinado por ELISA. (B) Esquema experimental. (C) Efecto de la sobreexpresión de FGF2 sobre el crecimiento tumoral de T47D-YA-Vacío e -YA-22,5 kDa en ratones hembra NSG (n=6 por línea celular). Estadística: regresión lineal y comparación de las pendientes de las rectas. Para los otros gráficos: ANOVA y *Tukey* para comparar entre dos grupos. (**): $p \leq 0,01$; a vs b y (*): $p \leq 0,05$.

RESUMEN DE RESULTADOS (PARTE 2)

En resumen, a partir de los resultados expuestos en esta parte determinamos que, en la línea humana de cáncer de mama T47D, las HMW-FGF2 cumplen un rol importante en el crecimiento y la progresión tumoral.

La variante resistente, T47D-YB, expresa mayores niveles de HMW-FGF2, FGFR1, -2 y libera mayores cantidades de FGF2 al espacio extracelular respecto de la variante sensible. La variante resistente presenta una activación constitutiva de la vía de FGF2 a través de la activación de FRS2 y AKT. Los resultados sugieren que en la resistencia endocrina se activa un mecanismo autocrino/intracrino que favorecería la proliferación celular aún en ausencia del agregado exógeno de FGF2.

La sobreexpresión de las isoformas de 18 y 22,5 kDa indujo la resistencia endocrina tanto en cultivo como in vivo y sólo la isoforma pesada de 22,5 kDa indujo un aumento en el número de focos metastásicos. En conjunto, demostramos que ambas isoformas participarían de la resistencia endocrina y establecimos diferencias en el rol de la isoforma liviana de 18 kDa respecto de la isoforma de 22,5 kDa que sugieren un rol predominantemente proliferativo e invasivo, respectivamente.

En conjunto, estos resultados son la primera evidencia de resistencia endocrina e inducción de metástasis en cáncer de mama asociado a HMW-FGF2.

DISCUSIÓN

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio”

Gregorio Marañón

En este trabajo de Tesis estudiamos el rol de la vía de FGF2/FGFR en tres familias de carcinomas mamarios murinos con diferente respuesta a la terapia endocrina. Los resultados obtenidos demuestran que las variantes resistentes expresan mayores niveles de FGF2 (particularmente HMW-FGF), FGFR1 y FGFR2 con relación a las variantes sensibles. Además, validamos nuestros hallazgos en el modelo de cáncer de mama humano T47D y sus variantes -YA e -YB. Estudiamos también si las distintas isoformas de FGF2 modifican la sensibilidad a la terapia hormonal en la línea -YA, que expresa altos niveles de PRA y es sensible a la terapia hormonal. Observamos que la sobreexpresión de las isoformas de 18 y 22,5 kDa aumentó la tasa de crecimiento y revirtió la sensibilidad endocrina, tanto en cultivo como *in vivo*. Finalmente, evaluamos el rol de las isoformas de FGF2 sobre la capacidad de invasión y la diseminación metastásica. Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de la isoforma de 22,5 kDa aumenta la capacidad invasiva de las células, no así la isoforma liviana. Esta es la primera evidencia de resistencia endocrina en cáncer de mama asociado a FGF2.

Expresión de isoformas de FGF2 y cáncer

En la primera parte del trabajo analizamos la expresión y localización de FGF2 en las variantes del modelo murino y humano. Observamos un aumento en los niveles de FGF2 total y HMW-FGF2 en extractos proteicos de tumores murinos resistentes (en 100% de las variantes resistentes evaluadas, n=5), respecto de sus variantes sensibles. Si bien esto podría deberse a un aumento en la cantidad de estroma, las marcaciones obtenidas por IHQ sugieren que el aumento de FGF2 ocurre justamente en el parénquima tumoral. Además, dado que muchas de las variantes resistentes murinas poseen menos estroma y éste es una gran fuente de FGF2, las diferencias observadas por *Western blot* podrían ser aún mayores en ausencia de estroma. En efecto, encontramos resultados similares con variantes derivadas de la línea humana T47D en cultivo.

Varios trabajos asocian los niveles elevados de FGF2 con cánceres avanzados y de mal pronóstico (Horstmann *et al.* 2005; George *et al.* 2002; Cuevas *et al.* 2013), aunque la mayoría de los estudios no diferencia entre isoformas (Sharpe *et al.* 2011). Los pocos trabajos que estudian las HMW-FGF2 en cáncer coinciden con nuestras observaciones en cuanto a que durante la progresión tumoral habría un aumento en su expresión (Vagner *et al.* 1996; Iberg *et al.* 1989). Si nos remitimos exclusivamente a estudios en cáncer de mama, sólo encontramos tres publicaciones al respecto y ninguno de ellos hace referencia a los niveles de expresión endógenos de HMW-FGF2 (Li *et al.* 2015; Piotrowicz *et al.* 1999; Piotrowicz *et al.* 2001).

Nuestros resultados también indican que las dos variantes resistentes adquiridas analizadas, y ninguna de las constitutivas, expresan mayores niveles de LMW-FGF2 respecto de las variantes sensibles. Aún no evaluamos los niveles de las isoformas de FGF2 en la variante resistente adquirida de la familia 59 que permitirían hipotetizar que los tumores con resistencia adquirida presentan mayor expresión de todas las isoformas de FGF2. Por trabajos previos de nuestro laboratorio, sabemos que las variantes resistentes adquiridas desarrollan metástasis más rápidamente que los tumores parentales que le dieron origen (Wargon *et al.* 2009). Si se tiene en cuenta la función promigratoria descrita para la isoforma liviana (Klein *et al.* 1996), el incremento en su expresión, o un desbalance en la expresión de isoformas livianas y pesadas, podría favorecer la diseminación metastásica de las variantes con resistencia adquirida, que se combina con el rol proliferativo de las isoformas pesadas (Wang *et al.* 2015; Delrieu 2000).

Al evaluar el efecto de la sobreexpresión de las isoformas de FGF2 sobre la capacidad proliferativa en cultivo, notamos que las isoformas de 18 y 22,5 kDa confieren a la línea -YA mayor velocidad de crecimiento respecto de la línea control -YA-Vacío. Además, observamos que la línea -YA-22,5 kDa prolifera más rápidamente que la -YA-18 kDa en medio mínimo. En línea con nuestras observaciones, *Delrieu y colaboradores* describen que, a través de un mecanismo intracrino, las HMW-FGF2 poseen un rol mitogénico que confiere a los fibroblastos NIH-3T3 un crecimiento independiente de anclaje (Wang *et al.* 2015; Delrieu 2000). Además, *Piotrowicz y colaboradores* describieron que, tanto la isoforma liviana como la de 24 kDa, tendrían efectos mitogénicos en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Piotrowicz *et al.* 1999).

En estudios con pacientes oncológicos, múltiples trabajos informan que los niveles de FGF2 en circulación son significativamente más elevados respecto a voluntarios sanos o pacientes con enfermedades benignas (Le Page *et al.* 2006; Zimering *et al.* 1993; Gazzaniga *et al.* 1999; Horstmann *et al.* 2005; George *et al.* 2002). Sin embargo, en pacientes con cáncer de mama, la bibliografía es escasa y algo contradictoria. Mientras que *Yiangou y colaboradores* asocian los niveles elevados de FGF2 con tumores de mejor pronóstico (Yiangou *et al.* 1997), estudios más recientes en los que se analizó el fluido del pezón y la leche de mujeres embarazadas o en período de lactancia con cáncer de mama, informaron que los mismos contienen niveles elevados de FGF2 con relación a mujeres sanas (Sartippour *et al.* 2005; Arcaro *et al.* 2012). En este trabajo de Tesis no detectamos diferencias en la concentración de FGF2 en el suero de animales portadores de tumores de la familia C4 ni entre sí ni respecto de

sueros de ratones control (sin tumor). Cabe destacar que los niveles de FGF2 detectados se encontraron muy cerca del límite inferior de detección. Si bien estos resultados son preliminares, indican que las diferencias en la expresión de FGF2 halladas en muestras tumorales y en células epiteliales en cultivo no se traducen en mayor cantidad de FGF2 sérico, lo que sugiere una acción local de FGF2 tumoral por activación paracrina, autocrina o intracrina y no endocrina.

Por otra parte, los niveles de expresión de FGF2 en la línea -YA-22,5 kDa son tan elevados que se detectan fácilmente en el suero de ratones portadores de estos xenotrasplantes y son significativamente mayores respecto al suero de animales portadores de las otras dos líneas tumorales. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en los niveles de FGF2 sérico de ratones con xenotrasplantes -YA-18 kDa respecto de los -YA-Vacío. Creemos que esto puede deberse a que estos ratones presentan una menor carga tumoral, tanto en cuanto al tumor primario como a las metástasis, respecto de los -YA-22,5 kDa. Aún no hemos determinado la isoforma que se encuentra en circulación, aunque los ensayos con medios condicionados sugieren que sería principalmente la isoforma liviana. El FGF2 sistémico liberado por tumores -YA-22,5 kDa no afectó la tasa de crecimiento de la línea tumoral -YA-Vacío que crece en el flanco inguinal opuesto, lo que sugiere que el efecto proliferativo de FGF2 es local y no endocrino.

Expresión de isoformas de FGF2 y resistencia

Nuestros resultados demuestran que las variantes resistentes de un modelo murino y humano expresan mayores niveles de HMW-FGF2 respecto a las variantes sensibles y que la sobreexpresión de las isoformas de 18 y 22,5 kDa de FGF2 induce resistencia endocrina en una línea celular humana originalmente sensible.

Algunos trabajos relacionan la expresión de FGF2 con resistencia a la quimioterapia y a inhibidores de EGFR en cáncer de ovario y pulmón, respectivamente (Lin *et al.* 2003b; Lin *et al.* 2003a; Terai *et al.* 2013). Con respecto al cáncer de mama, Turner y colaboradores describen que, en una línea celular que expresa RE y es sensible a antiestrógenos, el agregado de FGF2 al medio de cultivo revierte su sensibilidad endocrina (Turner *et al.* 2010b). El mismo grupo sugiere que existiría un *loop* autocrino de FGF2 responsable de la resistencia hormonal, particularmente a tamoxifeno. Como mencionamos anteriormente, la mayoría de los trabajos que estudian el rol de FGF2 en la resistencia no discrimina entre isoformas y sólo encontramos cuatro publicaciones que relacionan la resistencia con la expresión de isoformas pesadas. Ader y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de la isoforma de 24 kDa de FGF2 en células HeLa induce resistencia a la radiación (Ader *et al.* 2002). Otros trabajos relacionaron la

expresión de HMW-FGF2 con la resistencia a la quimioterapia en células derivadas de retinoblastoma (Dini *et al.* 2002; Cebulla *et al.* 2008). Recientemente, un trabajo de Li y colaboradores asoció por primera vez a las isoformas pesadas con la resistencia a la quimioterapia en líneas celulares de cáncer de mama (Li *et al.* 2015). Nuestros resultados serían la primera evidencia de resistencia endocrina por expresión de HMW-FGF en cáncer de mama. Proponemos que el patrón de bandas de FGF2 y los niveles de activación de la vía podrían servir como biomarcadores para discernir entre los pacientes que se podrían beneficiar con el tratamiento endocrino de aquellos que no obtendrían ventajas.

Por otro lado, observamos que ambas isoformas (18 y 22,5 kDa) otorgan resistencia no sólo a MFP sino, también, al acetato de telapristona y a tamoxifeno en cultivo. Esto sugiere que la sobreexpresión de estas isoformas activa señales proliferativas independientes de RE y RP o que modifican su señalización. Esto coincide con resultados previos del laboratorio en donde se observó que, en el modelo murino, los tumores resistentes a MFP son también resistentes al tamoxifeno (Wargon *et al.* 2008). Además, se ha descrito que la línea -YB es resistente a tamoxifeno y a fulvestrant (Sartorius *et al.* 2003); (Wu *et al.* 2004). Cabe aclarar que las concentraciones utilizadas de las drogas en cultivo (10^{-7} M) son compatibles con mecanismos mediados por los RH (Lanari *et al.* 2012).

En cuanto a los ensayos *in vivo*, observamos que el tratamiento con MFP disminuye el tamaño tumoral de los xenotrasplantes -YA-Vacío y no altera el crecimiento de -YA-18 ni de -YA-22,5 kDa, aunque se observa, en todos los casos, un aumento del componente estromal. Este efecto ha sido descrito por nuestro laboratorio en tumores que regresionan luego del tratamiento con antiprogéstágenos (Vanzulli *et al.* 2002; Wargon *et al.* 2008; Polo *et al.* 2015). Sin embargo, el remodelado del estroma no siempre se asocia a regresión tumoral, sino que es un efecto propio de los tejidos del huésped en respuesta a la MFP (Sequeira *et al.* 2014).

Mecanismos involucrados en la resistencia endocrina por FGF2

Los tumores sensibles a antiprogéstágenos expresan mayores niveles de RPA respecto de RPB y los tumores resistentes presentan la relación inversa (Wargon *et al.* 2015). Por esto, analizamos los niveles de expresión de los RPA en las líneas generadas y corroboramos que la sobreexpresión de las isoformas de FGF2 no los afectó. Sin embargo, en la línea celular T47D-YA y sus derivadas, no se pueden evaluar los niveles de RPB porque no la expresan. Recientemente validamos que el fenómeno de resistencia endocrina conferido por la sobreexpresión de isoformas de FGF2 se observa también en la línea de cáncer de mama IBH6-PR-A (Tesina de la Lic. Fuentes, 2015) y en la línea T47D -WT, que no tiene expresión

artificial de los RP (Tesis de la Lic. Figueroa, en curso). Además, en ensayos preliminares, detectamos que la resistencia podría explicarse por la disminución en los niveles de RP, predominantemente de la isoforma A (no se ilustra), lo que alteraría la relación de isoformas hacia una mayor proporción de isoforma B que A.

En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos un entrecruzamiento entre las vías de RP y de FGF2 (Cerliani *et al.* 2011). Asimismo, se ha demostrado que los niveles de ARNm de FGF2 tienen una variación cíclica en el endometrio normal, lo que sugiere que los niveles del transcrito podrían estar regulados por esteroides sexuales (Nakamura *et al.* 1999). Sin embargo, poco se sabe acerca de la regulación de la expresión de FGF2 por hormonas esteroideas en tejido maligno. Algunos grupos de investigación que estudian los efectos neuroprotectores de la progesterona, asocian la vía de los RP con FGF2 (Wyse Jackson *et al.* 2016). Como mencionamos anteriormente, el análisis del promotor de FGF2 indica que contiene un sitio PRE (citado en (Bhurke *et al.* 2016) por lo que los RP podrían regular la expresión del factor de crecimiento. Por otra parte, se ha descrito una secuencia FRE en el promotor de la proteína ósea BSP (por sus siglas en inglés, *Bone Sialoprotein*) donde se une el FGF2 y modula su expresión (Zhou & Ogata 2013). Esta secuencia de 8 nucleótidos, con excepción de una base, también se encuentra presente en el promotor de la isoforma B de RP. Además, ensayos preliminares de nuestro laboratorio indican que el MPA induciría la expresión de FGF2, tanto en cultivo (en la línea celular T47D-WT) como *in vivo* (en suero de ratones). En su conjunto, estas evidencias sugieren que existiría la posibilidad de una regulación genómica cruzada entre ambas vías.

Nuestros resultados sugieren que el HMW-FGF2 no sólo confiere resistencia hormonal a la línea T47D-YA 22,5 kDa, sino que, al menos en cultivo, las antihormonas estimulan su proliferación celular. Sobre la base de resultados previos del laboratorio y de los resultados expuestos en este trabajo de Tesis, proponemos un modelo que explicaría el rol de FGF2 en la resistencia endocrina. Nuestro próximo objetivo será descifrar los mecanismos moleculares implicados en este proceso.

