



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Activación de la vía de WNT y receptores de
andrógenos inducidos por FGF2: participación en la
progresión del cáncer de mama**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Prof. Marcela Inés Coianis

Directora de tesis: Dra. Caroline Ana Lamb

Consejero de estudios: Dr. Alejandro Colman-Lerner

Lugar de trabajo: Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal; Instituto de Biología y
Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Ciudad de Buenos Aires, 2026

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis compañeros, a la directora del laboratorio *Dra. Claudia Lanari* y, en especial a mi directora de tesis, la *Dra. Caroline Lamb*. Ellos me ofrecieron enseñanzas valiosas convirtiéndose en modelos cotidianos en la práctica científica, dentro de un espacio de convivencia, desafío y exigencia constantes, que supuso aprender a dialogar, compartir y crecer juntos. Asimismo, al resto de los integrantes del instituto IBYME, cuyas miradas, líneas de trabajo y formas de ser aportaron visiones nuevas y complementarias y, casi sin darse cuenta, se transformaron en referentes silenciosos pero decisivos en este recorrido.

A todas aquellas personas que, en etapas anteriores, dejaron una huella formativa: profesores del colegio y de la facultad, colegas con quienes compartí proyectos y espacios de trabajo, quienes valoraron y confiaron en mí desde los inicios. La verdadera grandeza de esas personas reside en su generosidad: en no escatimar tiempo ni saberes, en apoyar sin mezquindades. En tiempos difíciles, regresan a la memoria esos gestos generosos y desinteresados que impulsaron a seguir adelante, como los del *Dr. José Hodak*, quien es además un gran referente científico.

El agradecimiento más profundo es para mi familia, y en particular para mis padres, *Mirta y Aldo*, por acompañar cada etapa de este proceso, sostener con paciencia y afecto las incertidumbres y los cansancios y estar presentes, de manera incondicional, en todo momento y circunstancia; no solo en este último tramo académico, sino desde siempre, siendo un ejemplo permanente de esfuerzo, coherencia y familia.

Resulta imposible no mencionar a las generaciones de estudiantes con las que tuve la oportunidad de estar en el aula, así como a los colegas docentes, con quienes compartimos los momentos más humanos de la vida académica. Con sus miradas y trayectorias diversas, mantuvieron abierta la puerta a nuevas perspectivas y realidades, recordando que el conocimiento se construye en diálogo y para la comunidad, y que la formación personal cobra sentido cuando se orienta hacia otros.

Gracias a la docencia, pude conservar un vínculo vivo con el mundo. El aula se convirtió en un espacio de creatividad y expresión, y todo ese trabajo volvió, transformado, en nuevas preguntas y modos de mirar lo que hago. Aunque implicó un esfuerzo muy grande, paradójicamente, se volvió uno de los principales apoyos y fuentes de sentido en este camino.

A quienes estuvieron cerca y a quienes lo hicieron posible, muchas gracias.

Activación de la vía de Wnt y receptores de andrógenos inducidos por FGF2: participación en la progresión del cáncer de mama

La resistencia endocrina representa un desafío para el tratamiento del cáncer de mama (CM). El factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) comprende una forma secretada de bajo peso molecular y otras variantes de alto peso molecular (HMW-FGF2). Previamente demostramos que la sobreexpresión de HMW-FGF2 induce resistencia endocrina, desregulación de la vía de Wnt, disminución de receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR), y aumento de receptores de andrógenos (AR).

En este trabajo, exploramos los mecanismos implicados en la progresión tumoral inducida por FGF2, enfocándonos en la regulación de AR mediada por Wnt. Utilizamos líneas endocrino-resistentes, T47D-HMW-FGF2 y T47D-YB, y sensibles, T47D-vacío e -YA. El tratamiento con inhibidores de Wnt redujo la proliferación celular inducida por andrógenos y los niveles de AR en modelos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* con xenotransplantes derivados de pacientes (PDX). Ensayos de CHIP mostraron que el inhibidor de Wnt disminuye el reclutamiento de β -catenina y TCF4 en el promotor de AR. En muestras de pacientes con expresión diferencial de isoformas del PR o negativas para PR, subtipos tumorales con mayor riesgo de recurrencia, se observó una correlación entre la expresión de AR, FGF2 y ligandos de la vía de Wnt.

Estos hallazgos destacan la relevancia del eje FGF2-Wnt-AR en la progresión del CM luminal resistente a la terapia endocrina y sugieren el uso de nuevas estrategias terapéuticas combinadas.

Palabras clave: cáncer de mama, resistencia endocrina, receptor de andrógenos, señalización Wnt, terapia dirigida, modelos PDX.

FGF2-mediated activation of Wnt and androgen receptors pathways: involvement in breast cancer progression

Endocrine resistance remains a major challenge in breast cancer (BC) treatment. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) includes a secreted low form and several high molecular weight (HMW-FGF2) isoforms. We previously showed that HMW-FGF2 overexpression induces endocrine resistance, WNT pathway dysregulation, downregulation of estrogen (ER) and progesterone receptors (PR), and increased androgen receptor (AR) expression. In this study, we investigated the mechanisms driving FGF2-induced tumor progression, focusing on Wnt-mediated regulation of hormone receptors.

We used endocrine-resistant T47D-HMW-FGF2 and T47D-YB cell lines, and their sensitive counterparts, T47D-empty and -YA, to assess Wnt component expression and AR interaction. Treatment with WNT inhibitors reduced androgen-induced cell proliferation and AR levels in *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo* patient-derived xenografts (PDX) models. ChIP assays revealed that WNT inhibition decreased β -catenin and TCF4 recruitment to the AR promoter. In patient samples with differential PR isoform expression or PR loss, we observed a correlation between AR, FGF2, and WNT ligand expression.

These findings underscore the relevance of the FGF2-WNT-AR axis in luminal BC progression and endocrine therapy resistance and support the potential of combined therapeutic strategies targeting WNT and AR pathways.

Keywords: breast cancer, endocrine resistance, androgen receptor, Wnt signaling, targeted therapy, PDX models.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
HORMONAS Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA	10
Receptores esteroides	10
Receptores de estrógenos	13
Receptores de progesterona	14
Antiprogestágenos	15
Receptores de andrógenos	15
Antiandrógenos	17
CÁNCER DE MAMA	17
Factores de riesgo para el CM	19
Factores genéticos	19
Factores hormonales y metabólicos	20
Factores ambientales	20
Estilo de vida	20
Otros factores	20
CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE MAMA	20
1. Clasificación Histológica	20
2. Clasificación Molecular (PAM50)	21
3. Estadificación del CM	21
TRATAMIENTO SISTÉMICO DEL CM	22
1. CM Luminal (ER ⁺)	22
2. CM HER2 ⁺	22
3. TNBC (ER ⁻ /PR ⁻ /HER2 ⁻)	23
PROGRESIÓN TUMORAL: RESISTENCIA, RECIDIVAS Y METÁSTASIS	23
MECANISMOS DE RESISTENCIA ENDOCRINA	24
Alteraciones en receptores hormonales	24
Activación de vías alternativas de señalización	24
Células madre tumorales y microambiente	24
Alteraciones genéticas, epigenéticas y del metabolismo de fármacos	24
FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS	25
FGF2 EN CM	27
VÍA DE WNT	27
VÍA CANÓNICA Y NO CANÓNICA DE WNT	28
Vía Canónica de Wnt	28
Vía No Canónica de Wnt	30
WNT EN CM Y OTROS TIPOS DE CÁNCER	32
ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DIRIGIDAS A LA VÍA DE WNT	32
INTERRELACIÓN ENTRE LAS VÍAS DE WNT Y OTRAS VÍAS	33
Crosstalk entre Wnt y ER	34
Crosstalk entre Wnt y AR	34
Crosstalk entre Wnt y EGFR y PI3K/AKT/mTOR	35

ANTECEDENTES	36
Isoformas de PR y resistencia endocrina	36
Isoformas de FGF2 y progresión tumoral	37
Isoformas de FGF2, regulación de la expresión de receptores hormonales y desregulación de vías	38
Expresión de AR en muestras de pacientes con CM luminal	41
HIPÓTESIS	43
OBJETIVOS	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR	45
Líneas celulares utilizadas	45
Líneas celulares con expresión diferencial de isoformas de PR	45
Líneas que sobreexpresan FGF2	45
Mantenimiento de líneas celulares	45
Medios y soluciones	45
Repique celular	45
Congelamiento y almacenamiento de líneas celulares	46
Ensayos de proliferación celular	46
ENSAYOS DE WESTERN BLOT (Wb)	46
Preparación de extractos celulares	47
Extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas	47
Preparación de extractos tumorales	47
Cuantificación de proteínas	47
Corrida electroforética y revelado	48
ENSAYOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA	48
Soluciones y anticuerpos	48
Inmunohistoquímica (IHQ)	48
Inmunocitoquímica	49
ENSAYOS PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARNm	49
Extracción de ARN total	49
PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa reversa (RT-qPCR)	49
Electroforesis en gel de agarosa	50
ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	50
Animales	50
Inoculación de líneas celulares	50
Valoración del crecimiento tumoral	50
Toma de muestras tumorales	51
Detección de focos metastásicos	51
Tratamientos hormonales de líneas T47D	51
MODELOS DE XENOINJERTO DERIVADOS DE PACIENTES (PDX)	52
Ensayos <i>in vivo</i> : PDX707	52
Ensayos <i>in vivo</i> : PDX781	52

Ensayos <i>ex vivo</i> : PDX767	52
ENSAYOS DE ELISA	53
ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)	53
ENSAYOS CON MUESTRAS DE PACIENTES	54
Datos públicos METABRIC	54
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
RESULTADOS	57
Parte I: Vía canónica de Wnt	57
Modelos endocrino resistentes T47D-HMW y T47D-YB. Ensayos <i>in vitro</i>	57
Ligandos WNT4 y WNT6	57
Correceptor LRP6	59
Otros componentes de la vía canónica de Wnt	61
Modelo endócrino resistente T47D-HMW. Ensayos <i>in vivo</i>	64
Modelo endócrino resistente T47D-LMW <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	68
Inhibición de la vía de Wnt con LGK-974 en modelos resistentes	73
Parte II: Mecanismo	76
Efecto de andrógenos y antiandrógenos sobre la proliferación celular	76
Efecto de inhibidores de la vía de Wnt sobre la proliferación celular	82
Crosstalk AR-Wnt: proliferación celular	84
Crosstalk AR-Wnt: expresión de AR	87
Crosstalk AR-Wnt: ensayos de ChIP	91
Crosstalk AR-Wnt: PDX	93
PDX767 – ensayo <i>ex vivo</i>	93
PDX781 – ensayo <i>in vivo</i>	95
Parte III: Modelos <i>in vivo</i>: vía de AR	99
Efecto de testosterona sobre el crecimiento tumoral de modelos luminales PRB-H y PR ⁻ con E2	99
Efecto de testosterona sobre el crecimiento tumoral de modelos luminales PRB-H en ausencia de E2	102
Parte IV: Muestras humanas	106
Caracterización clínica y molecular de la cohorte	106
Expresión de AR en relación con parámetros clínico-patológicos	108
Expresión de Ki-67 y AR nuclear	110
Expresión de AR en pacientes categorizados según expresión de PR e isoformas de PR	112
Expresión de FGF2 en relación con parámetros clínico-patológicos	114
Expresión de Ki-67 y FGF2 nuclear	116
Expresión de FGF2 en pacientes categorizados según expresión de PR e isoformas de PR	117
Asociación AR-FGF2 por <i>Wb</i> e <i>IHQ</i>	121
Expresión de los marcadores WNT4 y WNT6 en pacientes con CM	123
WNT4	123
WNT6	126
Sobrevida global en nuestra cohorte de pacientes	128
Subgrupos ER ⁺ PR ⁺ , ER ⁺ PR ⁻ , PRA-H y PRB-H	128
Estratificación por expresión de AR: subgrupos ER ⁺ PR ⁺ , ER ⁺ PR ⁻ , PRA-H y PRB-H	129
Estratificación por expresión de FGF2: subgrupos ER ⁺ PR ⁺ , ER ⁺ PR ⁻ , PRA-H y PRB-H	132

DISCUSIÓN	135
Parte I- Vía canónica de Wnt	135
Expresión y activación de la vía de Wnt en CM y resistencia endocrina	135
Actividad de la vía de Wnt: β -catenina	136
Evidencias de activación de la vía de Wnt por LMW-FGF2	136
Parte II- Mecanismo	137
Crosstalk FGF2-AR-Wnt	137
Propuesta terapéutica: inhibidores de la vía de Wnt y AR	138
El rol del FGFR según la isoforma de FGF2	139
Parte III - Modelos <i>in vivo</i>: vía de AR	140
Propuesta terapéutica con andrógenos o antiandrógenos: una estrategia condicionada por la presencia de E2	140
Parte IV- Muestras humanas	141
Muestras de pacientes: limitaciones y ventajas	141
AR y FGF2 como biomarcadores en subgrupos ER ⁺ PR ⁻ y PRB-H	142
Sobrevida global	142
CONCLUSIONES	144
APÉNDICE	145
ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR	145
Medios y soluciones	145
Ensayos de proliferación celular	145
Plásmidos	146
ENSAYOS DE <i>Wb</i>	147
Soluciones	147
Buffers de extracción de proteínas:	147
Cuantificación de proteínas:	147
Soluciones para SDS-PAGE:	147
Buffers de lavado y bloqueo:	147
Otros reactivos:	147
ENSAYOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA	147
Soluciones	147
ANTICUERPOS PRIMARIOS	148
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	149
BIBLIOGRAFÍA	150

ABREVIATURAS

AR – Receptor de andrógenos

BSA – Albúmina sérica bovina

CBP/p300 – Coactivadores CREB-*binding protein*/ p300

ChIP – Inmunoprecipitación de cromatina

CM – Cáncer de mama

DBD – Dominio de unión al ADN

DHT – 5 α -dihidrotestosterona

E2 – 17 β -estradiol

EGFR – Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ELISA – Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima

ER – Receptor de estrógenos alfa

ESR1/2 – Gen del receptor de estrógenos alfa/beta

FGF2 – Factor de crecimiento fibroblástico 2

FGFR1/2/3/4 – Receptores del FGF

GFP – Proteína verde fluorescente

GR – Receptor de glucocorticoides

HER2 – Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HMW-FGF2 – Isoformas de alto peso molecular de FGF2 (22 KDa)

ICG-001 – Inhibidor de la interacción β -catenina/CBP

IHQ – Inmunohistoquímica

Ki-67 – Antígeno de proliferación celular Ki-67

LBD – Dominio de unión a ligando

LGK-974 (LGK) – Inhibidor de PORCN

LMW-FGF2 – Isoforma de bajo peso molecular de FGF2 (18 KDa)

MFP – Mifepristona (RU-486)

NSG – Ratones NOD/LtSz-scid/IL-2R γ null

PBS – Solución salina tamponada con fosfatos

PDX – Xenotrasplante derivado de paciente

PR – Receptor de progesterona

PRA/B – Isoforma A/B del receptor de progesterona

qPCR – PCR cuantitativa en tiempo real

RT-qPCR – PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa reversa

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

SERD – Degradadores selectivos del receptor de estrógenos

SERM – Moduladores selectivos del receptor de estrógenos

SFB– Suero fetal bovino

T47D-HMW – Línea T47D que sobreexpresa HMW-FGF2 (22 kDa)

T47D-LMW – Línea T47D que sobreexpresa LMW-FGF2 (18 kDa)

T47D-V – T47D infectada con vector vacío

T47D-YA – Línea T47D con isoforma A de PR

T47D-YB – Línea T47D con isoforma B de PR

TNBC – Carcinomas mamarios triple negativo

WB – *Western blot*

WNT – Familia de ligandos WNT

WNT4/6 – Ligando WNT4/6

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres y una causa principal de morbilidad, a pesar de los avances en diagnóstico y tratamiento (Bray et al, 2024). La mayoría de los tumores dependen inicialmente de la señalización mediada por receptores hormonales esteroideos, en particular de estrógenos y progesterona, lo que ha permitido el desarrollo de terapias endocrinas específicas (Louie & Seigny, 2017). No obstante, una proporción significativa de pacientes desarrolla resistencia, asociada a la plasticidad del fenotipo tumoral y a la activación de vías alternativas, entre ellas el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) y la vía Wnt/ β -catenina, que cooperan con los receptores hormonales para modular proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Turner & Grose, 2010; Zhan et al, 2017).

HORMONAS Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

El desarrollo de la glándula mamaria depende de una red finamente regulada de hormonas y factores de crecimiento que interactúan de manera compleja. Entender estos mecanismos es relevante tanto para la biología del desarrollo como para el abordaje del CM, en el que estas vías de señalización suelen encontrarse alteradas (Jena et al, 2023).

Receptores esteroideos

Los receptores hormonales son proteínas esenciales que median las respuestas celulares a hormonas en la glándula mamaria, un tejido altamente sensible a variaciones endocrinas. Los principales receptores implicados incluyen el receptor de estrógeno alfa (ER), el de progesterona (PR), el de andrógenos (AR), el de glucocorticoides y el de mineralocorticoides, cada uno con funciones específicas en el desarrollo mamario y en la carcinogénesis (Louie & Seigny, 2017).

Estos receptores actúan como factores de transcripción de la familia de receptores nucleares y comparten una organización modular con dominios bien definidos: un dominio A/B amino-terminal altamente variable que contiene el sitio de transactivación AF-1; un dominio de unión al ADN (C o DBD), muy conservado, con dos dedos de zinc que permiten la unión específica a elementos de respuesta y favorecen la dimerización; una región bisagra (D) poco conservada, que conecta el DBD con el dominio de unión al ligando y contiene señales de localización nuclear; y un dominio de unión al ligando (E o LBD), que reconoce hormonas esteroideas específicas, forma un bolsillo hidrofóbico para el ligando y

alberga el sitio de transactivación AF-2 responsable del reclutamiento de coactivadores (**Figura i-1**)(Kumar & Litwack, 2009).

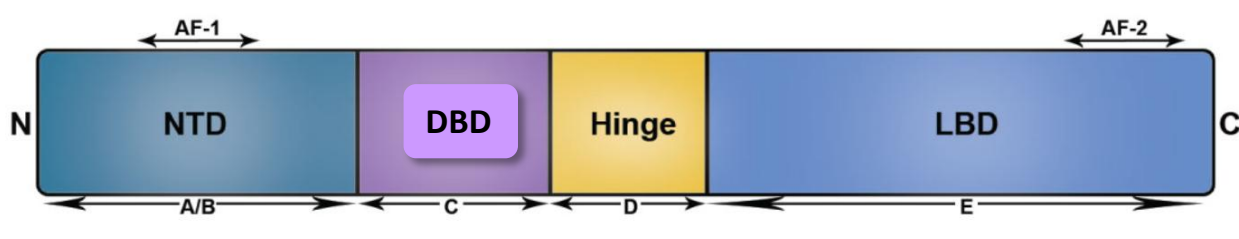


Figura i-1: Estructura modular de un receptor nuclear de esteroides, que muestra el dominio amino-terminal (NTD), el dominio de unión al ADN (DBD), la región bisagra (Hinge) y el dominio de unión al ligando (LBD), junto con los dominios de transactivación AF-1 y AF-2. Adaptado de (Saha et al, 2021).