Proponemos que, en las variantes sensibles, predomina un mecanismo de señalización clásico a través de los FGFR de membrana mientras que, en las variantes resistentes, éste sería preferentemente intracrina.

Clásico, a través de los FGFR de membrana: en la variante sensible T47D-YA, el LMW-FGF2 liberado al espacio extracelular se une a los receptores de membrana que, por un lado, activan la señal río abajo y además, forman un complejo de transcripción que incluye a

RPA, STAT5, FGFR2 y co-activadores como SMRT (Cerliani *et al.* 2011; Wargon *et al.* 2015). El complejo se une a sitios PRE en el ADN y promueve la proliferación celular. En presencia de inhibidores de FGFR y antiprogéstágenos se inhibe esta señal proliferativa.

Intracrino, independiente de los FGFR de membrana: en la variante resistente T47D-YA-22,5 que expresa altos niveles de LMW- y HMW-FGF2, proponemos que la isoforma liviana actuaría de la manera clásica y que las isoformas pesadas actuarían a nivel nuclear, involucrando a los FGFR. Proponemos alternativas posibles en donde las HMW-FGF2:

a) cambian la conformación del complejo pre-existente RPA-MFP-FGFR, impiden la asociación del co-activador SMRT y permiten el reclutamiento del co-represor AIB1 en sitios PRE. Como resultado de esta interacción aumenta la proliferación celular aún en presencia de MFP.

b) se asocian directamente a proteínas nucleares con las que forman complejos transcripcionales que se unen al ADN en sitios FRE (Van den *et al.* 2000; Zhou & Ogata 2013). Como resultado, aumenta la proliferación celular independientemente de la presencia del complejo nuclear RPA-MFP-FGFR. El complejo formado por HMW-FGF2 podría también interferir con la formación del complejo RPA-MFP-FGFR. Ambas situaciones conducirían a la proliferación celular aún en presencia de MFP.

Mecanismo de señalización celular por la vía de FGF2/FGFR

La localización subcelular de FGF2 es clave para su función biológica (Wiedlocha *et al.* 1994) y algunos autores advierten que la localización de FGF2 podría utilizarse como biomarcador pronóstico en cáncer. La acumulación de FGF2 en el núcleo celular de tumores astrocíticos se asocia a una menor supervivencia de los pacientes (Fukui *et al.* 2003).

Nosotros observamos una abundante expresión de FGF2 en las células epiteliales tumorales en las variantes resistentes con respecto a las variantes sensibles. Por otra parte, entre los tumores resistentes del modelo murino encontramos diferencias con respecto a su liberación al espacio extracelular y la respuesta al agregado exógeno de LMW-FGF2. La línea resistente humana -YB libera mayor cantidad de FGF2 al medio condicionado (similar al tumor C4-2-HI resistente constitutivo) y su proliferación celular no está afectada por el agregado exógeno de LMW-FGF2 (similar al tumor C4-HIR resistente adquirido).

En conjunto, estos resultados indican que los tumores resistentes difieren en la señalización de FGF2, lo que sugiere la existencia de diferentes mecanismos de resistencia. Las isoformas pesadas se caracterizan por señalizar a través de un *loop* intracrino (Quarto *et al.* 2005) y la isoforma liviana, que es la que clásicamente se secreta, actúa a través de los

receptores de membrana en un *loop* autocrino (Kinoshita & Shimokado 1999). En los tumores sensibles, como ya fue publicado por nuestro laboratorio, el FGF2 liberado por los fibroblastos estromales activa los receptores de membrana de las células tumorales epiteliales y constituye una señal paracrina (Giulianelli *et al.* 2008; Cerliani *et al.* 2011). Esta señalización involucra a los RP que gatillan señales proliferativas y así se explicaría de qué modo estos tumores, que originalmente eran progestágeno dependientes para su crecimiento, comienzan a crecer en ausencia de hormona y aun así son sensibles a la terapia bloqueante de los RP. Por otro lado, proponemos que, en otros tumores que han adquirido la capacidad de crecer en forma autónoma, como es el caso del tumor C4-2-HI, las propias células tumorales epiteliales liberarían el FGF2 que activaría los receptores de membrana y gatillarían señales proliferativas de forma autocrina. El FGF2 extracelular podría incidir en otros tipos celulares por lo que, en este tipo de tumores, el factor de crecimiento podría actuar también de forma paracrina induciendo, por ejemplo, la angiogénesis. De hecho, los tumores C4-2-HI son más hemorrágicos y presentan mayor marca para CD31, un marcador de vasos sanguíneos y linfáticos, que los tumores C4-HI (no se ilustra). En el caso de los tumores resistentes adquiridos, postulamos que, al poseer niveles elevados de FGF2 intracelulares, estos tumores cuentan con un *loop* intracrino que induce la proliferación celular de forma constitutiva, independientemente de la activación de los receptores en membrana. Sería interesante discriminar el peso molecular de las isoformas liberadas de las isoformas almacenadas dentro de la célula para así corroborar nuestro modelo de señalización diferencial entre variantes tumorales.

Las diferencias observadas entre los tumores resistentes constitutivos y adquiridos podrían estar relacionadas con su origen. Como se describió en *Materiales y Métodos*, los tumores con resistencia adquirida se generaron por presión selectiva en presencia de MFP. Algunos autores señalan que la presencia prolongada de un agente de selección (MFP en el caso del modelo murino y en pacientes de mama, tamoxifeno) opera, de la misma manera que en la evolución, seleccionando las variantes capaces de sobrevivir (Landau *et al.* 2015)

En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que los tumores resistentes tienen silenciada la expresión de la isoforma A de RP por hipermetilación de su promotor (Wargon *et al.* 2011). Esto nos lleva a hipotetizar que la activación de la vía de FGF2 promovería la metilación de RPA e induciría resistencia a los antiprogestágenos. Como hipótesis alternativa, un desbalance en las isoformas de RP hacia una mayor proporción de RPB, podría conducir a la síntesis de FGF2. El hecho de que, en la línea celular humana T47D-YB que expresa sólo RPB, observamos un aumento de FGF2 total sugiere que la segunda hipótesis sería la correcta.

Expresión y localización de FGFR1 y FGFR2

Como mencionamos en *Introducción*, el FGF2 señala a través de cuatro FGFR generalmente localizados en la membrana celular. Estudiamos los FGFR1 y FGFR2 ya que se ha determinado que aproximadamente el 14 y 11% de los carcinomas mamarios tienen amplificaciones en estos genes (Adnane *et al.* 1991; Shi *et al.* 2015). Además, el FGF2 posee más afinidad por el FGFR1 que por cualquiera de los demás receptores (Ibrahimi *et al.* 2004b) y teníamos evidencias de la interacción de FGFR2 y los RP en la línea T47D-WT en presencia de LMW-FGF2 (Cerliani *et al.* 2011).

Observamos que tanto en las familias C4 y 59 del modelo murino como en el modelo humano, las variantes resistentes expresan mayores niveles de FGFR1 respecto de las variantes sensibles. En cáncer de mama, se ha asociado la sobreexpresión por amplificación del FGFR1 a recurrencia temprana y peor pronóstico (Elbauomy *et al.* 2007; Turner *et al.* 2010b). Además, Turner y colaboradores asociaron los niveles de FGFR1 con la resistencia endocrina, ya que muestran una activación constitutiva de la vía en ausencia del ligando. Otros trabajos asocian un aumento en la expresión de FGFR1 como consecuencia de elevados niveles de ligando (Du *et al.* 2016). Postulamos entonces, que el aumento en los niveles de FGFR1 de las variantes resistentes podría deberse a la regulación positiva de la vía en respuesta a los elevados niveles de FGF2. Como aún no hemos realizado estudios genómicos, no es posible excluir la posibilidad de que la mayor expresión del receptor se deba a una amplificación génica (Gelsi-Boyer *et al.* 2005).

Sin embargo, para la familia C7 el aumento de FGFR1 no es significativo ya que, si bien las variantes resistentes expresan elevados niveles del receptor, la variante sensible (C7-2-HI) también presenta niveles basales altos. Si tenemos en cuenta que elevados niveles de FGFR1 nuclear se asocian a una mayor capacidad migratoria y metástasis en células de cáncer de páncreas (Coleman *et al.* 2014) y de mama (Chioni & Grose 2012), podríamos especular que los elevados niveles del receptor podrían estar asociados a la alta capacidad metastásica de esta familia de tumores.

Con respecto a FGFR2, observamos que la mayoría de las variantes tumorales resistentes presenta una localización nuclear del receptor respecto de las variantes sensibles. Además, en el análisis de las líneas celulares humanas, si bien detectamos células positivas, tanto en el citoplasma como en el núcleo de ambas variantes, la marcación para FGFR2 fue más intensa y nuclear en la línea resistente. Tal como sucede con el FGFR1, el FGFR2 nuclear funciona como regulador transcripcional que activa una variedad de programas génicos

relacionados con la proliferación y diferenciación celular (Stachowiak *et al.* 2007). Por trabajos previos de nuestro laboratorio, sabíamos que un pulso de MPA o FGF2 promueve la localización nuclear de los RP junto con FGFR2, estimulando la proliferación, tanto en tumores C4-HI como en la línea T47D-WT (Cerliani *et al.* 2011) La localización nuclear del FGFR2, observada en las variantes resistentes (tanto del modelo murino como del humano), indica una activación basal, tal vez debido a que elevados niveles de FGF2 señalizan de forma constitutiva.

Activación de vías downstream de FGFR

Como se mencionó en *Introducción*, las vías *downstream* de los FGFR de membrana involucran principalmente a la proteína adaptadora FRS2 que se fosforila luego de la activación de los receptores y señala a través de dos vías principales: AKT y ERK (Dailey *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2013a). Utilizamos las líneas sensibles y resistentes del modelo T47D para comparar la activación basal e inducida por LMW-FGF2.

Observamos que la línea resistente presenta mayores niveles de FRS2 y pFRS2 respecto de las líneas sensibles. Sin embargo, al relativizar pFRS2/FRS2, esta diferencia se pierde, lo que indica que no hay un aumento en la cantidad de sitios fosforilados por molécula de FRS2. La relevancia de este dato es discutible, pero lo cierto es que cada célula posee un número absoluto mayor de pFRS2 que las células sensibles, lo que implica una mayor activación basal de la vía en la línea resistente. Nuestros resultados también indican que la activación de la vía es a nivel de los receptores y de la proteína adaptadora y no de una proteína río abajo. Zhang y colaboradores informaron que la expresión de FRS2 y FGFR está aumentada en liposarcomas de alto grado y que se debería a amplificaciones génicas que contribuirían a la progresión de la enfermedad (Dailey *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2013b). Hasta la fecha no hay trabajos que evalúen los niveles de FRS2 y su activación en muestras de carcinomas mamarios humanos.

Medimos la activación de AKT indirectamente a través de pS6. Los resultados preliminares, tanto para pS6 como para pAKT y AKT2, sugieren que esta vía se encontraría basalmente activada en las variantes resistentes respecto de las sensibles. La vía de AKT se encuentra frecuentemente desregulada en cáncer (Arboleda *et al.* 2003; Riggio *et al.* 2012) y los niveles elevados de FGF2 se correlacionan con la activación de esta vía (Ruotsalainen *et al.* 2002). Proyectamos repetir los ensayos de *Western blot* para corroborar o refutar nuestras observaciones.

Por otro lado, no observamos diferencias significativas en la fosforilación basal de ERK en la variante resistente respecto de las variantes sensibles, aunque el pulso de LMW-FGF2 indujo un aumento significativo en la activación de esta vía. Si bien falta la confirmación con ensayos adicionales, el agregado del factor de crecimiento sólo parece inducir un aumento en la expresión de pFRS2 y pS6 en las líneas -WT e -YA. Nuestros hallazgos indican que, si bien la línea resistente tiene las vías basalmente activas, la vía de ERK no estaría saturada. Además, los ensayos preliminares sugieren que la línea -YB posee una activación basal de PKC α respecto de las líneas sensibles. Los niveles elevados de esta proteína ya han sido asociados con resistencia a tamoxifeno, tanto en líneas celulares como en biopsias de pacientes con cáncer de mama (Assender *et al.* 2007).

Bloqueo de la vía de FGFR

Inhibidores *in vitro*:

En esta Tesis utilizamos dos inhibidores comerciales con diferente selectividad por FGFR: BGJ398 y PD173074. El primero de ellos es un inhibidor específico de FGFR, particularmente de FGFR1, 2 y 3 y tiene un IC₅₀ 40 veces superior para FGFR4 y VEGFR2 (Guagnano *et al.* 2011). Por su parte, PD173074 bloquea principalmente a FGFR1 con alta afinidad (IC₅₀ de 25 nM; (Mohammadi *et al.* 1998), aunque a mayores concentraciones también inhibe la activación de FGFR2 (Pardo *et al.* 2009), FGFR3 (Trudel *et al.* 2004) y miembros de la familia de VEGFR, demostrando desventajas respecto a BGJ398 (Mohammadi *et al.* 1998). Ambos bloqueantes han probado ser efectivos en estudios de inhibición de FGFR (Cerliani *et al.* 2011; Nam & Parang 2003). En este trabajo utilizamos concentraciones de BGJ398 cercanas al IC₅₀ reportadas (0,1-10 nM) e inferiores al IC₅₀ de VEGFR2. En cuanto al PD173074, respetamos las concentraciones utilizadas en el trabajo de Pardo y colaboradores (0,01-1 μ M).

Ambos bloqueantes de FGFR inhibieron la proliferación basal y la inducida por LMW-FGF2 de forma significativa en las tres variantes tumorales del modelo murino. Sin embargo, el inhibidor BGJ398 actuó a menores concentraciones que PD173074. Estas diferencias se asocian probablemente con la acción más potente y selectiva de BGJ398. Por otro lado, si bien la dosis de FGF2 utilizada en estos ensayos es alta (100 ng/ml), en algunos tumores también observamos efectos proliferativos con un orden de magnitud menor (10 ng/ml). Elegimos la dosis alta para apreciar el efecto de los inhibidores de forma más evidente.

BGJ398 y crecimiento tumoral:

El uso de BGJ398 *in vivo* no tuvo los efectos esperados de acuerdo a los resultados obtenidos en cultivo. El inhibidor logró disminuir parcialmente la tasa de crecimiento de la variante sensible (C4-HI) y de una variante resistente constitutiva (C7-HI), al tiempo que sólo promovió un mayor grado de diferenciación y un aumento en la cantidad de estroma en los otros tumores resistentes endocrinos (C4-HIR, C4-2-HI y un ensayo preliminar con 59-HI, que no se ilustra) y en xenotrasplantes resistentes -YB. Por trabajos previos de nuestro laboratorio, sabíamos que el tumor sensible (C4-HI) disminuía su crecimiento en respuesta al inhibidor PD173074 (Giulianelli *et al.* 2008), y esperábamos una mejor respuesta con el tratamiento con BGJ398 por ser más específico y efectivo en cultivo. Si bien probamos diferentes diagramas (18 mg/ml/día vs 30 mg/ml/día por medio) y formas de administración alternativas (oral vs ev), claramente los efectos sobre el crecimiento tumoral fueron pequeños (no se ilustra). Esto puede deberse a que, *in vivo*, BGJ398 no es un inhibidor efectivo de la vía, o que la vía que conduce la proliferación tumoral es la intracrina, independiente de los FGFR.

La bibliografía relativa a la efectividad de los inhibidores de FGFR *in vivo* es controvertida. Mientras que algunos trabajos documentan efectos inhibitorios del crecimiento tumoral (Konecny *et al.* 2013; Acquaviva *et al.* 2014), otros revelan efectos significativos sobre líneas celulares tumorales en cultivo, pero no encuentran efectos categóricos en modelos *in vivo* (St Bernard *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2013). Otras publicaciones demuestran una marcada heterogeneidad en la sensibilidad a inhibidores selectivos en cáncer (Lamont *et al.* 2011). No encontramos trabajos que utilicen el inhibidor *in vivo* en cáncer de mama, a excepción de *Wendt y colaboradores* que analizaron el efecto de BGJ398 en el número de focos metastásicos de la línea murina D2.A1 (Wendt *et al.* 2014). Los dos ensayos clínicos que evalúan la efectividad de la terapia con BGJ398 en pacientes con tumores de distinto origen y alteraciones en la vía FGF/FGFR continúan reclutando pacientes hasta la fecha. Habrá que esperar al menos dos años más para conocer los resultados del primero de los dos ensayos (clinicaltrials.gov; NCT01004224 y NCT02160041; ver *Introducción*). Nuestros resultados, junto con la bibliografía, ponen de manifiesto el desafío de identificar los subgrupos de pacientes que más podrían beneficiarse con la terapia dirigida a los FGFR.

BGJ398 y metástasis:

Dos publicaciones atribuyen a BGJ398 efectos inhibitorios sobre la diseminación metastásica (St Bernard *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2013);(Wendt *et al.* 2014). Dado que se observó que el inhibidor BGJ398 tiene un efecto preponderantemente citostático más que

citotóxico, la respuesta clínica ante el bloqueante de FGFR puede no asociarse a la regresión tumoral sino a una disminución en la capacidad metastásica del tumor (St Bernard *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2013). En línea con esto, al utilizar un modelo metastásico, observamos que BGJ398 redujo el número de metástasis pulmonares (aunque la cantidad de ratones utilizados no fue suficiente para determinar la significancia del inhibidor solo pero, al combinarlo con la MFP, el efecto se hizo evidente).

BGJ398 y diferenciación tumoral:

A partir del análisis histológico de los tumores del modelo murino podemos concluir que, si bien cada variante tumoral es única, como sucede con los tumores en la clínica, los tumores resistentes se caracterizan por ser moderadamente diferenciados o indiferenciados, con mayor grado histológico y peor pronóstico. Por contraposición, los tumores sensibles tienden a ser más diferenciados y en general, cuentan con un componente estromal más abundante. De manera similar, detectamos signos de diferenciación y aumento del estroma tumoral en los tumores tratados con BGJ398 respecto de los tumores sin tratar. En conjunto, nuestras observaciones sugieren que la vía de FGFR estaría asociada, de forma directa o indirecta, al grado de diferenciación tumoral. Los pacientes con tumores de mama de alto grado tienen mayor frecuencia de metástasis ganglionar y desarrollan más recurrencias sistémicas (Theissig *et al.* 1990). Por lo tanto, proponemos que el bloqueo de la vía de FGFR podría reducir el grado tumoral y tal vez, sensibilizar el tumor a otros inhibidores.

Sobreexpresión de isoformas de FGF2 en la línea T47D-YA

Así como otros autores (Valtink *et al.* 2012; Sheikh *et al.* 2001), describimos que, en todos los casos, las líneas generadas sobreexpresan la isoforma de FGF2 esperada junto con isoformas de menor peso molecular. Probablemente esto se deba a que el FGF2 induce la expresión de su propia proteína y que las isoformas se regulan por traducción alternativa a partir de un mismo mensajero (Prats *et al.* 1989; Vagner *et al.* 1996). Además, se ha descrito la autorregulación de FGF2, donde el agregado de FGF2 aumenta la cantidad de ARNm de FGF2 (Weich *et al.* 1991).

Liberación de FGF2 al medio condicionado:

La sobreexpresión de las isoformas nos permitió evaluar su liberación al medio condicionado. Corroboramos que la isoforma predominante que se libera al medio condicionado es la variante liviana y que ésta se libera casi completamente fuera de la célula, aún en las líneas que sobreexpresan las isoformas pesadas. Esto se corresponde con lo documentado en publicaciones (Sorensen *et al.* 2006). Llamativamente, también detectamos una banda tenue correspondiente a HMW-FGF2 en el medio condicionado proveniente de la línea que sobreexpresa la isoforma de 22,5 kDa, lo que sugiere que las isoformas pesadas podrían actuar también por mecanismos autocrinos y paracrinos, además de intracrinos. En la bibliografía, muy pocos trabajos describen la liberación de las isoformas pesadas fuera de la célula (Taverna *et al.* 2003; Gruber *et al.* 1999). En nuestro modelo, su detección fue favorecida probablemente por la expresión exacerbada de HMW-FGF2.

Crecimiento *in vivo*:

Escasas publicaciones documentan el crecimiento *in vivo* de la línea T47D y sus derivadas (Sartorius *et al.* 2003; Liang *et al.* 2007). En todas estas publicaciones se informa una baja tasa de crecimiento y la necesidad de colocar un *pellet* de estradiol en los ratones para favorecer la toma tumoral. En nuestro laboratorio hemos logrado hacer crecer estos xenotrasplantes en ratones NSG, que tienen un sistema inmune deficiente y con el tratamiento previo con estradiol (Cerliani *et al.* 2011; Sequeira *et al.* 2014; Wargon *et al.* 2015). El tamaño final de los tumores es siempre bastante pequeño con relación a los modelos murinos y a otras líneas celulares humanas (IBH-6, MDA, MCF7, entre otras). En los ensayos expuestos en este trabajo de Tesis, observamos que, luego de dos meses de crecimiento, la línea -YA-22,5 kDa generó tumores de mayor tamaño y peso que la línea -YA-Vacío y los tumores -YA-18 kDa presentaron un tamaño y peso intermedio. Dado que ambas líneas expresan la isoforma de 18 kDa, no podemos excluir la posibilidad de que el rol proliferativo se deba a esta isoforma. Sin embargo, el hecho de que los xenotrasplantes -YA-22,5 kDa alcanzaron un tamaño significativamente mayor al de las demás líneas celulares explica el rol preponderante de la HMW-FGF2 en la proliferación.

Sugestivamente, observamos que los xenotrasplantes no solo crecen en ausencia de estradiol, sino que alcanzan tamaños mayores respecto a aquellos que crecen en presencia de la hormona, lo que indica el efecto inhibitorio del estradiol. El rol de los estrógenos en cáncer de

mama es aún controvertido y recientemente, en modelos experimentales con sobreexpresión de PKC α , *Jordan y colaboradores* explicaron que los estrógenos son inhibitorios del crecimiento tumoral (Jordan 2014). En virtud de esto y de que la activación de PKC α está asociada a la resistencia a tamoxifeno (*Assender et al.* 2007), planeamos evaluar los niveles de esta proteína en las líneas celulares generadas.

Invasión y metástasis:

El estudio de la histología y el grado tumoral y nuclear de los tumores primarios permite, en la clínica, clasificarlos según su estadio. El análisis histopatológico de los xenotrasplantes reveló que los tumores que sobreexpresan la isoforma de 22,5 kDa presentaron signos compatibles con tumores más agresivos e invasivos respecto de los tumores que sobreexpresan la isoforma de 18 kDa. Además, los xenotrasplantes -YA-22,5 kDa presentaron células con macronúcleos y otras, multinucleadas. En consonancia con esto, otros grupos de investigación describieron que la sobreexpresión de las HMW-FGF2 en diversas líneas celulares promovió la aparición de células multinucleadas (*Quarto et al.* 1991; *Nindl et al.* 2004). Aunque, a nivel histopatológico, los macronúcleos podrían considerarse células poliploides con mitosis anómalas que causarían la muerte celular, también existen evidencias que sugieren que estas células pueden sobrevivir y adquirir modificaciones que les confieren resistencia a la terapia (*Badtke et al.* 2012; *Gascoigne & Taylor* 2008).

Una de las funciones celulares características de FGF2 es la angiogénesis (*Bian et al.* 2000) y si bien no fue cuantificada, los xenotrasplantes -YA-22,5 kDa se caracterizaron por poseer una gran vascularización y eritrocitos libres. Esto sugiere neo-angiogénesis exacerbada y vasos tortuosos no completamente funcionales, que serían consecuencia de los niveles elevados de FGF2 (*Yamazaki et al.* 1997; *Tabara et al.* 2001). La angiogénesis observada podría ser determinante para la diseminación metastásica posterior, que mencionaremos más adelante.

El fenotipo invasivo de los xenotrasplantes -YA-22,5 kDa se tradujo en un mayor número de metástasis pulmonares (de más de 10 células) respecto a las demás líneas celulares. Nuestros resultados sugieren que la isoforma de 18 kDa tiene menor injerencia en la capacidad invasiva propia de los tumores, mientras que las isoformas HMW-FGF2, o al menos la de 22,5 kDa, conferiría un fenotipo más metastásico.

Varios estudios asocian los niveles elevados de FGF2 intratumorales a un peor pronóstico, recurrencia temprana, mayor agresividad y metástasis (*George et al.* 2002; *Horstmann et al.* 2005; *Cuevas et al.* 2013). En general, se considera que, en cultivo, la isoforma

de 18 kDa tiene efecto migratorio (Garmy-Susini *et al.* 2004) y que las isoformas pesadas inducen la proliferación celular (Quarto *et al.* 1991). Las publicaciones respecto del rol migratorio/invasivo de LMW-FGF2 *in vivo* son escasas y solo una publicación plantea que la inoculación intratumoral de la isoforma liviana produce un aumento en el crecimiento tumoral y en el número de metástasis en el modelo 4T1. Los autores de esta publicación atribuyen un rol inflamatorio y angiogénico al factor de crecimiento (Tsunoda *et al.* 2009). Hasta el momento, nuestros resultados no permitirían asociar la expresión de la isoforma liviana con el rol invasivo, aunque estas funciones podrían estar reguladas por un balance de isoformas pesadas y livianas (Quarto *et al.* 2005a). Por otro lado, el grupo de la *Dra. Jouanneau* es el único que demuestra el aumento de las metástasis pulmonares por sobreexpresión de la isoforma de 24 kDa de FGF2 en un modelo de cáncer de vejiga (Okada-Ban *et al.* 1999). Los autores proponen que esta isoforma estimula las metástasis a través de un mecanismo intracrino al aumentar la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Thomas-Mudge *et al.* 2004).

A pesar de haber obtenido un fenotipo más agresivo con la sobreexpresión de la isoforma de 22,5 kDa, nos llamó la atención que hubiera focos metastásicos en los animales portadores del tumor T47D-YA-Vacío. En la bibliografía, ninguno de los tres trabajos publicados que realizan ensayos *in vivo* con la línea T47D-YA parental, estudia o informa la presencia de metástasis pulmonares (Sartorius *et al.* 2003; Sequeira *et al.* 2014; Wargon *et al.* 2015). Con el objetivo de determinar si la línea parental T47D-YA era metastásica en las mismas condiciones experimentales, realizamos un ensayo preliminar y observamos que luego de 60 días, los ratones portadores de xenotrasplantes -YA también presentaron focos metastásicos. Cabe aclarar que se observó un menor número de focos y de menor tamaño que los de la línea -YA-Vacío. Creemos que el fenotipo más agresivo en la línea T47D-YA-Vacío está asociado al proceso de selección luego de la infección con el plásmido control en donde, evidentemente, se seleccionaron clones más agresivos que la línea que les dio origen.

Metástasis y tratamiento endocrino

Por último, observamos que la terapia endocrina afectaría la diseminación metastásica, ya que existe una tendencia a la reducción de la cantidad de focos en los tumores -YA-Vacío e -YA-18 kDa y un aumento en los tumores -YA-22,5 kDa. Vale aclarar que los ensayos de metástasis demandan muchos animales y por lo tanto, sería necesario aumentar el número de ratones para establecer si las tendencias observadas en la incidencia de la diseminación metastásica son significativas. De todos modos, los resultados obtenidos sugieren que los

elevados niveles de FGF2 tumorales o sistémicos podrían afectar la diseminación metastásica *per se* y de este modo, determinar la respuesta de la terapia endocrina.

Estos resultados adquieren mayor relevancia si tenemos en cuenta que el tratamiento con MFP en la variante resistente C7-HI, con mayor expresión de HMW-FGF2, también induce un aumento en el número de metástasis pulmonares. En conjunto, nuestros resultados sugieren que algunos pacientes RH (+) podrían no beneficiarse con el tratamiento endócrino e, incluso, el tratamiento podría resultarles perjudicial.

RESUMEN DE RESULTADOS

- En modelos murinos y humanos de cáncer de mama, la expresión de isoformas de FGF2, particularmente HMW-FGF2, estarían asociadas a la resistencia endocrina. Esto estaría acompañado de una mayor expresión de FGFR1 y un aumento en la localización nuclear de FGFR2.
- La variante resistente T47D-YB: **1)** libera mayores cantidades de FGF2 al medio condicionado, **2)** no aumenta la proliferación celular con el agregado exógeno de LMW-FGF2 y **3)** presenta una vía de FGF2 activa a través de FRS2 y AKT, lo que sugiere un mecanismo constitutivo de señalización autocrina/intracrina.
- En los modelos murinos y humanos, el bloqueo de los FGFR inhibe la proliferación celular en cultivo de todas las variantes tumorales mientras que *in vivo*, el BGJ398 no induce, o induce pequeños cambios en el crecimiento tumoral acompañados de una remodelación estromal y signos de diferenciación. Esto sugiere la necesidad de desarrollar inhibidores más efectivos para ser utilizados *in vivo*. Sin embargo, el tratamiento combinado de BGJ398 + MFP, en tumores murinos metastásicos (C7-HI), disminuye el % de ratones con metástasis con respecto al grupo de MFP solo.
- La sobreexpresión de las isoformas de 18 kDa y 22,5 kDa de FGF2 inducen una mayor proliferación celular y resistencia endocrina en la línea T47D-YA, mientras que sólo la isoforma de 22,5 kDa favorecería la diseminación metastásica.
- Resultados preliminares indican que la MFP inhibe y estimula la diseminación metastásica de las líneas -YA que sobreexpresan la isoforma de 18 y 22,5 kDa, respectivamente. Esto sugiere que las isoformas tienen mecanismos de acción diferentes y activan vías que se entrecruzan con la vía de los RP.

CONCLUSIÓN

En este trabajo demostramos la participación de las isoformas de FGF2 en la progresión tumoral mamaria, siendo la primera evidencia de una asociación entre la expresión de HMW-FGF2 y resistencia endocrina. Asimismo, los resultados sugieren un rol diferencial de la isoforma liviana respecto de la isoforma de 22,5 kDa que favorecería, no sólo la proliferación celular y la resistencia endocrina, sino también la diseminación metastásica.

Los datos sugieren que pacientes con cáncer de mama que expresan una menor proporción de PRA/PRB asociado a una elevada expresión de HMW-FGF2 serían resistentes a la terapia endocrina. La determinación de isoformas de FGF2 en los tumores mamarios podría, eventualmente, actuar como marcador de pronóstico con el fin de diseñar estrategias terapéuticas a la medida del paciente.