El mecanismo de acción de los receptores hormonales se inicia con la unión del ligando al LBD, lo que induce un cambio conformacional, la liberación de proteínas de *shock* térmico y la dimerización del receptor. El complejo activado se transloca al núcleo, donde se une a elementos de respuesta hormonales en el ADN y activa o reprime la transcripción de genes blanco, regulando la proliferación y diferenciación de las células mamarias y, en consecuencia, el desarrollo mamario (Lavery & McEwan, 2005). Existen distintos modos de acción genómica, algunos estrictamente dependientes de ligando y otros modulados por vías activadas por factores de crecimiento. Estos modos de acción genómica y no genómica se resumen esquemáticamente en la **Figura i-2**.

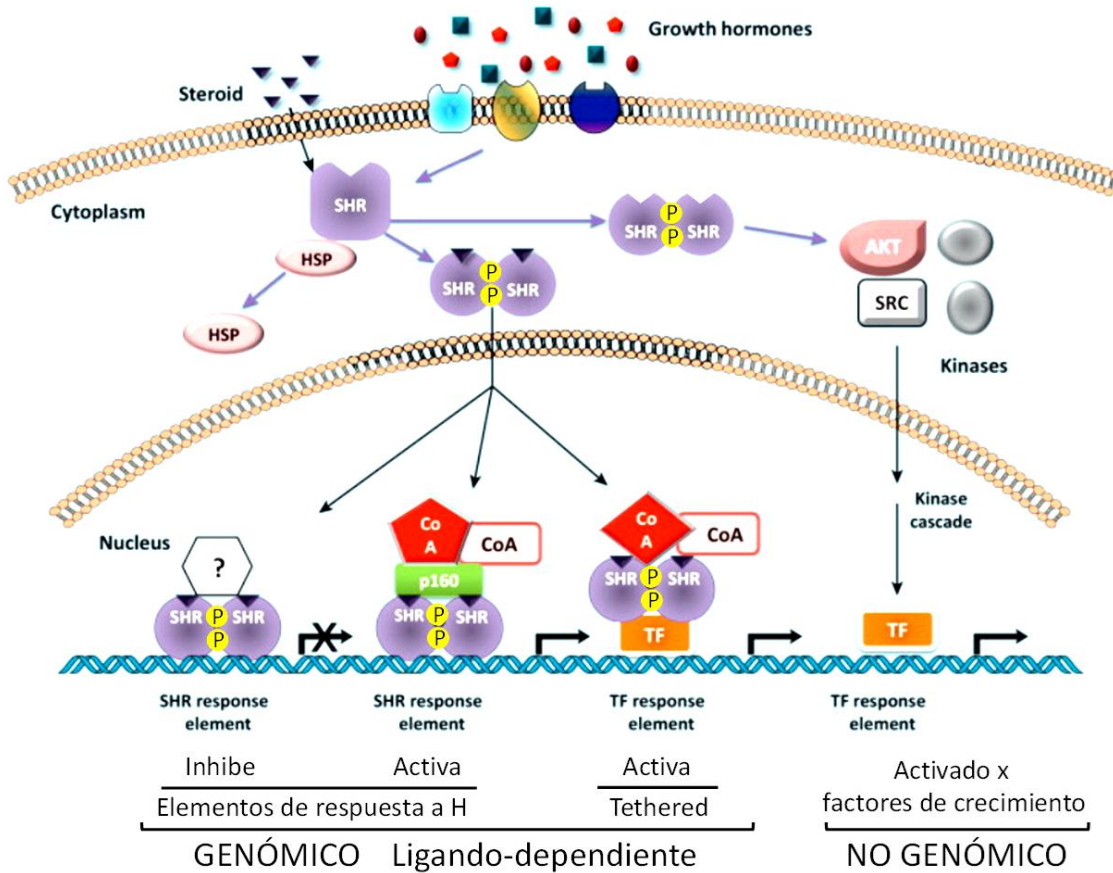


Figura i-2. Representación esquemática de los mecanismos de acción de los receptores hormonales de esteroides (SHR): ruta genómica clásica dependiente de ligando (activación o represión de genes mediante unión directa al ADN), acción “tethered” (activación de genes a través de la interacción del SHR con otros factores de transcripción) y efectos no genómicos mediados por cascadas de quinasas activadas por factores de crecimiento. Adaptado de (Trevino & Weigel, 2013).

La internalización de los receptores hormonales es otro nivel de regulación. Tras su activación, los receptores pueden ser internalizados hacia endosomas y dirigidos a reciclaje o degradación lisosomal, modulando la duración de la señal y la disponibilidad de receptores en la membrana (Willnow & Nykjaer, 2010).

En la glándula mamaria, las interacciones entre diferentes receptores esteroideos añaden complejidad a la respuesta hormonal: ER y PR cooperan en la regulación de genes clave durante la lactancia, mientras que AR puede antagonizar efectos estrogénicos en determinados contextos (Dai &

Ellisen, 2023). Esta plasticidad en la señalización contribuye a la resistencia a tratamientos hormonales en CM y a cambios en el fenotipo tumoral y en la respuesta terapéutica (Ravaioli et al, 2022).

Receptores de estrógenos

Los ER tienen dos isoformas principales, ER α y ER β , codificadas por los genes *ESR1* y *ESR2*, respectivamente. Estas isoformas difieren en su distribución tisular y en sus efectos fisiológicos, con roles tanto en la proliferación celular como en la diferenciación; ER α predomina en el tejido mamario, mientras que ER β se expresa con mayor frecuencia en ovario y próstata (Heldring et al, 2007; Nilsson & Gustafsson, 2011). Los ER se unen a elementos de respuesta a estrógenos en el ADN y regulan la transcripción de genes asociados al crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria (Ali & Coombes, 2000; Bjornstrom & Sjoberg, 2005).

El 17- β -estradiol (E2) es el estrógeno fisiológico más potente y resulta importante para diversos tejidos blanco, incluidos el tejido mamario, el aparato reproductor, el sistema cardiovascular y el tejido óseo. En ausencia de ligando, los ER se localizan principalmente en el citosol y, tras unirse al estrógeno, se translocan al núcleo donde actúan como factores de transcripción que modulan genes implicados en proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Riggs & Hartmann, 2003).

Cuando la señalización del ER se desregula pueden aparecer patologías como el CM, en el que alrededor del 70% de los carcinomas expresan este receptor. En estos tumores, el estrógeno favorece el crecimiento maligno al promover una proliferación excesiva y alterar los mecanismos de reparación del ADN, generando mutaciones que impulsan la progresión tumoral (Yersal & Barutca, 2014). Además, se ha descrito que el estrógeno puede inducir reordenamientos genómicos, lo que respalda su participación tanto en la iniciación como en la progresión del cáncer (Yasuda et al, 2017).

Para el tratamiento de carcinomas ER-dependientes se han desarrollado terapias dirigidas, como los moduladores (SERMs) y los degradadores selectivos del ER (SERDs), que bloquean la señalización mediada por ER y reducen la proliferación tumoral. El elacestrant, un SERD aprobado recientemente, ha mostrado eficacia en CM avanzado con mutaciones en *ESR1*, superando en algunos casos la resistencia a terapias hormonales estándar, y refuerza la relevancia de la caracterización molecular del tumor para optimizar la elección terapéutica y disminuir el riesgo de recurrencia en pacientes con CM ER⁺ (Bidard et al, 2022).

Receptores de progesterona

Los PR, principalmente las isoformas A (PRA) y B (PRB), cumplen un rol clave en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la homeostasis de diversos tejidos, incluida la glándula mamaria. Ambas isoformas se transcriben a partir del mismo gen, *PGR*, mediante dos sitios de inicio de transcripción distintos y se unen a elementos de respuesta a progesterona (PRE) en el ADN para modular la transcripción génica en presencia de la hormona (Briskin, 2002). Las isoformas, aunque estructuralmente relacionadas, difieren funcionalmente: PRB suele comportarse como un activador transcripcional completo, mientras que PRA puede inhibir la actividad de PRB y de otros receptores esteroideos, confiriendo especificidad según el contexto tisular y hormonal (Aupperlee et al, 2005).

PRB posee una extensión de 164 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal respecto de PRA, lo que contribuye a sus diferencias en capacidad transcripcional y en la regulación de procesos celulares (Giulianelli et al, 2021). La organización modular de las isoformas PRA y PRB se resume en la **Figura i-3**.

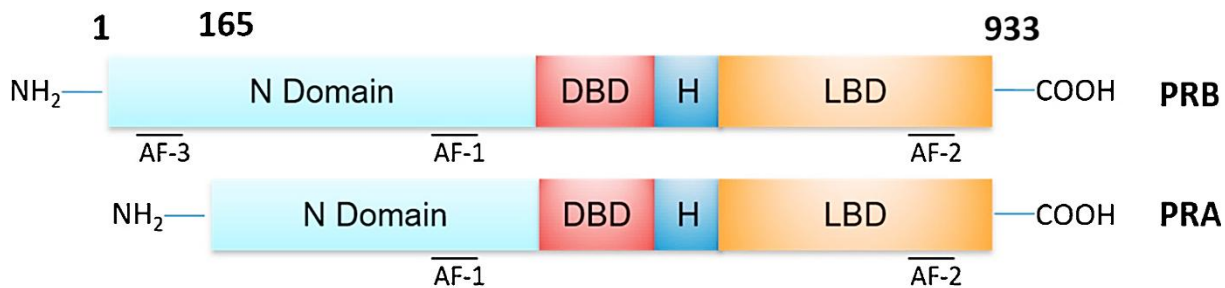


Figura i-3. Estructura de las isoformas PRA y PRB del receptor de progesterona, mostrando sus dominios funcionales (dominio amino-terminal, dominio de unión al ADN [DBD], región bisagra [H] y dominio de unión al ligando [LBD]) y los sitios de activación transcripcional (AF-1, AF-2, AF-3). Adaptado de (Chen et al, 2017).