REFERENCIAS

- Abdel-Hafiz HA & Horwitz KB 2014 Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **140** 80-89.
- Acquaviva J, He S, Zhang C, Jimenez JP, Nagai M, Sang J, Sequeira M, Smith DL, Ogawa LS, Inoue T, Tatsuta N, Knowles MA, Bates RC & Proia DA 2014 FGFR3 translocations in bladder cancer: differential sensitivity to HSP90 inhibition based on drug metabolism. *Mol.Cancer Res.* **12** 1042-1054.
- Ader I, Muller C, Bonnet J, Favre G, Cohen-Jonathan E, Salles B & Toulas C 2002 The radioprotective effect of the 24 kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit. *Oncogene* **21** 6471-6479.
- Adnane J, Gaudray P, Dionne CA, Crumley G, Jaye M, Schlessinger J, Jeanteur P, Birnbaum D & Theillet C 1991 BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* **6** 659-663.
- Afhuppe W, Beekman JM, Otto C, Korr D, Hoffmann J, Fuhrmann U & Moller C 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.
- Alkner S, Bendahl PO, Grabau D, Lovgren K, Stal O, Ryden L & Ferno M 2010 AIB1 is a predictive factor for tamoxifen response in premenopausal women. *Ann.Oncol.* **21** 238-244.
- Amaya E, Musci TJ & Kirschner MW 1991 Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **66** 257-270.
- Anderson KN, Schwab RB & Martinez ME 2014 Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res.Treat.* **144** 1-10.
- Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, et al. 2008 Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am.J.Hum.Genet.* **82** 937-948.
- Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinnar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY & Slamon DJ 2003 Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res.* **63** 196-206.
- Arcaro KF, Browne EP, Qin W, Zhang K, Anderton DL & Sauter ER 2012 Differential expression of cancer-related proteins in paired breast milk samples from women with breast cancer. *J.Hum.Lact.* **28** 543-546.
- Arese M, Chen Y, Florkiewicz RZ, Gualandris A, Shen B & Rifkin DB 1999 Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol.Biol.Cell* **10** 1429-1444.
- Arnaud E, Touriol C, Boutonnet C, Gensac MC, Vagner S, Prats H & Prats AC 1999 A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol.Cell Biol.* **19** 505-514.
- Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK & Elledge RM 2005 Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J.Natl.Cancer Inst.* **97** 1254-1261.

Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK & Schiff R 2008 Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr.Rev.* **29** 217-233.

Ascherl G, Sgadari C, Bugarini R, Bogner J, Schatz O, Ensoli B & Sturzl M 2001 Serum concentrations of fibroblast growth factor 2 are increased in HIV type 1-infected patients and inversely related to survival probability. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **17** 1035-1039.

Assender JW, Gee JM, Lewis I, Ellis IO, Robertson JF & Nicholson RI 2007 Protein kinase C isoform expression as a predictor of disease outcome on endocrine therapy in breast cancer. *J.Clin.Pathol.* **60** 1216-1221.

Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR & Blye RP 2002 CDB-4124 and its putative monodemethylated metabolite, CDB-4453, are potent antiprogestins with reduced antiglucocorticoid activity: in vitro comparison to mifepristone and CDB-2914. *Mol.Cell Endocrinol.* **188** 111-123.

Bachelot T, Garcia-Saenz JA, Verma S, Gutierrez M, Pivot X, Kozloff MF, Prady C, Huang X, Khosravan R, Wang Z, Cesari R, Tassell V, Kern KA, Blay JY & Lluch A 2014 Sunitinib in combination with trastuzumab for the treatment of advanced breast cancer: activity and safety results from a phase II study. *BMC.Cancer* **14** 166.

Badtke MM, Jambal P, Dye WW, Spillman MA, Post MD, Horwitz KB & Jacobsen BM 2012 Unliganded progesterone receptors attenuate taxane-induced breast cancer cell death by modulating the spindle assembly checkpoint. *Breast Cancer Res.Treat.* **131** 75-87.

Bailly K, Soulet F, Leroy D, Amalric F & Bouche G 2000 Uncoupling of cell proliferation and differentiation activities of basic fibroblast growth factor. *FASEB J.* **14** 333-344.

Baldin V, Roman AM, Bosc-Bierne I, Amalric F & Bouche G 1990 Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO J.* **9** 1511-1517.

Barclay C, Li AW, Geldenhuys L, Baguma-Nibasheka M, Porter GA, Veugelers PJ, Murphy PR & Casson AG 2005 Basic fibroblast growth factor (FGF-2) overexpression is a risk factor for esophageal cancer recurrence and reduced survival, which is ameliorated by coexpression of the FGF-2 antisense gene. *Clin.Cancer Res.* **11** 7683-7691.

Beato M & Sanchez-Pacheco A 1996 Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr.Rev.* **17** 587-609.

Beck CA, Weigel NL, Moyer ML, Nordeen SK & Edwards DP 1993 The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90** 4441-4445.

Beral V 2003 Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **362** 419-427.

Bhurke AS, Bagchi IC & Bagchi MK 2016 Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. *Am.J.Reprod.Immunol.*

Bian XW, Du LL, Shi JQ, Cheng YS & Liu FX 2000 Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas. *Anal.Quant.Cytol.Histol.* **22** 267-274.

Brandhagen BN, Tieszen CR, Ulmer TM, Tracy MS, Goyeneche AA & Telleria CM 2013 Cytostasis and morphological changes induced by mifepristone in human metastatic cancer cells involve cytoskeletal filamentous actin reorganization and impairment of cell adhesion dynamics. *BMC.Cancer* **13** 35.

Brewster AM, Hortobagyi GN, Broglio KR, Kau SW, Santa-Maria CA, Arun B, Buzdar AU, Booser DJ, Valero V, Bondy M & Esteva FJ 2008 Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy. *J.Natl.Cancer Inst.* **100** 1179-1183.

Brodie AM & Njar VC 2000 Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment*. *Steroids* **65** 171-179.

Brueggemeier RW, Hackett JC & Diaz-Cruz ES 2005 Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr.Rev.* **26** 331-345.

Bugler B, Amalric F & Prats H 1991 Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol.Cell Biol.* **11** 573-577.

Byron SA, Gartside MG, Wellens CL, Mallon MA, Keenan JB, Powell MA, Goodfellow PJ & Pollock PM 2008 Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation. *Cancer Res.* **68** 6902-6907.

Carolin KA & Pass HA 2000 Prevention of breast cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **33** 221-238.

Cebulla CM, Jockovich ME, Pina Y, Boutrid H, Alegret A, Kulak A, Hackam AS, Bhattacharya SK, Feuer WJ & Murray TG 2008 Basic fibroblast growth factor impact on retinoblastoma progression and survival. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* **49** 5215-5221.

Cerliani JP, Guillardoy T, Giulianelli S, Vaque JP, Gutkind JS, Vanzulli SI, Martins R, Zeitlin E, Lamb CA & Lanari C 2011 Interaction between FGFR-2, STAT5, and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Cancer Res.* **71** 3720-3731.

Cerliani JP, Vanzulli SI, Pinero CP, Bottino MC, Sahores A, Nunez M, Varchetta R, Martins R, Zeitlin E, Hewitt SM, Molinolo AA, Lanari C & Lamb CA 2012 Associated expressions of FGFR-2 and FGFR-3: from mouse mammary gland physiology to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **133** 997-1008.

Check JH, Dix E, Cohen R, Check D & Wilson C 2010 Efficacy of the progesterone receptor antagonist mifepristone for palliative therapy of patients with a variety of advanced cancer types. *Anticancer Res.* **30** 623-628.

Cheng T, Roth B, Choi W, Black PC, Dinney C & McConkey DJ 2013 Fibroblast growth factor receptors-1 and -3 play distinct roles in the regulation of bladder cancer growth and metastasis: implications for therapeutic targeting. *PLoS.One.* **8** e57284.

Cheng Z, Ma R, Tan W & Zhang L 2014 MiR-152 suppresses the proliferation and invasion of NSCLC cells by inhibiting FGF2. *Exp.Mol.Med.* **46** e112.

Chioni AM & Grose R 2012 FGFR1 cleavage and nuclear translocation regulates breast cancer cell behavior. *J.Cell Biol.* **197** 801-817.

Chlebova K, Bryja V, Dvorak P, Kozubik A, Wilcox WR & Krejci P 2009 High molecular weight FGF2: the biology of a nuclear growth factor. *Cell Mol.Life Sci.* **66** 225-235.

Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, et al. 2003 Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* **289** 3243-3253.

Chook YM & Suel KE 2011 Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. *Biochim.Biophys.Acta* **1813** 1593-1606.

Ciarloni L, Mallepell S & Briskin C 2007 Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104** 5455-5460.

Cohen-Jonathan E, Toulas C, Monteil S, et al. 1997 Radioresistance induced by the high molecular forms of the basic fibroblast growth factor is associated with an increased G2 delay and a hyperphosphorylation of p34CDC2 in HeLa cells. *Cancer Res.* **57** 1364-1370.

Coleman SJ, Chioni AM, Ghallab M, Anderson RK, Lemoine NR, Kocher HM & Grose RP 2014 Nuclear translocation of FGFR1 and FGF2 in pancreatic stellate cells facilitates pancreatic cancer cell invasion. *EMBO Mol.Med.* **6** 467-481.

Colucci JK & Ortlund EA 2013 X-ray crystal structure of the ancestral 3-ketosteroid receptor-progesterone-mifepristone complex shows mifepristone bound at the coactivator binding interface. *PLoS.ONE.* **8** e80761.

Copson ER, Cutress RI, Maishman T, Eccles BK, Gerty S, Stanton L, Altman DG, Durcan L, Wong C, Simmonds PD, Jones L & Eccles DM 2015 Obesity and the outcome of young breast cancer patients in the UK: the POSH study. *Ann.Oncol.* **26** 101-112.

Couderc B, Prats H, Bayard F & Amalric F 1991 Potential oncogenic effects of basic fibroblast growth factor requires cooperation between CUG and AUG-initiated forms. *Cell Regul.* **2** 709-718.

Cowan CM, Quarto N, Warren SM, Salim A & Longaker MT 2003 Age-related changes in the biomolecular mechanisms of calvarial osteoblast biology affect fibroblast growth factor-2 signaling and osteogenesis. *J.Biol.Chem.* **278** 32005-32013.

Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, et al. 2009 Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106** 13820-13825.

Cuevas R, Korzeniewski N, Tolstov Y, Hohenfellner M & Duensing S 2013 FGF-2 disrupts mitotic stability in prostate cancer through the intracellular trafficking protein CEP57. *Cancer Res.* **73** 1400-1410.

Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A & Basilico C 2005 Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16** 233-247.

Dauvois S, White R & Parker MG 1993 The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci.* **106 (Pt 4)** 1377-1388.

Davis SR 1999 The therapeutic use of androgens in women. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **69** 177-184.

de Leeuw R, Neeffjes J & Michalides R 2011 A role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen. *Int.J.Breast Cancer* **2011** 232435.

DeGraffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, Donzis EJ, Middleton AK, Silva JM, Roth RA & Hidalgo M 2004 Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity. *Clin.Cancer Res.* **10** 8059-8067.

Delrieu I 2000 The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett.* **468** 6-10.

Delrieu I, Arnaud E, Ferjoux G, Bayard F & Faye JC 1998 Overexpression of the FGF-2 24-kDa isoform up-regulates IL-6 transcription in NIH-3T3 cells. *FEBS Lett.* **436** 17-22.

DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO & Jemal A 2015 International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **24** 1495-1506.

Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E & Cattini PA 2003 Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc.Res.* **57** 8-19.

Dini G, Funghini S, Witort E, Magnelli L, Fanti E, Rifkin DB & Del Rosso M 2002 Overexpression of the 18 kDa and 22/24 kDa FGF-2 isoforms results in differential drug resistance and amplification potential. *J.Cell Physiol* **193** 64-72.

Dittmer J & Leyh B 2015 The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. *Semin.Cancer Biol.* **31** 3-15.

Dono R, James D & Zeller R 1998a A GR-motif functions in nuclear accumulation of the large FGF-2 isoforms and interferes with mitogenic signalling. *Oncogene* **16** 2151-2158.

Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H & Zeller R 1998b Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J.* **17** 4213-4225.

Dowsett M, Johnston S, Martin LA, Salter J, Hills M, Detre S, Gutierrez MC, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK & Smith I 2005 Growth factor signalling and response to endocrine therapy: the Royal Marsden Experience. *Endocr.Relat Cancer* **12 Suppl 1** S113-S117.

Du E, Xiao L & Hurley MM 2016 FGFR Inhibitor Ameliorates Hypophosphatemia and Impaired Engrailed-1/Wnt Signaling in FGF2 High Molecular Weight Isoform Transgenic Mice. *J.Cell Biochem.*

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, et al. 2007 Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447** 1087-1093.

Egeblad M, Nakasone ES & Werb Z 2010 Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev.Cell* **18** 884-901.

Elbauomy ES, Green AR, Lambros MB, Turner NC, Grainge MJ, Powe D, Ellis IO & Reis-Filho JS 2007 FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis. *Breast Cancer Res.* **9** R23.

Eyler CE & Rich JN 2008 Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J.Clin.Oncol.* **26** 2839-2845.

Fannon M & Nugent MA 1996 Basic fibroblast growth factor binds its receptors, is internalized, and stimulates DNA synthesis in Balb/c3T3 cells in the absence of heparan sulfate. *J.Biol.Chem.* **271** 17949-17956.

Fei Y, Xiao L, Doetschman T, Coffin DJ & Hurley MM 2011 Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway. *J.Biol.Chem.* **286** 40575-40583.

Feng Y, Manka D, Wagner KU & Khan SA 2007 Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104** 14718-14723.

Florkiewicz RZ & Sommer A 1989 Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86** 3978-3981.

Fujimoto K, Ichimori Y, Kakizoe T, Okajima E, Sakamoto H, Sugimura T & Terada M 1991 Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **180** 386-392.

Fukui S, Nawashiro H, Otani N, Ooigawa H, Nomura N, Yano A, Miyazawa T, Ohnuki A, Tsuzuki N, Katoh H, Ishihara S & Shima K 2003 Nuclear accumulation of basic fibroblast growth factor in human astrocytic tumors. *Cancer* **97** 3061-3067.

Gamarra-Luques CD, Goyeneche AA, Hapon MB & Telleria CM 2012 Mifepristone prevents repopulation of ovarian cancer cells escaping cisplatin-paclitaxel therapy. *BMC.Cancer* **12** 200.

Gamarra-Luques CD, Hapon MB, Goyeneche AA & Telleria CM 2014 Resistance to cisplatin and paclitaxel does not affect the sensitivity of human ovarian cancer cells to antiprogestin-induced cytotoxicity. *J.Ovarian.Res.* **7** 45.

Gan Y, Wientjes MG & Au JL 2006 Expression of basic fibroblast growth factor correlates with resistance to paclitaxel in human patient tumors. *Pharm.Res.* **23** 1324-1331.

Garmy-Susini B, Delmas E, Gourdy P, Zhou M, Bossard C, Bugler B, Bayard F, Krust A, Prats AC, Doetschman T, Prats H & Arnal JF 2004 Role of fibroblast growth factor-2 isoforms in the effect of estradiol on endothelial cell migration and proliferation. *Circ.Res.* **94** 1301-1309.

Gascoigne KE & Taylor SS 2008 Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* **14** 111-122.

Gass EK, Leonhardt SA, Nordeen SK & Edwards DP 1998 The antagonists RU486 and ZK98299 stimulate progesterone receptor binding to deoxyribonucleic acid in vitro and in vivo, but have distinct effects on receptor conformation. *Endocrinology* **139** 1905-1919.

Gazzaniga P, Gandini O, Gradilone A, Silvestri I, Giuliani L, Magnanti M, Gallucci M, Saccani G, Frati L & Agliano AM 1999 Detection of basic fibroblast growth factor mRNA in urinary bladder cancer: correlation with local relapses. *Int.J.Oncol.* **14** 1123-1127.

Gee JM, Robertson JF, Ellis IO & Nicholson RI 2001 Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer. *Int.J.Cancer* **95** 247-254.

Gelsi-Boyer V, Orsetti B, Cervera N, et al. 2005 Comprehensive profiling of 8p11-12 amplification in breast cancer. *Mol.Cancer Res.* **3** 655-667.

George ML, Tutton MG, Abulafi AM, Eccles SA & Swift RI 2002 Plasma basic fibroblast growth factor levels in colorectal cancer: a clinically useful assay? *Clin.Exp.Metastasis* **19** 735-738.

Ghatge RP, Jacobsen BM, Schittone SA & Horwitz KB 2005 The progestational and androgenic properties of medroxyprogesterone acetate: gene regulatory overlap with dihydrotestosterone in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **7** R1036-R1050.

Giampietri C, Levrero M, Felici A, D'Alessio A, Capogrossi MC & Gaetano C 2000 E1A stimulates FGF-2 release promoting differentiation of primary endothelial cells. *Cell Death.Differ.* **7** 292-301.

Giri D, Ropiquet F & Ittmann M 1999 Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* **5** 1063-1071.

Giulianelli S, Cerliani JP, Lamb CA, Fabris VT, Bottino MC, Gorostiaga MA, Novaro V, Gongora A, Baldi A, Molinolo A & Lanari C 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** 2518-2531.

Giulianelli S, Molinolo A & Lanari C 2013 Targeting progesterone receptors in breast cancer. *Vitam.Horm.* **93** 161-184.

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.

Goyeneche AA, Caron RW & Telleria CM 2007 Mifepristone inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Clin.Cancer Res.* **13** 3370-3379.

Goyeneche AA & Telleria CM 2015 Antiprogestins in gynecological diseases. *Reproduction.* **149** R15-R33.

Gram IT, Park SY, Kolonel LN, Maskarinec G, Wilkens LR, Henderson BE & Le Marchand L 2015 Smoking and Risk of Breast Cancer in a Racially/Ethnically Diverse Population of Mainly Women Who Do Not Drink Alcohol: The MEC Study. *Am.J.Epidemiol.* **182** 917-925.

Grand EK, Chase AJ, Heath C, Rahemtulla A & Cross NC 2004 Targeting FGFR3 in multiple myeloma: inhibition of t(4;14)-positive cells by SU5402 and PD173074. *Leukemia* **18** 962-966.

Gruber G, Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M & Berger R 1999 Basic fibroblast growth factor is expressed by CD19/CD11c-positive cells in hairy cell leukemia. *Blood* **94** 1077-1085.

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)-phenylamin o]-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** 7066-7083.

Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Perrot-Appianat M & Milgrom E 1994 Cytoplasmic-nuclear trafficking of progesterone receptor. In vivo study of the mechanism of action of antiprogestins. *Biochem.Pharmacol.* **47** 21-24.

Gupta A, Mehta R, Alimirah F, Peng X, Murillo G, Wiehle R & Mehta RG 2013 Efficacy and mechanism of action of Proellex, an antiprogestin in aromatase overexpressing and Letrozole resistant T47D breast cancer cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **133** 30-42.

Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK & Dowsett M 2005 Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J.Clin.Oncol.* **23** 2469-2476.

Gyorffy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B & Pusztai L 2015 Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res.* **17** 11.

Hacker U, Nybakken K & Perrimon N 2005 Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **6** 530-541.

Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C & Balkwill FR 2005 Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J.Immunol.* **175** 1197-1205.

Hara T, Ooi A, Kobayashi M, Mai M, Yanagihara K & Nakanishi I 1998 Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in gastric cancers: detection by fluorescence in situ hybridization. *Lab Invest* **78** 1143-1153.

Harding TC, Long L, Palencia S, et al. 2013 Blockade of nonhormonal fibroblast growth factors by FP-1039 inhibits growth of multiple types of cancer. *Sci.Transl.Med.* **5** 178ra39.

Helguero LA, Viegas M, Asaithamby A, Shyamala G, Lanari C & Molinolo AA 2003 Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res.Treat.* **79** 379-390.

- Hewitt SC & Korach KS 2003 Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction*. **125** 143-149.
- Horstmann M, Merseburger AS, von der HE, et al. 2005 Correlation of bFGF expression in renal cell cancer with clinical and histopathological features by tissue microarray analysis and measurement of serum levels. *J.Cancer Res.Clin.Oncol*. **131** 715-722.
- Horwitz KB 1992 The molecular biology of RU486. Is there a role for antiproggestins in the treatment of breast cancer? *Endocr.Rev*. **13** 146-163.
- Hoskins JM, Carey LA & McLeod HL 2009 CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nat.Rev.Cancer* **9** 576-586.
- Howard BA & Gusterson BA 2000 Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5** 119-137.
- Howell A 2005 New developments in the treatment of postmenopausal breast cancer. *Trends Endocrinol.Metab* **16** 420-428.
- Hsu PI, Chow NH, Lai KH, Yang HB, Chan SH, Lin XZ, Cheng JS, Huang JS, Ger LP, Huang SM, Yen MY & Yang YF 1997 Implications of serum basic fibroblast growth factor levels in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. **17** 2803-2809.
- 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** 870-874.
- Hurvitz SA & Pietras RJ 2008 Rational management of endocrine resistance in breast cancer: a comprehensive review of estrogen receptor biology, treatment options, and future directions. *Cancer* **113** 2385-2397.
- Iberg N, Rogelj S, Fanning P & Klagsbrun M 1989 Purification of 18- and 22-kDa forms of basic fibroblast growth factor from rat cells transformed by the ras oncogene. *J.Biol.Chem*. **264** 19951-19955.
- Ibrahimi OA, Yeh BK, Eliseenkova AV, et al. 2005 Analysis of mutations in fibroblast growth factor (FGF) and a pathogenic mutation in FGF receptor (FGFR) provides direct evidence for the symmetric two-end model for FGFR dimerization. *Mol.Cell Biol*. **25** 671-684.
- Ibrahimi OA, Zhang F, Hrstka SC, Mohammadi M & Linhardt RJ 2004 Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly. *Biochemistry* **43** 4724-4730.
- Ishihara M, Fujita M, Obara K, Hattori H, Nakamura S, Nambu M, Kiyosawa T, Kanatani Y, Takase B, Kikuchi M & Maehara T 2006 Controlled releases of FGF-2 and paclitaxel from chitosan hydrogels and their subsequent effects on wound repair, angiogenesis, and tumor growth. *Curr.Drug Deliv*. **3** 351-358.
- Itoh N & Ornitz DM 2004 Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet*. **20** 563-569.
- Itoh N & Ornitz DM 2008 Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev.Dyn*. **237** 18-27.
- Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L & Horwitz KB 1997 The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* **11** 693-705.
- Jacobsen BM, Richer JK, Schittone SA & Horwitz KB 2002 New Human Breast Cancer Cells to Study Progesterone Receptor Isoform Ratio Effects and Ligand-independent Gene Regulation. *J.Biol.Chem*. **277** 27793-27800.

Jang M, Kim E, Choi Y, Lee H, Kim Y, Kim J, Kang E, Kim SW, Kim I & Park S 2012 FGFR1 is amplified during the progression of in situ to invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res.* **14** R115.

Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, et al. 2014 Emergence of constitutively active estrogen receptor-alpha mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin.Cancer Res.* **20** 1757-1767.

Johnson DE & Williams LT 1993 Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv.Cancer Res.* **60** 1-41.

Johnston SR 2009 Enhancing the efficacy of hormonal agents with selected targeted agents. *Clin.Breast Cancer* **9 Suppl 1** S28-S36.

Jordan VC 2014 A(nother) scientific strategy to prevent breast cancer in postmenopausal women by enhancing estrogen-induced apoptosis? *Menopause.* **21** 1160-1164.

Jordan VC, Obiorah I, Fan P, Kim HR, Ariazi E, Cunliffe H & Brauch H 2011 The St. Gallen Prize Lecture 2011: evolution of long-term adjuvant anti-hormone therapy: consequences and opportunities. *Breast* **20 Suppl 3** S1-11.

Justo N, Wilking N, Jonsson B, Luciani S & Cazap E 2013 A review of breast cancer care and outcomes in Latin America. *Oncologist.* **18** 248-256.

Kan M, Wang F, Xu J, Crabb JW, Hou J & McKeegan WL 1993 An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science* **259** 1918-1921.

Kan SH, Elanko N, Johnson D, Comejo-Roldan L, et al. 2002 Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am.J.Hum.Genet.* **70** 472-486.

Kato S 2001 Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer* **8** 3-9.

Katzke VA, Kaaks R & Kuhn T 2015 Lifestyle and cancer risk. *Cancer J.* **21** 104-110.

Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S & Brenner HJ 1979 Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur.J.Cancer* **15** 659-670.

Kinoshita M & Shimokado K 1999 Autocrine FGF-2 is responsible for the cell density-dependent susceptibility to apoptosis of HUVEC : A role of a calpain inhibitor-sensitive mechanism. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19** 2323-2329.

Klein S, Bikfalvi A, Birkenmeier TM, Giancotti FG & Rifkin DB 1996 Integrin regulation by endogenous expression of 18-kDa fibroblast growth factor-2. *J.Biol.Chem.* **271** 22583-22590.

Klijn JG, Setyono-Han B & Foekens JA 2000 Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* **65** 825-830.

Koike S, Sakai M & Muramatsu M 1987 Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* **15** 2499-2513.

Konecny GE, Kolarova T, O'Brien NA, et al. 2013 Activity of the fibroblast growth factor receptor inhibitors dovitinib (TKI258) and NVP-BGJ398 in human endometrial cancer cells. *Mol.Cancer Ther.* **12** 632-642.

Korah R, Choi L, Barrios J & Wieder R 2004 Expression of FGF-2 alters focal adhesion dynamics in migration-restricted MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.* **88** 17-28.

Korah RM, Sysounthone V, Golowa Y & Wieder R 2000 Basic fibroblast growth factor confers a less malignant phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Res* **60** 733-740.

Kordon E, Lanari C, Meiss R, Charreau E & Pasqualini CD 1990 Hormone dependence of a mouse mammary tumor line induced in vivo by medroxyprogesterone acetate. *Breast Cancer Res.Treat.* **17** 33-43.

Koziczak M, Holbro T & Hynes NE 2004 Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins. *Oncogene* **23** 3501-3508.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S & Gustafsson JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138** 863-870.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S & Gustafsson JA 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93** 5925-5930.

Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di Bacco A, Elbi C & Lutterbach B 2008 FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer Res.* **68** 2340-2348.

Kuukasjarvi T, Kononen J, Helin H, Holli K & Isola J 1996 Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J.Clin.Oncol.* **14** 2584-2589.

Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.

Lamont FR, Tomlinson DC, Cooper PA, Shnyder SD, Chester JD & Knowles MA 2011 Small molecule FGF receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma growth in vitro and in vivo. *Br.J.Cancer* **104** 75-82.

Lanari C, Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD & Charreau EH 1989 Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int.J.Cancer* **43** 845-850.

Lanari C, Molinolo AA & Pasqualini CD 1986a Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett.* **33** 215-223.

Lanari C, Molinolo AA & Pasqualini CD 1986b Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. *J.Natl.Cancer Inst.* **77** 157-164.

Lanari C, Wargon V, Rojas P & Molinolo AA 2012 Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? *Endocr.Relat Cancer* **19** R35-R50.

Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. 2015 Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **526** 525-530.

Landriscina M, Cassano A, Ratto C, Longo R, Ippoliti M, Palazzotti B, Crucitti F & Barone C 1998 Quantitative analysis of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human colorectal cancer. *Br.J.Cancer* **78** 765-770.

Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG & Rose DW 1998 Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** 2920-2925.

Le Page C, Ouellet V, Madore J, Hudson TJ, Tonin PN, Provencher DM & Mes-Masson AM 2006 From gene profiling to diagnostic markers: IL-18 and FGF-2 complement CA125 as serum-based markers in epithelial ovarian cancer. *Int.J.Cancer* **118** 1750-1758.

Lee SH, Lopes dM, Vora J, Harris A, Ye H, Nordahl L, Garrett E, Samara E, Aukerman SL, Gelb AB & Heise C 2005 In vivo target modulation and biological activity of CHIR-258, a multitargeted growth factor receptor kinase inhibitor, in colon cancer models. *Clin.Cancer Res.* **11** 3633-3641.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J & Harris AL 1996 Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* **56** 4625-4629.

Li S, Payne S, Wang F, Claus P, Su Z, Groth J, Geradts J, de Ridder G, Alvarez R, Marcom PK, Pizzo SV & Bachelder RE 2015 Nuclear basic fibroblast growth factor regulates triple-negative breast cancer chemo-resistance. *Breast Cancer Res.* **17** 91.

Li S, Shen D, Shao J, et al. 2013 Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. *Cell Rep.* **4** 1116-1130.

Li X & O'Malley BW 2003 Unfolding the action of progesterone receptors. *J.Biol.Chem.* **278** 39261-39264.

Liang G, Liu Z, Wu J, Cai Y & Li X 2012 Anticancer molecules targeting fibroblast growth factor receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* **33** 531-541.

Liang Y, Besch-Williford C, Brekken RA & Hyder SM 2007 Progesterin-dependent progression of human breast tumor xenografts: a novel model for evaluating antitumor therapeutics. *Cancer Res.* **67** 9929-9936.

Lieberman ME, Maurer RA & Gorski J 1978 Estrogen control of prolactin synthesis in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **75** 5946-5949.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG & Pollard JW 2001 Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J.Exp.Med.* **193** 727-740.

Lin W, Peng Z, Wang G, Bi J, Liu S & Wang H 2003a [An experimental research in the inhibiting effect of bFGF-MAb on the growth of ovarian cancer cells and transplanted tumor]. *Sichuan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.* **34** 625-7, 693.

Lin W, Peng ZL, Zheng A, Bi JH & Huang ZY 2003b [The effect of basic fibroblast growth factor in ovarian cancer growth and angiogenesis]. *Zhonghua Yi.Xue.Yi.Chuan Xue.Za Zhi.* **20** 532-535.

Lowry OH, Rosebrough NJ & Farr AL 1951 Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193** 265-275.

Luo X, Yin P, Coon VJ, Cheng YH, Wiehle RD & Bulun SE 2010 The selective progesterone receptor modulator CDB4124 inhibits proliferation and induces apoptosis in uterine leiomyoma cells. *Fertil.Steril.* **93** 2668-2673.

Lugmani YA, Graham M & Coombes RC 1992 Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR1 and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br.J.Cancer* **66** 273-280.

Maciag T, Cerundolo J, Ilesley S, Kelley PR & Forand R 1979 An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76** 5674-5678.

Malchers F, Dietlein F, Schottle J, et al. 2014 Cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of transformation by amplified FGFR1 in lung cancer. *Cancer Discov.* **4** 246-257.

Martin MB, Franke TF, Stoica GE, Chambon P, Katzenellenbogen BS, Stoica BA, McLemore MS, Olivo SE & Stoica A 2000 A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **141** 4503-4511.

Maruoka Y, Ohbayashi N, Hoshikawa M, Itoh N, Hogan BL & Furuta Y 1998 Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo. *Mech.Dev.* **74** 175-177.

Mathonnet M, Descottes B, Valleix D, Labrousse F, Truffinet V & Denizot Y 2006 Quantitative analysis using ELISA of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in human colorectal cancer, liver metastasis of colorectal cancer and hepatocellular carcinoma. *World J.Gastroenterol.* **12** 3782-3783.

McLeskey SW, Ding IY, Lippman ME & Kern FG 1994 MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res.* **54** 523-530.

Mego M, Mani SA & Cristofanilli M 2010 Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat.Rev.Clin.Oncol.* **7** 693-701.

Menzel T, Rahman Z, Calleja E, White K, Wilson EL, Wieder R & Gabrilove J 1996 Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* **87** 1056-1063.

Mignatti P, Morimoto T & Rifkin DB 1992 Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J.Cell Physiol* **151** 81-93.

Mignatti P & Rifkin DB 1991 Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism? *J.Cell Biochem.* **47** 201-207.

Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M & Schlessinger J 1996 Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol.Cell Biol.* **16** 977-989.

Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, Schroeder MC, Panek RL, Lu GH, Eliseenkova AV, Green D, Schlessinger J & Hubbard SR 1998 Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J.* **17** 5896-5904.

Mohammadi M, Olsen SK & Ibrahimi OA 2005 Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16** 107-137.

Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N & Pasqualini CD 1987 Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J.Natl.Cancer Inst.* **79** 1341-1350.