En el tejido mamario, los PR son necesarios para la proliferación y el desarrollo glandular en respuesta a estímulos hormonales del ciclo reproductivo y la pubertad. Su actividad depende de la interacción con coactivadores como CBP/p300 y SRA, que potencian la transcripción de genes implicados en la proliferación celular y la diferenciación (Giulianelli et al, 2021; Waddell et al, 2021). En el contexto de CM, las alteraciones en la expresión relativa de PRA y PRB, o la sobreexpresión de PRB, pueden favorecer la proliferación y la supervivencia tumoral, lo que destaca a los PR como posibles blancos terapéuticos en subgrupos de tumores luminales (Giulianelli et al, 2021).

Antiprogestágenos

Los antiprogestágenos son compuestos que inhiben la acción de la progesterona al unirse al PR y modular la activación del receptor, su dimerización o su unión a secuencias específicas en el ADN (Guiochon-Mantel et al, 1994). Su mecanismo de acción sustenta su uso tanto en control reproductivo como en terapias oncológicas, incluido el CM y el cáncer de endometrio (Gellersen & Brosens, 2014).

Algunos antiprogestágenos presentan sólo actividad antagonista (ej. Lonaprisan) y otros denominados SPRMs (del inglés *Selective Progesterone Receptor Modulators*) pueden actuar tanto como agonistas o antagonistas según el contexto, por ej. mifepristona y acetato de telapristona; (Colucci & Ortlund, 2013)

En CM, la mifepristona (RU-486) es un SPRM que ha mostrado efectos antitumorales en modelos preclínicos y en estudios clínicos (Giulianelli et al, 2013; Lanari & Molinolo, 2002). Otros compuestos, como el acetato de ulipristal y el acetato de telapristona (J867), también se han evaluado por su capacidad para reducir la proliferación en tumores hormono-dependientes, apoyando el potencial de la vía de PR como blanco terapéutico en subgrupos de CM (Giulianelli et al, 2021).

Además, algunos antiprogestágenos pueden modular también la señalización mediada por ER y AR, y alterar la expresión de genes regulados por estrógenos y andrógenos, lo que pone de relieve la complejidad de la interrelación entre las vías hormonales que pueden impactar tanto en el ciclo menstrual como en la carcinogénesis (Jacobsen & Horwitz, 2012; Singhal et al, 2018).

Receptores de andrógenos

Los AR son factores de transcripción activados por andrógenos como la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT), y regulan el crecimiento y la diferenciación de múltiples tejidos dependientes de hormonas. El AR está codificado por el gen *AR*, compuesto por ocho exones, y genera varias isoformas por *splicing* alternativo, incluidas variantes truncadas como AR-V7 con actividad constitutiva independiente de ligando, implicadas en la resistencia a terapias hormonales en cáncer de próstata avanzado (**Figura i-4**) (Watson et al, 2015).

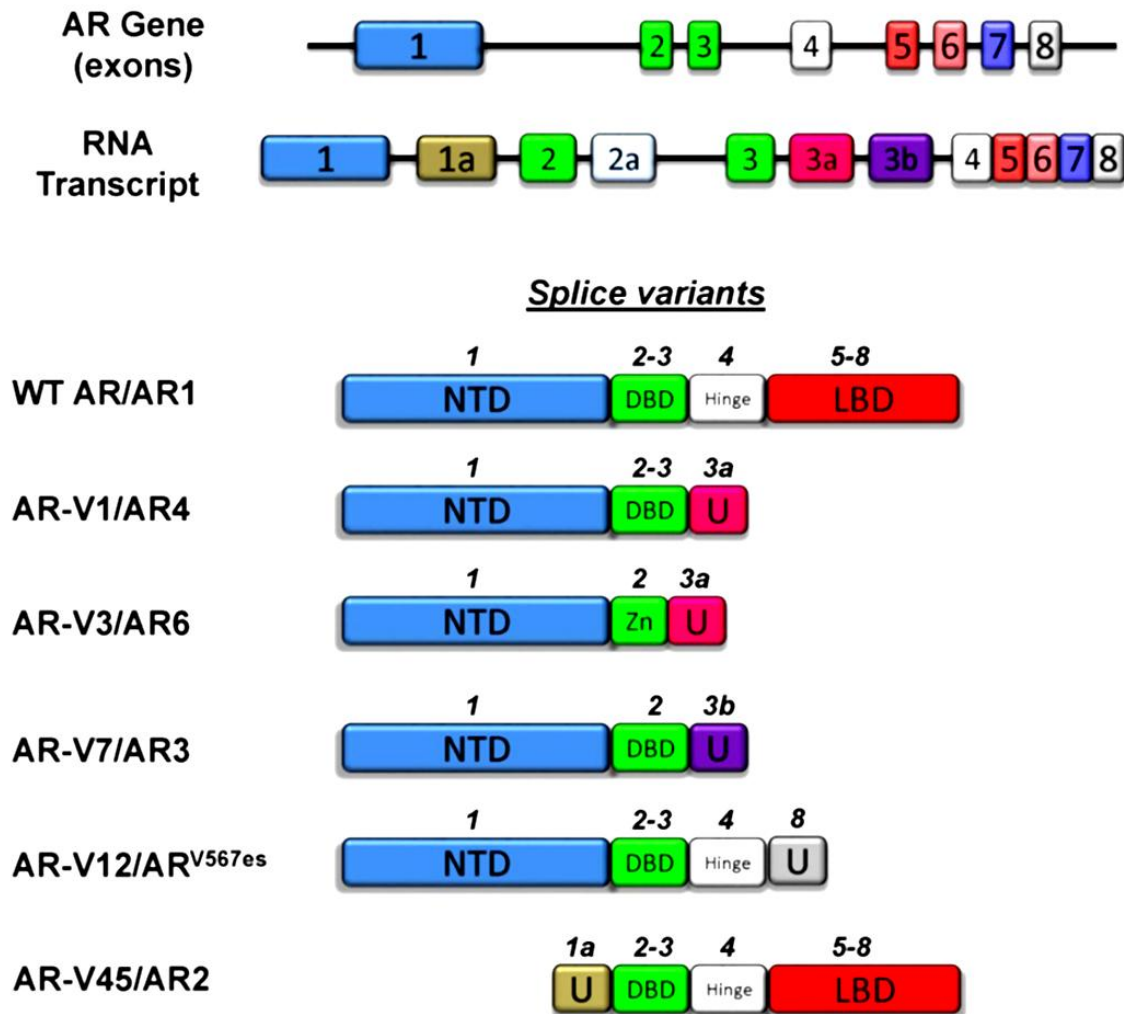


Figura i-4. Esquema de variantes de splicing de AR, mostrando la organización de exones en el gen (arriba) y las principales isoformas generadas por splicing alternativo, con sus respectivos dominios funcionales (NTD, DBD, región bisagra y LBD). Adaptado de (Lallous et al, 2013).

El AR se une a elementos de respuesta a andrógenos en el ADN para activar o reprimir genes relacionados con proliferación, diferenciación y apoptosis. Su actividad se modula mediante coactivadores como CBP/p300 y corepresores, y se ve influida por otros receptores esteroideos; en células mamarias, en particular, interacciona con ER y PR para mantener la homeostasis celular (Waddell et al, 2021). En la glándula mamaria, la expresión de AR puede limitar la proliferación excesiva inducida por estrógenos, lo que sugiere una función protectora en ciertos contextos (Giovannelli et al, 2018).

En el cáncer de próstata, el AR es central para la progresión tumoral y la aparición de resistencia a la castración; las isoformas truncadas que carecen del dominio de unión a andrógenos pero conservan la capacidad transcripcional contribuyen a mantener la señalización en ausencia de andrógenos circulantes (Watson et al, 2015). En el CM, en cambio, el impacto del AR depende del subtipo: en algunos tumores triple negativos (TNBC) su expresión se asocia a valor pronóstico y como posible blanco terapéutico (Michmerhuizen et al, 2020; Ravaioli et al, 2022). Tanto en CM como en cáncer de próstata, la inhibición del AR ha mostrado resultados variables y las variantes constitutivas AR-V se perfilan como blancos prometedores para superar la resistencia a las terapias actuales (Dai & Ellisen, 2023; Watson et al, 2015).

Antiandrógenos

Los antiandrógenos bloquean los efectos de los andrógenos al impedir que se unan a sus receptores o al inhibir la 5 α -reductasa que convierte testosterona en DHT. Ejemplos de los primeros incluyen la flutamida, enzalutamida, apalutamida y darolutamida, frecuentemente utilizados para el tratamiento de cáncer de próstata (Campodonico et al, 2024).

En CM, el rol de los agonistas y antagonistas de AR aún está en estudio. En la clínica, algunos ensayos en fase II y III con antiandrógenos como enzalutamida o bicalutamida, solos o en combinación con otros agentes, sugieren beneficio en subgrupos seleccionados de pacientes con tumores AR⁺, lo que justifica seguir explorando estrategias combinadas dirigidas a AR y a otras vías de señalización (Ravaioli et al, 2022).