Moller S, Mucci LA, Harris JR, Scheike T, Holst K, Halekoh U, Adami HO, Czene K, Christensen K, Holm NV, Pukkala E, Skytthe A, Kaprio J & Hjelmborg JB 2016 The Heritability of Breast Cancer among Women in the Nordic Twin Study of Cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **25** 145-150.

Moy FJ, Seddon AP, Bohlen P & Powers R 1996 High-resolution solution structure of basic fibroblast growth factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **35** 13552-13561.

Murray JI, West NR, Murphy LC & Watson PH 2015 Intratumoural inflammation and endocrine resistance in breast cancer. *Endocr.Relat Cancer* **22** R51-R67.

- Nakamura J, Lu Q, Aberdeen G, Albrecht E & Brodie A 1999 The effect of estrogen on aromatase and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in the normal nonhuman primate mammary gland. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84** 1432-1437.
- Nam NH & Parang K 2003 Current targets for anticancer drug discovery. *Curr.Drug Targets.* **4** 159-179.
- Nandi S 1958 Endocrine control of mammary gland development and function in the C3H/ He Crgl mouse. *J.Natl.Cancer Inst.* **21** 1039-1063.
- Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM & Allan JD 2002 Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA* **288** 872-881.
- Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF & Folkman J 1994 Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J.Natl.Cancer Inst.* **86** 356-361.
- Nicholson RI, McClelland RA, Finlay P, Eaton CL, Gullick WJ, Dixon AR, Robertson JF, Ellis IO & Blamey RW 1993 Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur.J.Cancer* **29A** 1018-1023.
- Nickel W 2005 Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic.* **6** 607-614.
- Nindl W, Kavakebi P, Claus P, Grothe C, Pfaller K & Klimaschewski L 2004 Expression of basic fibroblast growth factor isoforms in postmitotic sympathetic neurons: synthesis, intracellular localization and involvement in karyokinesis. *Neuroscience* **124** 561-572.
- Normanno N, Di Maio M, De Maio E, De Luca A, de Matteis A, Giordano A & Perrone F 2005 Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr.Relat Cancer* **12** 721-747.
- Oftedal OT 2002 The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* **7** 225-252.
- Okada-Ban M, Moens G, Thiery JP & Jouanneau J 1999 Nuclear 24 kD fibroblast growth factor (FGF)-2 confers metastatic properties on rat bladder carcinoma cells. *Oncogene* **18** 6719-6724.
- Ornitz DM & Itoh N 2001 Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* **2** REVIEWS3005.
- Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M & Basilico C 1998 Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** 5672-5677.
- Osborne CK & Schiff R 2011 Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu.Rev.Med.* **62** 233-247.
- Osborne CK, Von Hoff DD & Mullins K 1985 Endocrine therapy testing of human breast cancers in the soft agar clonogenic assay. *Breast Cancer Res.Treat.* **6** 229-235.
- Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G & Horwitz KB 1998 Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem* **273** 10696-10701.
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J & Wolmark N 2004 A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N.Engl.J.Med.* **351** 2817-2826.

Pandis N, Heim S, Bardi G, Limon J, Mandahl N & Mitelman F 1992 Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer [published erratum appears in *Genes Chromosomes Cancer* 1992 Nov;5(4):410]. *Genes Chromosomes Cancer* **5** 14-20.

Pardo OE, Arcaro A, Salerno G, Raguz S, Downward J & Seckl MJ 2002 Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* **277** 12040-12046.

Pardo OE, Latigo J, Jeffery RE, Nye E, Poulson R, Spencer-Dene B, Lemoine NR, Stamp GW, Aboagye EO & Seckl MJ 2009 The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **69** 8645-8651.

Paulsson J & Micke P 2014 Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Semin.Cancer Biol.* **25** 61-68.

Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML, et al. 2012 Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat.Genet.* **44** 1104-1110.

Penault-Llorca F, Bertucci F, Adelaide J, Parc P, Coulier F, Jacquemier J, Birnbaum D & deLapeyriere O 1995 Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int.J.Cancer* **61** 170-176.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO & Botstein D 2000 Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406** 747-752.

Peters K, Werner S, Liao X, Wert S, Whitsett J & Williams L 1994 Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *EMBO J.* **13** 3296-3301.

Petrucci N, Daly MB & Feldman GL 1993 BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast and Ovarian Cancer.

Pintucci G, Quarto N & Rifkin DB 1996 Methylation of high molecular weight fibroblast growth factor-2 determines post-translational increases in molecular weight and affects its intracellular distribution. *Mol.Biol.Cell* **7** 1249-1258.

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.

Piotrowicz RS, Maher PA & Levin EG 1999 Dual activities of 22-24 kDa basic fibroblast growth factor: inhibition of migration and stimulation of proliferation. *J.Cell Physiol* **178** 144-153.

Plouet J, Mascarelli F, Loret MD, Faure JP & Courtois Y 1988 Regulation of eye derived growth factor binding to membranes by light, ATP or GTP in photoreceptor outer segments. *EMBO J.* **7** 373-376.

Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, et al. 2007 Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* **26** 7158-7162.

Polo ML, Riggio M, May M, Rodriguez MJ, Perrone MC, Stallings-Mann M, Kaen D, Frost M, Goetz M, Boughey J, Lanari C, Radisky D & Novaro V 2015 Activation of PI3K/Akt/mTOR signaling in the tumor stroma drives endocrine therapy-dependent breast tumor regression. *Oncotarget.*

Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST & Wong J 2001 Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am.J.Surg.* **182** 298-304.

Powers CJ, McLeskey SW & Wellstein A 2000 Fibroblast growth factors, their receptors and their roles. *Endocr. Relat Cancer* **7** 165-197.

Prats H, Kaghad M, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Amalric F, Smith JA & . 1989 High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86** 1836-1840.

Quarto N, Fong KD & Longaker MT 2005 Gene profiling of cells expressing different FGF-2 forms. *Gene* **356** 49-68.

Quarto N, Talarico D, Florkiewicz R & Rifkin DB 1991 Selective expression of high molecular weight basic fibroblast growth factor confers a unique phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell Regul.* **2** 699-708.

Rand V, Huang J, Stockwell T, Ferriera S, Buzko O, Levy S, Busam D, Li K, Edwards JB, Eberhart C, Murphy KM, Tsiamouri A, Beeson K, Simpson AJ, Venter JC, Riggins GJ & Strausberg RL 2005 Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102** 14344-14349.

Rayburn ER & Zhang R 2008 Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible? *Drug Discov.Today* **13** 513-521.

Raymond EG, Shannon C, Weaver MA & Winikoff B 2013 First-trimester medical abortion with mifepristone 200 mg and misoprostol: a systematic review. *Contraception* **87** 26-37.

Reis-Filho JS, Simpson PT, Turner NC, Lambros MB, Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Sarrio D, Savage K, Dexter T, Irvani M, Fenwick K, Weber B, Hardisson D, Schmitt FC, Palacios J, Lakhani SR & Ashworth A 2006 FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin.Cancer Res.* **12** 6652-6662.

Renko M, Quarto N, Morimoto T & Rifkin DB 1990 Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *J.Cell Physiol* **144** 108-114.

Riggio M, Polo ML, Blaustein M, Colman-Lerner A, Luthy I, Lanari C & Novaro V 2012 PI3K/AKT pathway regulates phosphorylation of steroid receptors, hormone independence and tumor differentiation in breast cancer. *Carcinogenesis* **33** 509-518.

Robinson DR, Wu YM, Vats P, Su F, et al. 2013 Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat.Genet.* **45** 1446-1451.

Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom E & Berger R 1987 Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum.Genet.* **77** 280-282.

Ruan W & Kleinberg DL 1999 Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology* **140** 5075-5081.

Ruotsalainen T, Joensuu H, Mattson K & Salven P 2002 High pretreatment serum concentration of basic fibroblast growth factor is a predictor of poor prognosis in small cell lung cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **11** 1492-1495.

Sahores A, Luque GM, Wargon V, May M, Molinolo A, Becu-Villalobos D, Lanari C & Lamb CA 2013 Novel, low cost, highly effective, handmade steroid pellets for experimental studies. *PLoS.ONE.* **8** e64049.

Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M & Gustafsson JA 2000 Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** 337-342.

Salvatori L, Pallante P, Ravenna L, Chinzari P, Frati L, Russo MA & Petrangeli E 2003 Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human ER alpha and beta subtypes via an Sp1 site. *Oncogene* **22** 4875-4881.

Sartippour MR, Zhang L, Lu M, Wang HJ & Brooks MN 2005a Nipple fluid basic fibroblast growth factor in patients with breast cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **14** 2995-2998.

Sartorius CA, Shen T & Horwitz KB 2003 Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts. *Breast Cancer Res Treat* **79** 287-299.

Satoh K, Hovey RC, Malewski T, Warri A, Goldhar AS, Ginsburg E, Saito K, Lydon JP & Vonderhaar BK 2007 Progesterone enhances branching morphogenesis in the mouse mammary gland by increased expression of Msx2. *Oncogene* **26** 7526-7534.

Schaff EA 2010 Mifepristone: ten years later. *Contraception* **81** 1-7.

Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK & Osborne CK 2004 Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin.Cancer Res.* **10** 331S-336S.

Schillace RV, Skinner AM, Pommier RF, O'Neill S, Muller PJ, Naik AM, Hansen JE & Pommier SJ 2014 Estrogen receptor, progesterone receptor, interleukin-6 and interleukin-8 are variable in breast cancer and benign stem/progenitor cell populations. *BMC.Cancer* **14** 733.

Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ & Mohammadi M 2000 Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol.Cell* **6** 743-750.

Schneider W, Ramachandran C, Satyaswaroop PG & Shyamala G 1991 Murine progesterone receptor exists predominantly as the 83-kilodalton 'A' form. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **38** 285-291.

Segovia-Mendoza M, Jurado R, Mir R, Medina LA, Prado-Garcia H & Garcia-Lopez P 2015 Antihormonal agents as a strategy to improve the effect of chemo-radiation in cervical cancer: in vitro and in vivo study. *BMC.Cancer* **15** 21.

Sequeira G, Vanzulli SI, Rojas P, Lamb C, Colombo L, May M, Molinolo A & Lanari C 2014 The effectiveness of nano chemotherapeutic particles combined with mifepristone depends on the PR isoform ratio in preclinical models of breast cancer. *Oncotarget.* **5** 3246-3260.

Sestak I 2014 Preventative therapies for healthy women at high risk of breast cancer. *Cancer Manag.Res.* **6** 423-430.

Sezer O, Jakob C, Eucker J, Niemoller K, Gatz F, Wernicke K & Possinger K 2001 Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. *Eur.J.Haematol.* **66** 83-88.

Sharpe R, Pearson A, Herrera-Abreu MT, Johnson D, Mackay A, Welti JC, Natrajan R, Reynolds AR, Reis-Filho JS, Ashworth A & Turner NC 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.

Sheikh F, Sontag DP, Fandrich RR, Kardami E & Cattini PA 2001 Overexpression of FGF-2 increases cardiac myocyte viability after injury in isolated mouse hearts. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280** H1039-H1050.

Sheng Z, Lewis JA & Chirico WJ 2004 Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. *J.Biol.Chem.* **279** 40153-40160.

Sherman L, Stocker KM, Morrison R & Ciment G 1993 Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. *Development* **118** 1313-1326.

Shi E, Kan M, Xu J, Wang F, Hou J & McKeehan WL 1993 Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants. *Mol.Cell Biol.* **13** 3907-3918.

Shi YJ, Tsang JY, Ni YB, Chan SK, Chan KF & Tse GM 2015 FGFR1 is an adverse outcome indicator for luminal A breast cancers. *Oncotarget.*

Shibata F, Baird A & Florkiewicz RZ 1991 Functional characterization of the human basic fibroblast growth factor gene promoter. *Growth Factors* **4** 277-287.

Shin A, Sandin S, Lof M, Margolis KL, Kim K, Couto E, Adami HO & Weiderpass E 2015 Alcohol consumption, body mass index and breast cancer risk by hormone receptor status: Women' Lifestyle and Health Study. *BMC.Cancer* **15** 881.

Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H & Schiff R 2004 Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **96** 926-935.

Silberstein GB & Daniel CW 1982 Elvax 40P implants: sustained, local release of bioactive molecules influencing mammary ductal development. *Dev.Biol.* **93** 272-278.

Simian M, Manzur T, Rodriguez V, Kier Joffe EB & Klein S 2009 A spontaneous estrogen dependent, tamoxifen sensitive mouse mammary tumor: a new model system to study hormone-responsiveness in immune competent mice. *Breast Cancer Res.Treat.* **113** 1-8.

Sitruk-Ware R & Spitz IM 2003 Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. *Contraception* **68** 409-420.

Smith K, Fox SB, Whitehouse R, Taylor M, Greenall M, Clarke J & Harris AL 1999 Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann.Oncol.* **10** 707-713.

Soldati R, Wargon V, Cerliani JP, Giulianelli S, Vanzulli SI, Gorostiaga MA, Bolado J, do CP, Molinolo A, Vollmer G & Lanari C 2009 Inhibition of mammary tumor growth by estrogens: is there a specific role for estrogen receptors alpha and beta? *Breast Cancer Res.Treat.*

Sorensen V, Nilsen T & Wiedlocha A 2006 Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays* **28** 504-514.

Speirs V 2002 Oestrogen receptor beta in breast cancer: good, bad or still too early to tell? *J.Pathol.* **197** 143-147.

St Bernard R, Zheng L, Liu W, Winer D, Asa SL & Ezzat S 2005 Fibroblast growth factor receptors as molecular targets in thyroid carcinoma. *Endocrinology* **146** 1145-1153.

Stachowiak MK, Maher PA & Stachowiak EK 2007 Integrative nuclear signaling in cell development--a role for FGF receptor-1. *DNA Cell Biol.* **26** 811-826.

Stotter A & Walker R 2010 Tumour markers predictive of successful treatment of breast cancer with primary endocrine therapy in patients over 70 years old: a prospective study. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **75** 249-256.

Sun C & Bernards R 2014 Feedback and redundancy in receptor tyrosine kinase signaling: relevance to cancer therapies. *Trends Biochem.Sci.* **39** 465-474.

Tabara H, Kohno H, Dhar DK, Kotoh T, Yoshimura H, Masunaga R, Tachibana M, Kubota H & Nagasue N 2001 Concurrent expression of angiogenic growth factors and neovascularization during tumourigenesis in colorectal carcinoma patients. *Acta Oncol.* **40** 622-628.

Takahashi JA, Fukumoto M, Igarashi K, Oda Y, Kikuchi H & Hatanaka M 1992 Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas. *J.Neurosurg.* **76** 792-798.

Taverna S, Gherzi G, Ginestra A, Rigogliuso S, Pecorella S, Alaimo G, Saladino F, Dolo V, Dell'era P, Pavan A, Pizzolanti G, Mignatti P, Presta M & Vittorelli ML 2003 Shedding of membrane vesicles mediates fibroblast growth factor-2 release from cells. *J.Biol.Chem.* **278** 51911-51919.

Terai H, Soejima K, Yasuda H, Nakayama S, Hamamoto J, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Ikemura S, Sato T, Yoda S, Satomi R, Naoki K & Betsuyaku T 2013 Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC. *Mol.Cancer Res.* **11** 759-767.

Theissig F, Kunze KD, Haroske G & Meyer W 1990 Histological grading of breast cancer. Interobserver, reproducibility and prognostic significance. *Pathol.Res.Pract.* **186** 732-736.

Thisse B & Thisse C 2005 Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev.Biol.* **287** 390-402.

Thomas P & Smart TG 2005 HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* **51** 187-200.

Thomas-Mudge RJ, Okada-Ban M, Vandenbroucke F, Vincent-Salomon A, Girault JM, Thiery JP & Jouanneau J 2004 Nuclear FGF-2 facilitates cell survival in vitro and during establishment of metastases. *Oncogene* **23** 4771-4779.