CÁNCER DE MAMA

El CM es la neoplasia más frecuente en mujeres a nivel mundial (**Figura i-5**) (Bray et al, 2024; Zhang et al, 2025). En Argentina, el CM es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. Según GLOBOCAN 2022, la incidencia es de 73,2 casos por 100.000 mujeres y representa el 31,8% de todos los cánceres femeninos, mientras que la mortalidad alcanza 17,6 por 100.000 (**Figura i-6**), lo que pone de relieve la necesidad de reforzar los programas de tamizaje y asegurar el acceso a tratamientos oportunos y de calidad, tal como recomienda la IARC (**Figura i-6**) (Bray et al, 2024).

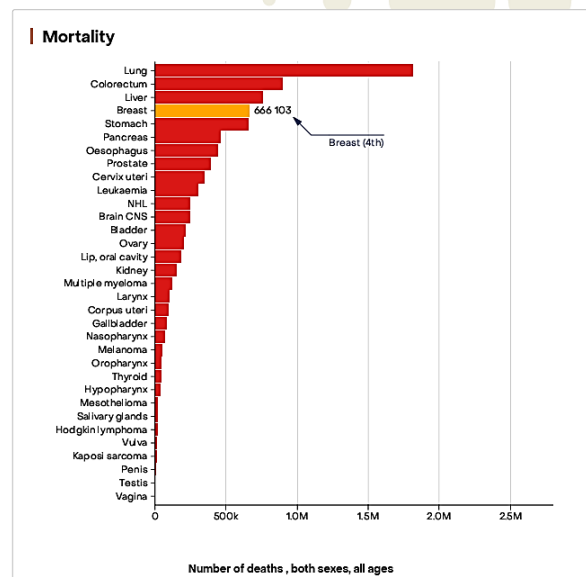
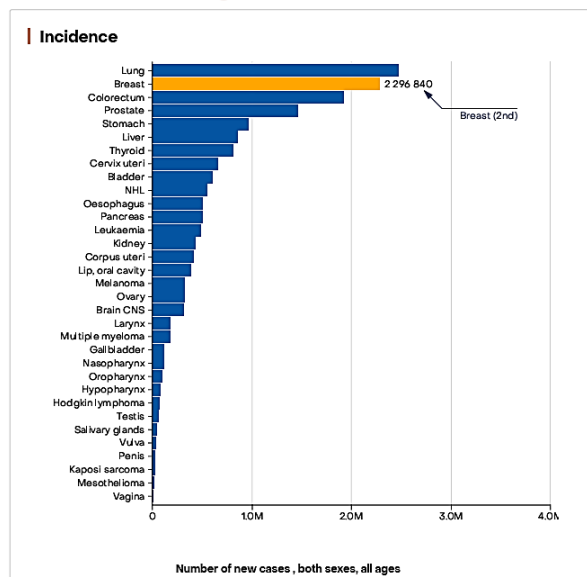
Incidence

Rank	Cases	ASR (World)
2	2 296 840	46.8

Mortality

Rank	Deaths	ASR (World)
4	666 103	12.7

Cancer site ranking



Mortality

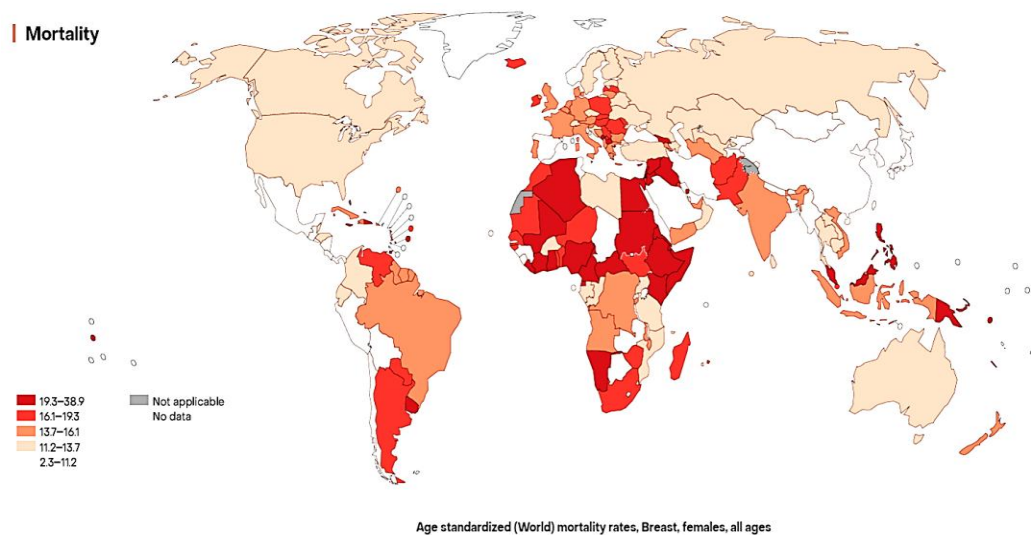


Figura i-5. Incidencia y mortalidad global por cáncer en 2022. Arriba: ranking de los tumores más frecuentes en ambos sexos según número de casos nuevos y fallecimientos, junto con las tasas estandarizadas por edad, cada 100.000 habitantes. Abajo: mapa mundial de mortalidad por cáncer de

mama en mujeres, con tasas de mortalidad estandarizadas por edad, cada 100.000 en cada país. Adaptado de (Bray et al, 2024).

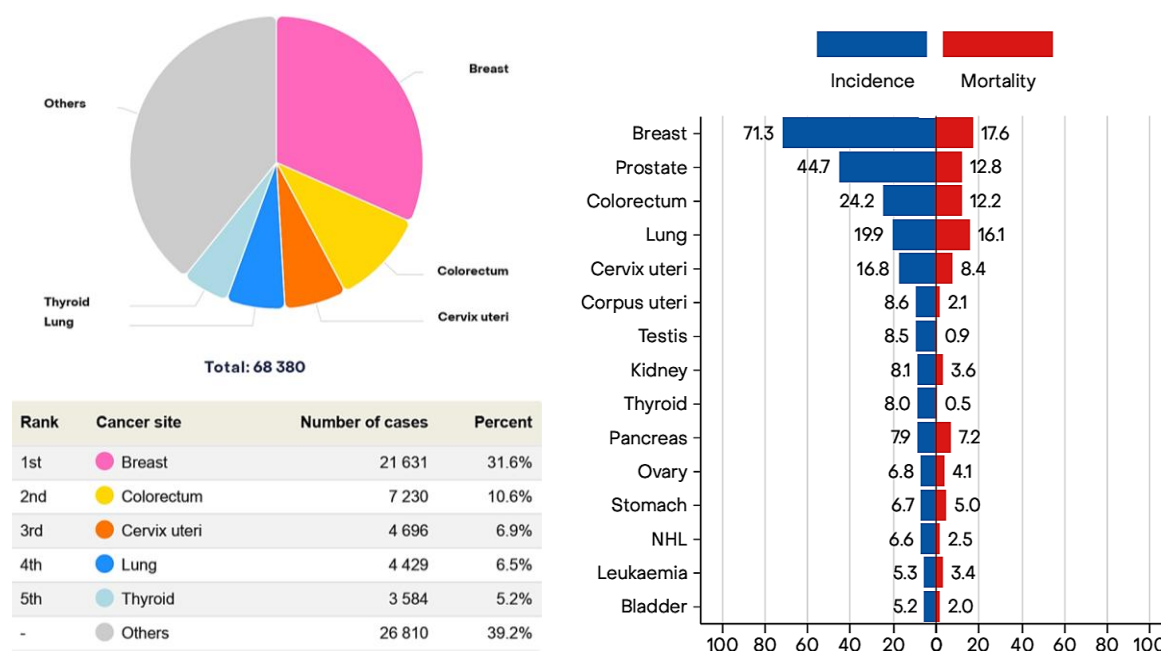


Figura i-6: Distribución de los principales cánceres en mujeres en Argentina en 2022. Proporción de casos nuevos por localización tumoral y número absoluto de casos para los 15 tumores más frecuentes (izquierda) y tasas estandarizadas de incidencia y mortalidad por 100.000 mujeres (derecha). Adaptado de (Bray et al, 2024).

Factores de riesgo para el CM

El CM es una enfermedad multifactorial cuya etiología está influenciada por factores genéticos, hormonales, ambientales y de estilo de vida. Identificar estos determinantes de riesgo es fundamental para diseñar estrategias de prevención y de detección temprana.

Factores genéticos

- Mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*: incrementan el riesgo de CM hasta alrededor de un 80% en mujeres portadoras (Kuchenbaecker et al, 2017).
- Historia familiar: tener familiares de primer grado con CM aumenta de forma significativa el riesgo (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, 2001).

Factores hormonales y metabólicos

- Exposición a estrógenos: menarca temprana, menopausia tardía, uso prolongado de terapia de reemplazo hormonal y de anticonceptivos orales se asocian con mayor riesgo (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, 2012).
- Obesidad y sedentarismo: especialmente en mujeres posmenopáusicas, por el aumento de la síntesis periférica de estrógenos en el tejido adiposo (Lauby-Secretan et al, 2016).

Factores ambientales

- Radiación ionizante en la infancia o adolescencia, en particular en el contexto de tratamientos oncológicos previos (Inskip et al, 2009).
- Exposición a determinados carcinógenos ambientales y ocupacionales (Brody & Rudel, 2003).

Estilo de vida

- Consumo de alcohol (Bagnardi et al, 2015).
- Tabaquismo, para el cual la evidencia es menos consistente, pero varios estudios sugieren un incremento moderado del riesgo (Jones et al, 2017; Macacu et al, 2015).

Otros factores

- Edad: la incidencia aumenta de forma marcada después de los 50 años (Colditz & Bohlke, 2014).
- Historia reproductiva: nuliparidad o primer embarazo a edad avanzada se asocian con mayor riesgo (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, 2012).

La interacción entre estos factores genéticos, hormonales y ambientales resalta la importancia de una evaluación integral del riesgo individual y de programas de educación y concientización dirigidos, especialmente en poblaciones de alto riesgo (Colditz & Bohlke, 2014).

CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE MAMA

La clasificación de los tumores de mama es fundamental para el diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico. En la práctica clínica se emplean principalmente criterios histológicos, moleculares y de estadio clínico.

1. Clasificación Histológica

- Carcinoma de mama invasivo de tipo no especial (NST): es el subtipo más frecuente, representa alrededor del 70–80% de los casos y se origina en el epitelio de la unidad ductolobulillar

terminal, con potencial de diseminarse a tejidos adyacentes (Tan et al, 2020).

- Carcinoma lobulillar invasivo (CLI): surge de los lobulillos mamarios, presenta rasgos histológicos distintivos y representa aproximadamente el 10–15% de los carcinomas invasivos (Arpino et al, 2004).
- Tumores especiales: incluyen subtipos menos frecuentes como los carcinomas medulares, mucinosos y papilares, entre otros (Slepicka et al, 2021).

2. Clasificación Molecular (PAM50)

La clasificación PAM50 es una prueba molecular que divide el CM en cinco subtipos intrínsecos (Luminal A, Luminal B, HER2 enriquecido (HER2⁺), Basal y Normal) basándose en la expresión de 50 genes, y se observó que correlaciona mayoritariamente con la expresión de receptores hormonales, HER2 y Ki-67, como se detalla a continuación.

- Luminal A: ER⁺, PR⁺, HER2⁻, Ki-67^{bajo}; tumores menos agresivos, con mejor pronóstico, que suelen responder bien a la terapia hormonal (tamoxifeno, inhibidores de aromatasas). Representan ~40–55% de los CM (Parker et al, 2009).
- Luminal B: ER⁺, PR^{+/-}, HER2^{+/-}, Ki-67^{alto}. Tienen pronóstico intermedio, y los casos HER2⁺ suelen ser más agresivos; suelen requerir combinación de terapia hormonal y quimioterapia. Constituyen ~15–20% de los casos (Parker et al, 2009).
- HER2⁺: ER⁻, PR⁻, HER2⁺; se asocian con mayor agresividad y riesgo de recurrencia, pero se benefician de terapias dirigidas anti-HER2 como trastuzumab y otros inhibidores de HER2. Aproximadamente 15–20% de los CM son HER2⁺ (Parker et al, 2009).
- Tipo Basal/TNBC: ER⁻, PR⁻, HER2⁻; tienen peor pronóstico, las opciones terapéuticas son más limitadas, basadas principalmente en quimioterapia, aunque en algunos casos los inhibidores de PARP son eficaces. Representan ~15–20% de los CM (Foulkes et al, 2010; Lehmann et al, 2011).

3. Estadificación del CM

Con el fin de guiar el tratamiento y pronóstico se utiliza el sistema TNM que hace referencia al tamaño tumoral (T), la diseminación locoregional a ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). A cada componente se le asigna un valor (T1-4, N1-4 y M0-1) y, según la combinación de estos valores se definen los estadios. Basado en (Amin et al, 2017).

- Estadio 0: carcinoma *in situ*.
- Estadio I: tumores pequeños sin compromiso ganglionar.

- Estadios II-III: tumores pequeños con compromiso ganglionar o tumores más grandes con o sin ganglios linfáticos regionales positivos. No presentan metástasis a distancia.
- Estadio IV: cualquier tamaño tumoral y compromiso ganglionar con presencia de metástasis a distancia.

TRATAMIENTO SISTÉMICO DEL CM

El tratamiento del CM ha evolucionado significativamente en las últimas décadas, adaptándose a los diferentes subtipos tumorales y mejorando las tasas de supervivencia. A continuación, se presentan los tratamientos aprobados por la *Food and Drug Administration* para los principales subtipos de CM, organizados según su clasificación hormonal y molecular.

1. CM Luminal (ER⁺)

- Luminal A:
 - Terapia hormonal: tamoxifeno o inhibidores de aromatasa (anastrozol, letrozol, exemestano), con o sin supresión ovárica según la edad y el riesgo (Burstein et al, 2019).
 - Quimioterapia: opcional y reservada sobre todo para pacientes con alto riesgo clínico o genómico.
- Luminal B:
 - Terapia hormonal similar a Luminal A, pero con mayor frecuencia combinada con quimioterapia debido a su comportamiento más agresivo.
 - Tratamientos dirigidos: inhibidores de CDK4/6 como palbociclib o ribociclib en combinación con endocrinoterapia han demostrado mejorar la supervivencia libre de progresión en enfermedad avanzada (Finn et al, 2016; Hortobagyi et al, 2016).

2. CM HER2⁺

- Terapias dirigidas anti-HER2, habitualmente asociadas a quimioterapia:
 - Trastuzumab, anticuerpo monoclonal frente a HER2, estándar en enfermedad temprana y metastásica (Slamon et al, 2001).
 - Pertuzumab, combinado con trastuzumab y quimioterapia, mejora la supervivencia en enfermedad avanzada (Swain et al, 2015).
 - Tucatinib, inhibidor selectivo de la tirosina quinasa de HER2, en combinación con trastuzumab (y capecitabina en muchos esquemas) para enfermedad metastásica,

incluida compromiso del SNC (Murthy et al, 2020).

3. TNBC (ER⁻/PR⁻/HER2⁻)

- Quimioterapia: sigue siendo la base del tratamiento, con esquemas que suelen incluir taxanos y antraciclinas en enfermedad temprana y avanzada (Cortes et al, 2022).
- Inmunoterapia: pembrolizumab combinado con quimioterapia ha mejorado los resultados en TNBC avanzado o metastásico seleccionado por PD-L1 (Schmid et al, 2020).
- Terapias dirigidas: inhibidores de PARP como olaparib están indicados en pacientes con mutaciones germinales en BRCA1/BRCA2 y CM HER2⁻ avanzado, aportando beneficios en supervivencia libre de progresión (Robson et al, 2017).

PROGRESIÓN TUMORAL: RESISTENCIA, RECIDIVAS Y METÁSTASIS

La resistencia a las terapias antitumorales puede ser innata o adquirida y suele implicar alteraciones en vías de señalización, cambios en la expresión de genes vinculados al metabolismo de fármacos y en el microambiente tumoral (de Melo Gagliato et al, 2020; Rexer & Arteaga, 2012).

Las recurrencias son frecuentes incluso tras respuestas terapéuticas iniciales favorables. La capacidad de algunas células tumorales para resistir el tratamiento, entrar en latencia y luego reactivarse se ha atribuido en parte a las células madre tumorales, que poseen propiedades de autorrenovación y diferenciación y pueden regenerar el tumor original (Liu & Wicha, 2010; Pece et al, 2010).

Las metástasis en CM constituyen la principal causa de mortalidad y comprende un proceso multietapa en el que células del tumor primario adquieren capacidad invasiva, migran y colonizan órganos distantes como hueso, hígado o pulmón. Este comportamiento depende de interacciones dinámicas con el microambiente y de cambios en las propiedades del tejido circundante (Oskarsson et al, 2014; Pece et al, 2010).

Entre los mecanismos moleculares implicados se destacan la regulación de microARN y la activación de vías de señalización como TGF- β y Notch, que promueven la transición epitelio-mesenquimal y facilitan la diseminación y colonización metastásica (Lamouille et al, 2014; Pannuti et al, 2010; Pencheva & Tavazoie, 2013). Además, la inmunosupresión local del microambiente tumoral, con remodelación de poblaciones inmunes efectoras y supresoras, puede favorecer la supervivencia y expansión de las células metastásicas (Binnewies et al, 2018).

MECANISMOS DE RESISTENCIA ENDOCRINA

Estudios clínicos y preclínicos han estimado que alrededor del 30–50% de las pacientes con CM ER⁺ desarrollan resistencia a la terapia endocrina dirigida a ER, ya sea *de novo* o adquirida (Kim et al, 2025; Musgrove & Sutherland, 2009). Entre los mecanismos descritos más frecuentes, podemos mencionar:

Alteraciones en receptores hormonales

- Mutaciones en *ESR1* generan formas del ER constitutivamente activas que escapan al bloqueo por SERMs o inhibidores de aromatasa, manteniendo la proliferación tumoral a pesar del tratamiento (Jeselson et al, 2015). Cambios en la fosforilación del ER y en su interacción con co-reguladores como p300 o NCoR, así como la variación en sus isoformas, también modifican su actividad transcripcional (Feng & Meng, 2022; Osborne & Schiff, 2011).
- La pérdida de expresión de PR impide la regulación cruzada ER/PR y puede favorecer la activación de vías como PI3K/AKT, asociándose con fenotipos más agresivos y heterogeneidad tumoral (Sathyamoorthy, 2020 (Sathyamoorthy & Lange, 2020)).

Activación de vías alternativas de señalización

- La activación de vías de factores de crecimiento, en particular PI3K/AKT/mTOR y RAS/MEK/ERK, permite a las células tumorales proliferar y sobrevivir independientemente de la señalización mediada por ER, constituyendo un mecanismo central de resistencia endocrina (Bianchini & Gianni, 2014; Miller et al, 2010).

Células madre tumorales y microambiente

- Las células madre tumorales, caracterizadas por quiescencia y resistencia a múltiples fármacos, pueden persistir tras el tratamiento endocrino; su mantenimiento se vincula a la activación de vías como Notch y Wnt (Creighton et al, 2009; Liu & Wicha, 2010).
- Componentes del microambiente tumoral, como fibroblastos asociados a carcinomas, matriz extracelular y citoquinas, modulan la respuesta hormonal y favorecen la aparición de subpoblaciones con distinto perfil de receptores, contribuyendo a la resistencia (Diaz Bessone et al, 2019; Yuan et al, 2023).