Tieszen CR, Goyeneche AA, Brandhagen BN, Ortbahn CT & Telleria CM 2011 Antiprogestin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BMC.Cancer* **11** 207.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J & Jemal A 2015 Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J.Clin.* **65** 87-108.

Touriol C, Morillon A, Gensac MC, Prats H & Prats AC 1999 Expression of human fibroblast growth factor 2 mRNA is post-transcriptionally controlled by a unique destabilizing element present in the 3'-untranslated region between alternative polyadenylation sites. *J.Biol.Chem.* **274** 21402-21408.

Touriol C, Roussigne M, Gensac MC, Prats H & Prats AC 2000 Alternative translation initiation of human fibroblast growth factor 2 mRNA controlled by its 3'-untranslated region involves a Poly(A) switch and a translational enhancer. *J.Biol.Chem.* **275** 19361-19367.

Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, Li Z, Gala K, Fanning S, King TA, Hudis C, Chen D, Taran T, Hortobagyi G, Greene G, Berger M, Baselga J & Chandarlapaty S 2013 ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat.Genet.* **45** 1439-1445.

Trott JF, Vonderhaar BK & Hovey RC 2008 Historical perspectives of prolactin and growth hormone as mammogens, lactogens and galactagogues--agog for the future! *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* **13** 3-11.

Trudel S, Ely S, Farooqi Y, Affer M, Robbiani DF, Chesi M & Bergsagel PL 2004 Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. *Blood* **103** 3521-3528.

Tsunoda S, Sakurai H, Saito Y, Ueno Y, Koizumi K & Saiki I 2009 Massive T-lymphocyte infiltration into the host stroma is essential for fibroblast growth factor-2-promoted growth and metastasis of mammary tumors via neovascular stability. *American Journal of Pathology* **174** 671-683.

Turner CA, Clinton SM, Thompson RC, Watson SJ, Jr. & Akil H 2011 Fibroblast growth factor-2 (FGF2) augmentation early in life alters hippocampal development and rescues the anxiety phenotype in vulnerable animals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **108** 8021-8025.

Turner N & Grose R 2010 Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat.Rev.Cancer* **10** 116-129.

Turner N, Lambros MB, Horlings HM, Pearson A, Sharpe R, Natrajan R, Geyer FC, van Kouwenhove M, Kreike B, Mackay A, Ashworth A, van de Vijver MJ & Reis-Filho JS 2010a Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* **29** 2013-2023.

Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, Natrajan R, Marchio C, Iorns E, Mackay A, Gillett C, Grigoriadis A, Tutt A, Reis-Filho JS & Ashworth A 2010b FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* **70** 2085-2094.

Ueki T, Koji T, Tamiya S, Nakane PK & Tsuneyoshi M 1995 Expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor in advanced gastric carcinoma. *J.Pathol.* **177** 353-361.

Uematsu S, Higashi T, Nouse K, Kariyama K, Nakamura S, Suzuki M, Nakatsukasa H, Kobayashi Y, Hanafusa T, Tsuji T & Shiratori Y 2005 Altered expression of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *J.Gastroenterol.Hepatol.* **20** 583-588.

Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M, Correa R, Klingbeil C & Epstein SE 1994 Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am.J.Physiol* **266** H1588-H1595.

Vagner S, Touriol C, Galy B, Audigier S, Gensac MC, Amalric F, Bayard F, Prats H & Prats AC 1996 Translation of CUG- but not AUG-initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. *J.Cell Biol.* **135** 1391-1402.

Valtink M, Knels L, Stanke N, Engelmann K, Funk RH & Lindemann D 2012 Overexpression of human HMW FGF-2 but not LMW FGF-2 reduces the cytotoxic effect of lentiviral gene transfer in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* **53** 3207-3214.

Van den BL, Laurell H, Huez I, Zanibellato C, Prats H & Bugler B 2000 FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2. *Mol.Endocrinol.* **14** 1709-1724.

Vanzulli S, Efeyan A, Benavides F, Helguero L, Peters G, Shen J, Conti CJ, Lanari C & Molinolo A 2002 p21, p27 and p53 in estrogen and antiprogesterin-induced tumor regression of experimental mouse mammary ductal carcinomas. *Carcinogenesis* **23** 749-757.

Vanzulli SI, Soldati R, Meiss R, Colombo L, Molinolo AA & Lanari C 2005 Estrogen or antiprogesterin treatment induces complete regression of pulmonary and axillary metastases in an experimental model of breast cancer progression. *Carcinogenesis* **26** 1055-1063.

Vicent GP, Ballare C, Zaurin R, Saragueta P & Beato M 2006 Chromatin remodeling and control of cell proliferation by progestins via cross talk of progesterone receptor with the estrogen receptors and kinase signaling pathways. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1089** 59-72.

Vilgrain I, Gonzalez AM & Baird A 1993 Phosphorylation of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in the nuclei of SK-Hep-1 cells. *FEBS Lett.* **331** 228-232.

Visscher DW, Frost MH, Hartmann LC, Frank RD, Vierkant RA, McCullough AE, Winham SJ, Vachon CM, Ghosh K, Brandt KR, Farrell AM, Tarabishy Y, Hieken TJ, Haddad TC, Kraft RA, Radisky DC & Degnim AC 2016 Clinicopathologic features of breast cancers that develop in women with previous benign breast disease. *Cancer* **122** 378-385.

Wan X, Corn PG, Yang J, Palanisamy N, Starbuck MW, Efstathiou E, Li Ning, Tapia EM, Zurita AJ¹, Aparicio A, Ravoori MK, Vazquez ES, Robinson DR, Wu YM, Cao X, Iyer MK, McKeenan W, Kundra V, Wang F, Troncoso P, Chinnaiyan AM, Logothetis CJ, Navone NM. 2014. Prostate cancer cell-stromal cell crosstalk via FGFR1 mediates antitumor activity of dovitinib in bone metastases. *Sci Transl Med.* **3;6** (252).

Wang F, Kan M, Yan G, Xu J & McKeenan WL 1995 Alternately spliced NH2-terminal immunoglobulin-like Loop I in the ectodomain of the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. *J.Biol.Chem.* **270** 10231-10235.

Wang F, Yang L, Shi L, Li Q, Zhang G, Wu J, Zheng J & Jiao B 2015 Nuclear translocation of fibroblast growth factor-2 (FGF2) is regulated by Karyopherin-beta2 and Ran GTPase in human glioblastoma cells. *Oncotarget.* **6** 21468-21478.

Wang Y & Becker D 1997 Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat.Med.* **3** 887-893.

Wargon V, Fernandez SV, Goin M, Giulianelli S, Russo J & Lanari C 2011 Hypermethylation of the progesterone receptor A in constitutive anti-progestin-resistant mouse mammary carcinomas. *Breast Cancer Res.Treat.* **126** 319-332.

Wargon V, Helguero LA, Bolado J, Rojas P, Novaro V, Molinolo A & Lanari C 2009 Reversal of anti-progestin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res.Treat.* **116** 449-460.

Wargon V, Riggio M, Giulianelli S, Sequeira GR, Rojas P, May M, Polo ML, Gorostiaga MA, Jacobsen B, Molinolo A, Novaro V & Lanari C 2015 Progestin and anti-progestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int.J.Cancer* **136** 2680-2692.

Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL & Quinn PG 1996 An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol.Endocrinol.* **10** 1379-1387.

Wei LL, Norris BM & Baker CJ 1997 An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **62** 287-297.

Weich HA, Iberg N, Klagsbrun M & Folkman J 1991 Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene expression in capillary endothelial cells. *J.Cell Biochem.* **47** 158-164.

Weiss B, Davidkova G & Zhou LW 1999 Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. *Cell Mol.Life Sci.* **55** 334-358.

Weiss J, Sos ML, Seidel D, et al. 2010 Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci.Transl.Med.* **2** 62ra93.

Welm BE, Freeman KW, Chen M, Contreras A, Spencer DM & Rosen JM 2002 Inducible dimerization of FGFR1: development of a mouse model to analyze progressive transformation of the mammary gland. *J Cell Biol.* **157** 703-714.

Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME & McDonnell DP 1994 The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol.Cell Biol.* **14** 8356-8364.

Wendt MK, Taylor MA, Schiemann BJ, Sossey-Alaoui K & Schiemann WP 2014 Fibroblast growth factor receptor splice variants are stable markers of oncogenic transforming growth factor beta1 signaling in metastatic breast cancers. *Breast Cancer Res.* **16** R24.

Werb Z, Ashkenas J, MacAuley A & Wiesen JF 1996 Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **29** 1087-1097.

Werner S 2011 A novel enhancer of the wound healing process: the fibroblast growth factor-binding protein. *Am.J.Pathol.* **179** 2144-2147.

Wesche J, Haglund K & Haugsten EM 2011 Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem.J.* **437** 199-213.

Wiedlocha A, Falnes PO, Madshus IH, Sandvig K & Olsnes S 1994 Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* **76** 1039-1051.

Wiedlocha A & Sorensen V 2004 Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **286** 45-79.

Wiehle R, Lantvit D, Yamada T & Christov K 2011 CDB-4124, a progesterone receptor modulator, inhibits mammary carcinogenesis by suppressing cell proliferation and inducing apoptosis. *Cancer Prev.Res.(Phila)* **4** 414-424.

Wiehle RD, Christov K & Mehta R 2007 Anti-progestins suppress the growth of established tumors induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: comparison between RU486 and a new 21-substituted-19-nor-progestin. *Oncol.Rep.* **18** 167-174.

Williams JM & Daniel CW 1983 Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev.Biol.* **97** 274-290.

Winterpacht A, Hilbert K, Stelzer C, Schweikardt T, Decker H, Segerer H, Spranger J & Zabel B 2000 A novel mutation in FGFR-3 disrupts a putative N-glycosylation site and results in hypochondroplasia. *Physiol Genomics* **2** 9-12.

Woodward TL, Xie JW & Haslam SZ 1998 The role of mammary stroma in modulating the proliferative response to ovarian hormones in the normal mammary gland. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* **3** 117-131.

Wu J, Richer J, Horwitz KB & Hyder SM 2004 Progesterin-dependent induction of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells: preferential regulation by progesterone receptor B. *Cancer Res.* **64** 2238-2244.

Wyse Jackson AC, Roche SL, Byrne AM, Ruiz-Lopez AM & Cotter TG 2016 Progesterone receptor signalling in retinal photoreceptor neuroprotection. *J.Neurochem.* **136** 63-77.

- Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM & Morrison RS 1994 Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91** 484-488.
- Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, Kobrin MS & Korc M 1993 Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res.* **53** 5289-5296.
- Yamazaki K, Nagao T, Yamaguchi T, Saisho H & Kondo Y 1997 Expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2)-associated with tumour proliferation in human pancreatic carcinoma. *Virchows Arch.* **431** 95-101.
- Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, Sugimoto T, Kaji K, Utsuyama M, Kurashima C & . 1992 Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* **257** 1401-1403.
- Yang F, Gao Y, Geng J, Qu D, Han Q, Qi J & Chen G 2013 Elevated expression of SOX2 and FGFR1 in correlation with poor prognosis in patients with small cell lung cancer. *Int.J.Clin.Exp.Pathol.* **6** 2846-2854.
- Yarden RI, Wilson MA & Chrysogelos SA 2001 Estrogen suppression of EGFR expression in breast cancer cells: a possible mechanism to modulate growth. *J.Cell Biochem.Suppl* **Suppl 36** 232-246.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P & Ornitz DM 1991 Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **64** 841-848.
- Yeoman LC 1993 An autocrine model for cell- and matrix-associated fibroblast growth factor. *Oncol.Res.* **5** 489-499.
- Yiangou C, Gomm JJ, Coope RC, Law M, Luqmani YA, Shousha S, Coombes RC & Johnston CL 1997 Fibroblast growth factor 2 in breast cancer: occurrence and prognostic significance. *Br.J.Cancer* **75** 28-33.
- Yu PJ, Ferrari G, Galloway AC, Mignatti P & Pintucci G 2007 Basic fibroblast growth factor (FGF-2): the high molecular weight forms come of age. *J.Cell Biochem.* **100** 1100-1108.
- Zagzag D, Miller DC, Sato Y, Rifkin DB & Burstein DE 1990 Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in astrocytomas. *Cancer Res.* **50** 7393-7398.
- Zeps N, Bentel JM, Papadimitriou JM, D'Antuono MF & Dawkins HJ 1998 Estrogen receptor-negative epithelial cells in mouse mammary gland development and growth. *Differentiation* **62** 221-226.
- Zhang K, Chu K, Wu X, Gao H, Wang J, Yuan YC, Loera S, Ho K, Wang Y, Chow W, Un F, Chu P & Yen Y 2013b Amplification of FRS2 and activation of FGFR/FRS2 signaling pathway in high-grade liposarcoma. *Cancer Res.* **73** 1298-1307.
- Zhang K, Chu K, Wu X, Gao H, Wang J, Yuan YC, Loera S, Ho K, Wang Y, Chow W, Un F, Chu P & Yen Y 2013a Amplification of FRS2 and activation of FGFR/FRS2 signaling pathway in high-grade liposarcoma. *Cancer Res.* **73** 1298-1307.
- Zhang Y, Shang H, Sun LG, Liu N & Yu HY 2003 [Expression of aFGF and bFGF in ovarian cancer and their effect on ovarian cancer cell proliferation]. *Ai.Zheng.* **22** 1162-1165.
- Zhao J, Liu XY, Zhang QY & Jiang W 2005 [Plasma level and prognostic significance of VEGF, bFGF and MMP-9 in patients with advanced non-small-cell lung cancer]. *Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi.* **27** 676-679.
- Zhou L & Ogata Y 2013 Transcriptional regulation of the human bone sialoprotein gene by fibroblast growth factor 2. *J.Oral Sci.* **55** 63-70.

Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT & Rees DC 1991 Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* **251** 90-93.

Zimering MB, Katsumata N, Sato Y, Brandi ML, Aurbach GD, Marx SJ & Friesen HG 1993 Increased basic fibroblast growth factor in plasma from multiple endocrine neoplasia type 1: relation to pituitary tumor. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **76** 1182-1187.

APÉNDICE

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Medio de cultivo:

- DMEM F12 (Sigma) sin rojo fenol 15,6 g/l
- Bicarbonato de sodio (Sigma) 1,2 g/l
- Sulfato de gentamicina comercial (receta magistral) 50 mg/l

Preparado según instrucciones del fabricante con H₂O_d (ROUX) y esterilizado por filtración (0,22 µm).

Suero Fetal Bovino de complementado (SFBdec)

Se utilizó suero fetal bovino (Natocor, Córdoba, Argentina) calentado en baño térmico a 56°C durante 30 min.

Medio de mantenimiento de células (DMEM F12 con SFB 10%)

Se utilizó DMEM F12 + SFBdec 10%.

Medio de lavado (SFB 2%)

Se utilizó DMEM F12 + SFBdec 2%.

SFB adsorbido con carbón dextrano (SFBch)

Se incubó el SFB con carbón activado al 5% (Mallinckrodt) durante una hora a 4°C con agitación permanente. Luego de la adsorción, el suero se centrifugó dos veces a 12.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se incubó con 5% de carbón activado ON. Al día siguiente el suero se centrifugó 5 ó 6 veces hasta eliminar completamente el carbón y se esterilizó por filtración (0,22 µm). Se la fracciona en tubos de 15 ml y se guarda a -20°C.

Buffer fosfato utilizado (PBS 10X) - sin Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺:

- Na₂HPO₄.12H₂O (fosfato dibásico de sodio, dodecahidratado, Anedra): 30,06 g
- NaH₂PO₄.H₂O (fosfato monobásico de sodio, monohidratado, Anedra): 2,56 g
- NaCl (cloruro de sodio, Anedra): 87,60 g

Se disolvió todo en H₂O_d (ROUX) hasta alcanzar un volumen de un litro y para trabajar (PBS 1X), se preparó una dilución 1:10 con H₂O_d (ROUX).

Solución enzimática utilizada para la digestión de tejido tumoral:

- | | |
|---|-------|
| - Tripsina (Gibco) | 0,25% |
| - Colagenasa Tipo II (Gibco) o tipo IV Sigma (AE: 485 U/mg) | 0,25% |
| - Albúmina sérica bovina (BSA; Sigma) | 0,5% |

Se disolvió en PBS 1X y esteriliza por filtración (0,22 µm). Se lo fraccionó en tubos de 15 ml y se guardó a -20°C.

Solución de tripsina utilizada en los cultivos primarios tumorales:

Se disolvió tripsina (Gibco BRL, EE.UU.) 0,25%, en PBS 1X y esterilizó por filtración (0,22 µm). Se fraccionó en tubos de 50 ml y se guardó a -20°C.

Solución de tripsina-EDTA utilizada para líneas celulares:

Se disolvió tripsina (Gibco) 0,25% con EDTA (Laboratorios Cicarelli) 0,2% en PBS 1X y esterilizó por filtración (0,22 µm). Se fraccionó en tubos de 50 ml y se guardó a -20°C.

Medio de congelado de células

- | | |
|---|------|
| - SFB (Natocor, Córdoba, Argentina) | 20%. |
| - Glicerol (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina) | 10%. |
| - Medio de cultivo DMEM F12 | |

Se disolvió en DMEM F12 hasta llegar a 100 ml. Se esterilizó por filtración (0,22 µm), fraccionó en tubos de 50 ml y guardó a -20°C hasta su uso.

Buffer A

- | | |
|---|----------|
| - Tris (Invitrogen) | 40,27 gr |
| - EDTA (Laboratorios Cicarelli) | 55,8 mg |
| - Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Merck) | 0,491 gr |

Se disolvió en 100 ml de H₂O_d (ROUX) y llevó a pH 7 con NaOH y HCl 1 M. Se guardó a 4°C.

Buffer RIPA

- | | |
|--------------------------------|-----------|
| - Tris (Invitrogen) | 0,121 gr |
| - NaCl (Anedra) | 0,876 gr |
| - Vanadato de sodio (Sigma) | 0,0367 gr |
| - Deoxicolato de sodio (Sigma) | 1 gr |

- SDS (Merck) 0,1 gr
- IgepalCA-630 (Sigma) 1 ml

Se disolvió en 100 ml de H₂O_d (ROUX) y llevó a pH 7,5 con NaOH y HCl 1 M. El *buffer* se guardó a 4°C.

Inhibidores de proteasas

- Inhibidor de serin-proteasas PMSF100X (Sigma, 0,5 mM) 174,2 mg
- Cóctel de inhibidores de proteasas 100X
- ZPCK (Sigma, 0,025 mM) 16,4 mg
- TLCK (Sigma, 0,025 mM) 18,4 mg
- TPCK (Sigma, 0,025 mM) 17,74 mg
- TAME (Sigma, 0,025 mM) 18,8 mg

Para ambas soluciones, se disolvieron los inhibidores en 20 ml de etanol absoluto, se fraccionó en tubos de 1,5 ml y guardó a -20°C.

Acilamida 30%:

- Acilamida (Invitrogen) 29 gr
- Bisacilamida (Invitrogen) 1 gr

Se disolvió en 100 ml de H₂O_d (ROUX) en agitación durante 30 min. La solución se filtró (0,45 µm) y guardó a 4°C, protegida de la luz.

Tris-HCl 1.0 M pH 6,8

Se disolvieron 60,57 gr de Tris (Invitrogen) en 400 ml de H₂O_d (ROUX) y llevó a pH 6,8 con HCl 1 M. Luego se completó el volumen hasta 500 ml con H₂O_d (ROUX) y guardó a 4°C.

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Se disolvieron 90,85 gr de Tris (Invitrogen) en 400 ml de H₂O_d (ROUX) y llevó a pH 8,8 con HCl1M. Luego se completó el volumen hasta 500 ml con H₂O_d (ROUX) y guardó a 4°C.

SDS 10%

Se disolvieron 10 gr de SDS (Merck) en 100 ml de H₂O_d (ROUX). Se guardó a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio 10% (APS)

Se disolvió 1 gr de APS (GE Healthcare) en 10 ml de H₂O_d (ROUX). Se fraccionó en tubos de 1,5 ml y guardó a -20°C.

TBS 10X pH 7,4

- Tris (Invitrogen) 60,6 g
- NaCl (Anedra) 87,6

Se llevó a un litro con H₂O_d y se diluyó 1:10 en H₂O_d antes de usar (TBS 1X).

TBS-T (TBS 1X-Tween 0.1%)

Se agregó 1 ml de Tween 20 (Anedra) por cada litro de TBS 1X pH 7,4.

Cracking Buffer o solución de siembra 4X

- SDS (Merck) 8 %
- β- mercaptoetanol (Sigma) 20 % v/v
- Glicerol (Sintorgan) 40 %
- Tris (Invitrogen) 0,25 M
- Azul de Bromo Fenol (Sigma) 0,04 % p/v

Se diluyó todo en H₂O_d (ROUX), fraccionó en tubos de 1,5 ml y guardó a -20°C.

Buffer de corrida 10X

- Tris (Invitrogen) 30 gr
- Glicina (Invitrogen) 144 gr
- SDS (Merck) 10 gr

Se disolvió en un litro de H₂O_d y se lo guardó a 4°C. Para su uso se diluyó 1:10 en H₂O_d (*buffer* de corrida 1X).

Buffer de transferencia

- *Buffer* de corrida 1X 800 ml
- Metanol para análisis (Laboratorios Cicarelli) 200 ml

Marcador de peso molecular

Page Ruler pre-stained molecular ladder (Life Technologies).

Se utilizó 2 µl en cada gel.

Membrana de nitrocelulosa

Hybond C (0,45 μm ; Amersham).

Solución de bloqueo

- Se disolvió leche descremada en polvo 5% en TBS-T.
- Se disolvió BSA 5% en PBS 1X.

Sustrato quimioluminiscente

Se mezclaron las soluciones (A) y (B) y se colocó el resultante sobre las membranas de nitrocelulosa durante un minuto antes de exponer las películas fotográficas.

A) 4,6 ml de H_2O_d (ROUX) + 333 μl Tris pH 8,8 + 50 μl luminol + 22 μl ácido cumárico.

B) 4,6 ml de H_2O_d (ROUX) + 333 μl Tris pH 8,8 + 22 μl H_2O_2 (Parafarm, 30 vol).

- Luminol (A8511, Sigma): 22 mg en 500 μl de DMSO
- Ácido cumárico (C9008, Sigma): 7,5 mg en 500 μl de DMSO

PBS pH 7,4

- | | |
|--------------------------------------|--------|
| - NaCl (Anedra) | 0,8% |
| - KCl (Anedra) | 0,02% |
| - Na_2HPO_4 (Anedra) | 0,144% |
| - KH_2PO_4 (Anedra) | 0,024% |

Se disolvió en un litro de H_2O_d (ROUX), llevó a pH 7,4 con NaOH y HCl 1 M y guardó a temperatura ambiente.

NaCl (0,15 M)

Se disolvieron 4,0908 g de NaCl en un litro de H_2O_d (ROUX), filtró (0,22 μm) y guardó a 4°C.

Citrato 10 mM

Se disolvieron 2,94 gr de citrato de sodio (Laboratorios Cicarelli) en un litro de H_2O_d ROUX. Se llevó a pH6 con NaOH y HCl 1 M.

Medios de montaje

- **Para IHQ:** DPX (Sigma). Conservado en oscuridad a temperatura ambiente.
- **Para IF:** Vectashield (Vector Labs). Conservado en oscuridad a 4°C.

Anestésias:

- Ketamina (Holliday - Scott S.A) 100mg/kg (0,05-0,06 ml por ratón adulto).
- Xilacina (Richmond Vet Pharma) 10mg/kg (0,005 ml por ratón adulto).

Colorantes utilizados

- Ioduro de propidio (IP): Se diluyó 1 µl de ioduro de propidio (Sigma) 1mg/ml en 1 ml de PBS 1X.
- DAPI: Se diluyó 1 µl de DAPI (Sigma) 1 mg/ml en 1 ml de PBS 1X.

Solventes

- Xileno (Laboratorio Cicarelli)
- Metanol absoluto (CH₃OH; Laboratorio Cicarelli)
- Formaldehído 37% (Laboratorio Cicarelli)
- Etanol absoluto (Laboratorio Cicarelli)
- Etanol 96° (Alcohol etílico, uso medicinal, Soria)

Detergentes

- Tween 20 (Anedra)
- Tritón X-100 (Anedra)
- SDS (Merck)

Fijadores

- **Paraformaldehído (PFA) 4%:** se disolvieron 4 gr de paraformaldehído (PFA - Sigma) en 100 ml de PBS 1X, se calentó y agitó para facilitar la disolución. Se preparó el PFA 4% el mismo día de uso y se lo enfrió a 4°C.
- **Formalina 10%:** se disolvieron 100 ml de formaldehído (Cicarelli) en 900 ml de PBS 1X. Se guardó a temperatura ambiente.

HORMONAS, ANTIHORMONAS Y REACTIVOS UTILIZADOS EN CULTIVO.

- FGF2 (provisto por el laboratorio del Dr. Baldi) 1-100ng/ml
- Inhibidor de FGFR BGJ398 (Selleckchem) 0,1-10 nM
- Inhibidor de FGFR PD 173074 (Pfizer) 0,1-10 μ M
- Progestágenos, antiprogestágenos y antiestrógenos:
 - o Mifepristona (MFP) o RU 38486 (Sigma Aldrich): 10⁻⁷ M
 - o Telapristona - Proellex (Repros Therapeutics Inc. TX, EE.UU.) 10⁻⁷ M
 - o Citrato de tamoxifeno (Laboratorios Gador) 10⁻⁷ M

HORMONAS, ANTIHORMONAS Y OTROS REACTIVOS UTILIZADOS IN VIVO

- Inhibidor de FGFR BGJ398 (Selleckchem): administrada de forma *ev.* por el seno retro-orbital o de forma oral con una sonda gástrica (10-30 mg/kg/día por medio).
- Mifepristona o RU 38486 (Sigma Aldrich): administrada de forma *sc.* en *pellets* de 6 mg.
- 17- β estradiol (Sigma Aldrich): administrada de forma *sc.* en *pellets* de 0,25 mg.

ANTICUERPOS UTILIZADOS

- **Anticuerpos primarios:** a continuación, se detallan todos los anticuerpos primarios utilizados. Para *Western blot* todos los anticuerpos primarios fueron incubados en TBS-T 1X y la concentración se detalla en la **Tabla ap-1**. Para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, la dilución de todos los anticuerpos primarios y secundarios fue de 1/100 en SFB 5% en PBS 1X.

Nombre	Marca	Hecho en	Concentración utilizada	Técnica
FGF2 (147) sc-79	Santa Cruz	Conejo (policlonal)	1/100	WB, IHQ, IF
FGFR1 (Fig, C-15) sc-121	Santa Cruz	Conejo (policlonal)	1/100	WB, IHQ
FGFR2 (Bek, C-17) sc-122	Santa Cruz	Conejo (policlonal)	1/100	WB, IHQ
ERK (K-23) sc-94	Santa Cruz	Conejo (policlonal)	1/1000	WB
pERK (E-4) sc-7383	Santa Cruz	Ratón (policlonal)	1/1000	WB
MUC1 (ab-45167)	Abcam	Conejo (monoclonal)	1/200	IHQ
α SMA (ab-5694)	Abcam	Conejo (policlonal)	1/100	IHQ
RP (H-190) sc-7208	Santa Cruz	Conejo (policlonal)	1/500	WB
FRS2 (H-91) sc-8318	Santa Cruz	Conejo (policlonal)	1/500	WB
pFRS2 (Y196) #38645	Cell Signaling	Conejo (policlonal)	1/100	WB
S6 (S240/244) 2215S	Cell Signaling	Conejo (monoclonal)	1/1000	WB
pS6 (5G10)	Cell Signaling	Conejo (monoclonal)	1/1000	WB

Tabla ap-1. Anticuerpos utilizados en *Western blot* (WB), Inmunohistoquímica (IHQ) e Inmunofluorescencia (IF).

- Anticuerpos secundarios para IF: 1/100

- Anti-IgG de conejo (Texas Red, realizado en cabra, Vector).

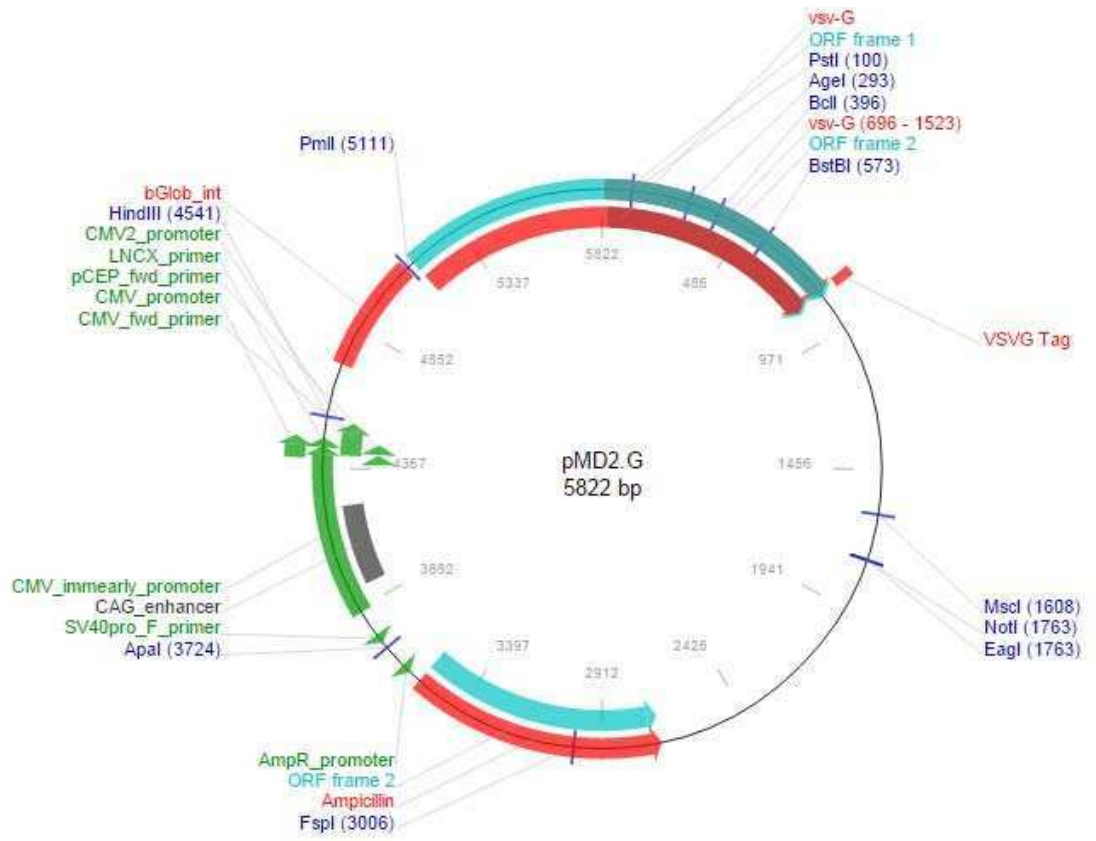
- Anticuerpos secundarios para IHQ: 1/400

- Anti-IgG de conejo biotinilado (realizado en cabra, Vector).

- Anticuerpos secundarios para Western blot: 1/2000

- Anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (PI-2000, Vector).
- Anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (PI-1000, Vector).

- Plásmido de empaquetamiento viral



- Plásmido con isoforma del FGF2