Alteraciones genéticas, epigenéticas y del metabolismo de fármacos

- Amplificaciones de genes del ciclo celular y cambios epigenéticos, como la metilación de promotores de genes supresores de tumores, alteran la regulación de receptores y vías de

señalización implicadas en la respuesta endocrina (Garcia-Martinez et al, 2021).

- Variantes en enzimas del citocromo P450 (por ejemplo, CYP19A1, CYP2D6) y la sobreexpresión de transportadores como ABCB1 modifican la biodisponibilidad de SERMs e inhibidores de aromatasas, generando niveles subterapéuticos y reduciendo la acumulación intracelular de fármacos (Dean, 2009; Goetz et al, 2005).

Biomarcadores de resistencia

- Se están evaluando perfiles de expresión génica y de microARN como biomarcadores predictivos de resistencia a terapias hormonales, con el objetivo de personalizar el tratamiento y seleccionar combinaciones terapéuticas más eficaces (Pankotai-Bodo et al, 2024).

Si bien se han descrito múltiples mecanismos de resistencia endócrina, la mayoría contempla al ER. En el laboratorio tenemos evidencias de interacción entre las vías de FGF2, PR y AR asociadas a resistencia a antiprogéstágenos en CM (ver **Antecedentes**).

FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS

El FGF2 es una proteína multifuncional implicada en proliferación, diferenciación, angiogénesis y reparación tisular, integrante de una familia de al menos 22 factores con funciones clave en el desarrollo embrionario y la homeostasis tisular (Ornitz & Itoh, 2015; Turner & Grose, 2010). El gen de *FGF2*, localizado en el cromosoma 4q26, genera a partir de un único ARNm múltiples isoformas por traducción alternativa, dando lugar a variantes de bajo y alto peso molecular (**Figura i-7**) (Belov & Mohammadi, 2013; Liao et al, 2009).

Las isoformas de bajo peso molecular (~18 kDa, LMW-FGF2) se localizan principalmente en el citoplasma y se secretan al espacio extracelular, donde actúan de forma autocrina y paracrina sobre receptores FGFR, promoviendo proliferación y angiogénesis (Liao et al, 2009; Ornitz & Itoh, 2015). En cambio, las isoformas de alto peso molecular (22–34 kDa, HMW-FGF2) contienen extensiones N-terminales con señales de localización nuclear y se acumulan en el núcleo, donde modulan principalmente procesos de proliferación y reparación tisular (Akl et al, 2016; Belov & Mohammadi, 2013; Liao et al, 2009).

La vía canónica se inicia con la unión de LMW-FGF2 a FGFR, una familia de cuatro receptores

tirosina-quinasa (FGFR1–4) cuya dimerización induce la fosforilación de residuos de tirosina y la activación de rutas como RAS/MAPK, PI3K/AKT y PLC γ , coordinando proliferación, supervivencia y migración celular. Además, proteoglicanos de heparán sulfato actúan como co-receptores que incrementan la afinidad y la especificidad (Belov & Mohammadi, 2013; Goetz & Mohammadi, 2013; Ornitz & Itoh, 2015).

La expresión de FGF2 está regulada a nivel transcripcional, postranscripcional y epigenético: estímulos como la hipoxia, a través de HIF-1 α , inducen su transcripción favoreciendo la angiogénesis, mientras que modificaciones de histonas y cambios en metilación de promotores ajustan su expresión en contextos de oncogénesis y fibrosis (Baran et al, 2025; Conte et al, 2008; Chaudhury et al, 2014; Turner & Grose, 2010).

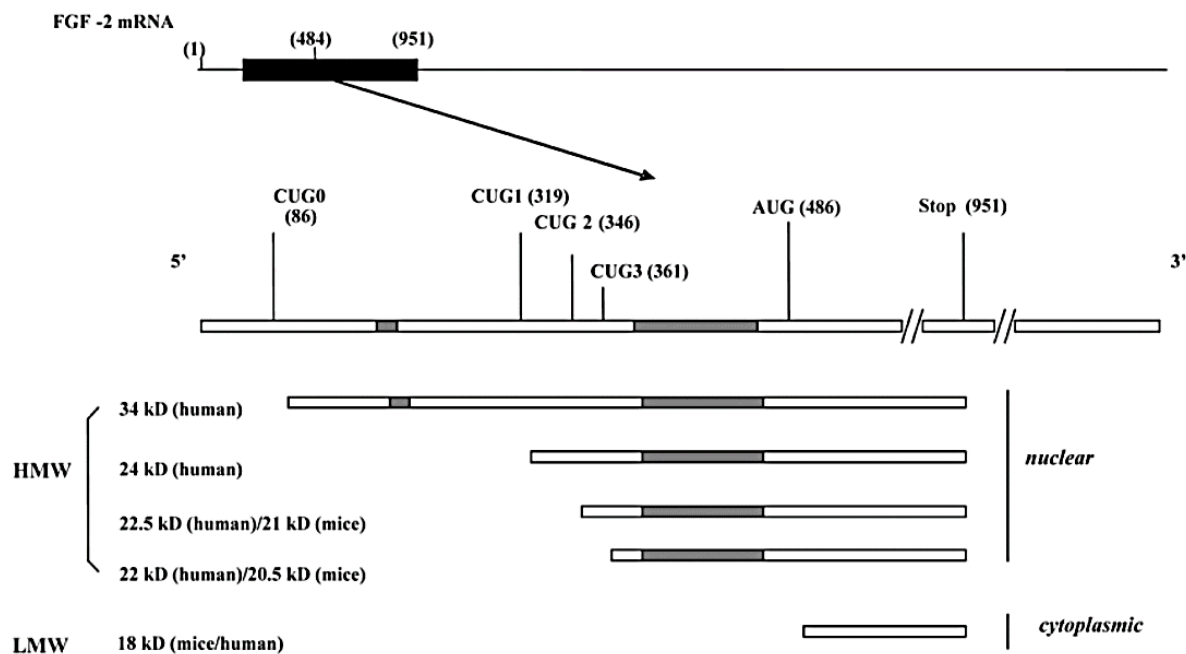


Figura i-7. Esquema de las isoformas de bajo y alto peso molecular de FGF2 en ratón (mice) y humano (human), generadas a partir de distintos sitios de inicio de traducción. Las isoformas LMW-FGF2 (18 kDa) carecen de extensiones N-terminales con señales de localización nuclear, mientras que las isoformas HMW-FGF2 (22–34 kDa, en el humano) poseen secuencias adicionales con señales de localización nuclear (rectángulo gris oscuro) que favorecen su acumulación en el núcleo. Adaptado de (Liao et al, 2009).

FGF2 EN CM

El FGF2 y sus receptores han sido ampliamente estudiados en CM debido a su papel en la regulación de la proliferación, la migración y la angiogénesis (Belov & Mohammadi, 2013; Goetz & Mohammadi, 2013; Turner & Grose, 2010).

En CM, la activación de FGFR por FGF2 desencadena vías como RAS/MAPK, PI3K/AKT y PLC γ . La vía RAS/MAPK contribuye a la proliferación y supervivencia de las células tumorales, mientras que PI3K/AKT es clave para la inhibición de la apoptosis y la regulación de la migración celular, facilitando la invasión y la metástasis (Belov & Mohammadi, 2013; Goetz & Mohammadi, 2013).

LMW-FGF2 se localizan principalmente en el espacio extracelular, donde activan FGFR en células tumorales vecinas y favorecen la angiogénesis y el crecimiento tumoral, mientras que las HMW-FGF2 se encuentran predominantemente en el núcleo, donde regulan la transcripción de genes asociados al ciclo celular y la supervivencia (Liao et al, 2009). Estudios clínicos y preclínicos indican que una mayor actividad nuclear de FGF2 se asocia con fenotipos más agresivos y peor respuesta terapéutica en distintos contextos tumorales, incluido el CM (Akl et al, 2016).

La señalización FGF2/FGFR ha surgido como un blanco terapéutico en CM, especialmente en subtipos con sobreexpresión o mutaciones de *FGFR1* y *FGFR2*. Se encuentran en desarrollo inhibidores de FGFR y anticuerpos monoclonales dirigidos contra FGF2, aunque su eficacia podría depender de la isoforma predominante de FGF2 y del contexto molecular específico del tumor (Turner & Grose, 2010)).

VÍA DE WNT

La señalización de la vía de Wnt es una de las vías más conservadas evolutivamente y regula procesos clave como el desarrollo embrionario, la proliferación, la autorrenovación y la diferenciación celular. Los primeros genes implicados se describieron en la década de 1980, cuando se identificó *wingless* como regulador de la polaridad segmentaria en *Drosophila* y, posteriormente, el oncogén *Int-1* en tumores mamarios inducidos viralmente, que resultó ser el homólogo mamífero de *wg*, estableciendo el primer vínculo entre una vía de desarrollo y el cáncer (Nusse & Clevers, 2017).

Los ligandos WNT son proteínas secretadas, con 19 miembros descritos en mamíferos, que actúan de forma autocrina y paracrina y requieren modificaciones lipídicas, como la palmitoleación mediada por Porcupine, para su correcta secreción y actividad (Nusse & Clevers, 2017; Steinhart &

Angers, 2018). La unión de estos ligandos a receptores Frizzled y co-receptores como LRP5/6 activa la vía canónica, estabiliza β -catenina y permite su acumulación citoplasmática y nuclear, donde se asocia con factores de transcripción TCF/LEF para regular genes implicados en proliferación y diferenciación (Nusse & Clevers, 2017).

La vía Wnt se modula mediante mecanismos de retroalimentación que incluyen moduladores positivos como las R-spondinas, antagonistas extracelulares y genes blanco que limitan la intensidad y la duración de la señal. Estos genes regulados por Wnt controlan proliferación, migración, apoptosis y diferenciación, procesos esenciales para la organogénesis embrionaria y la regeneración tisular en la vida adulta (Steinhart & Angers, 2018).

En condiciones fisiológicas, Wnt es central para el mantenimiento de células madre y la regulación de la diferenciación, especialmente en tejidos con alta capacidad regenerativa como el epitelio intestinal y el sistema hematopoyético, donde preserva el equilibrio entre células madre y diferenciadas y, con ello, la arquitectura tisular (Nusse & Clevers, 2017). Esta función se mantiene a lo largo de la vida, permitiendo la reparación tras lesiones y la homeostasis de órganos con recambio celular continuo. La glándula mamaria también se la considera un órgano que transita procesos de reestructuración tisular durante el desarrollo, lactancia e involución (Steinhart & Angers, 2018).

Alteraciones en componentes de la vía Wnt pueden originar señalización aberrante asociada con cáncer y enfermedades degenerativas; mutaciones en ligandos, receptores, co-receptores o elementos intracelulares como β -catenina pueden activar constitutivamente la vía, favoreciendo proliferación desregulada, resistencia a la apoptosis y progresión tumoral (Nusse & Clevers, 2017; Zhan et al, 2017). El conocimiento de estas alteraciones ha impulsado el desarrollo de terapias dirigidas que buscan modular puntos específicos de la vía Wnt para controlar la proliferación maligna sin comprometer en exceso sus funciones fisiológicas de regeneración tisular (Zhan et al, 2017).

VÍA CANÓNICA Y NO CANÓNICA DE WNT

Vía Canónica de Wnt

La vía canónica de Wnt regula la proliferación, diferenciación y maduración celular y se activa por ligandos de la familia WNT1, entre ellos WNT2, WNT3, WNT3a y WNT8a, así como por otros ligandos como WNT4 y WNT6 que también pueden señalizar a través de esta vía en determinados contextos. Por su parte, WNT4 y WNT6 pueden activar tanto la vía canónica como vías Wnt no canónicas, dependiendo

del contexto celular y de los receptores/co-receptores expresados (MacDonald et al, 2009; Nusse & Clevers, 2017).

En ausencia de ligandos WNT, un complejo de destrucción elimina la β -catenina. Este complejo está compuesto por las proteínas APC, AXIN, GSK-3 β , CK1, la ligasa de ubiquitina β -TrCP y la fosfatasa 2A (PP2A). Mientras que PP2A puede afectar la señalización de Wnt de manera positiva o negativa, CK1 fosforila primero la β -catenina en el residuo Ser45, permitiendo que GSK-3 β fosforile los residuos Ser33, Ser37 y Thr41, creando así el sitio de unión para la proteína β -TrCP, que actúa como adaptador para ubiquitinar la β -catenina y permitir su destrucción por el proteasoma (MacDonald et al, 2009).

Por otra parte, cuando WNT se une a los receptores Frizzled y a los co-receptores LRP5/6, la proteína DVL se recluta a la membrana y promueve la fosforilación de las colas citoplasmáticas de LRP5/6, lo que permite el reclutamiento de AXIN a la membrana y la desorganización del complejo de destrucción, estabilizando así a β -catenina (MacDonald et al, 2009). La β -catenina acumulada se transloca al núcleo, donde actúa como co-activador transcripcional uniéndose a factores TCF/LEF para activar la transcripción de genes blanco. En ausencia de β -catenina, TCF/LEF se asocian con TLE/Groucho, que recluta HDACs y mantiene la represión transcripcional, mientras que la unión de β -catenina desplaza a TLE/Groucho y favorece el ensamblaje de complejos activadores con co-reguladores como CBP/p300, Pygo, BCL9 y BRG1 (MacDonald et al, 2009; Nusse & Clevers, 2017). Una representación esquemática de la vía se muestra en la **Figura i-8**.

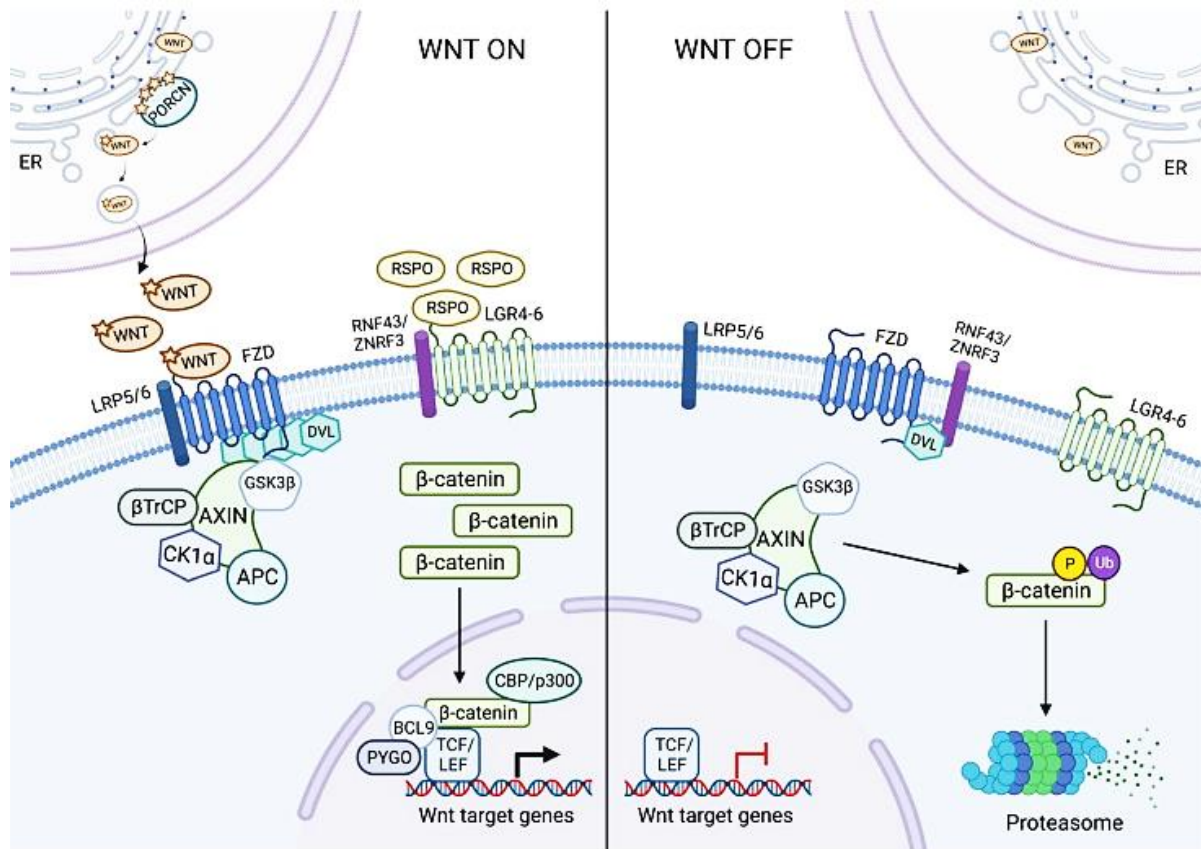


Figura i-8. Representación esquemática de la vía canónica de señalización Wnt en estado activado ("WNT ON") e inactivado ("WNT OFF"), mostrando los principales componentes, la función de los receptores Frizzled y LRP5/6, y el destino de la β -catenina en cada condición. Adaptado de (Groenewald et al, 2023).

Vía No Canónica de Wnt

La vía no canónica de Wnt agrupa rutas de señalización independientes de la acumulación de β -catenina y se organiza en dos grandes ramas: la vía de polaridad celular plana (Wnt/PCP) y la vía Wnt/ Ca^{2+} . En conjunto, regulan la polaridad, la migración y la organización espacial de las células durante la morfogénesis y la regeneración tisular, además de modular la respuesta inmune (Nusse & Clevers, 2017; Steinhardt & Angers, 2018).

En la vía Wnt/PCP, ligandos como WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT7A y WNT11 se unen a receptores Frizzled y a correceptores no clásicos (ROR, RYK, PTK7, CELSR), activando DVL y una cascada de pequeñas GTPasas, entre ellas RHOA y RAC1. Estas vías coordinan la dinámica de actina y miosina, controlando la orientación celular, la migración y la capacidad de invasión, mientras que la activación de

quinasas como JNK regula factores de transcripción como c-JUN e integra las señales de polaridad con cambios en la expresión génica (**Figura i-9**) (Simons & Mlodzik, 2008; Steinhart & Angers, 2018).

La vía de Wnt/ Ca^{2+} se activa típicamente por ligandos como WNT5A, que al unirse a receptores Frizzled, estimulan proteínas G heterotriméricas y fosfolipasa C, generando IP_3 y DAG, lo que desencadena la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico y la entrada adicional de Ca^{2+} desde el exterior celular (Kohn & Moon, 2005). El aumento de Ca^{2+} citosólico activa efectores como PKC, calcineurina y CaMKII, que regulan factores de transcripción como NFAT y pueden modular negativamente la vía canónica al interferir con el complejo β -catenina/TCF, contribuyendo así al control de polaridad, migración y decisiones de destino celular, y ajustando el equilibrio con la señalización Wnt dependiente de β -catenina (Kohn & Moon, 2005; Nusse & Clevers, 2017; Steinhart & Angers, 2018).

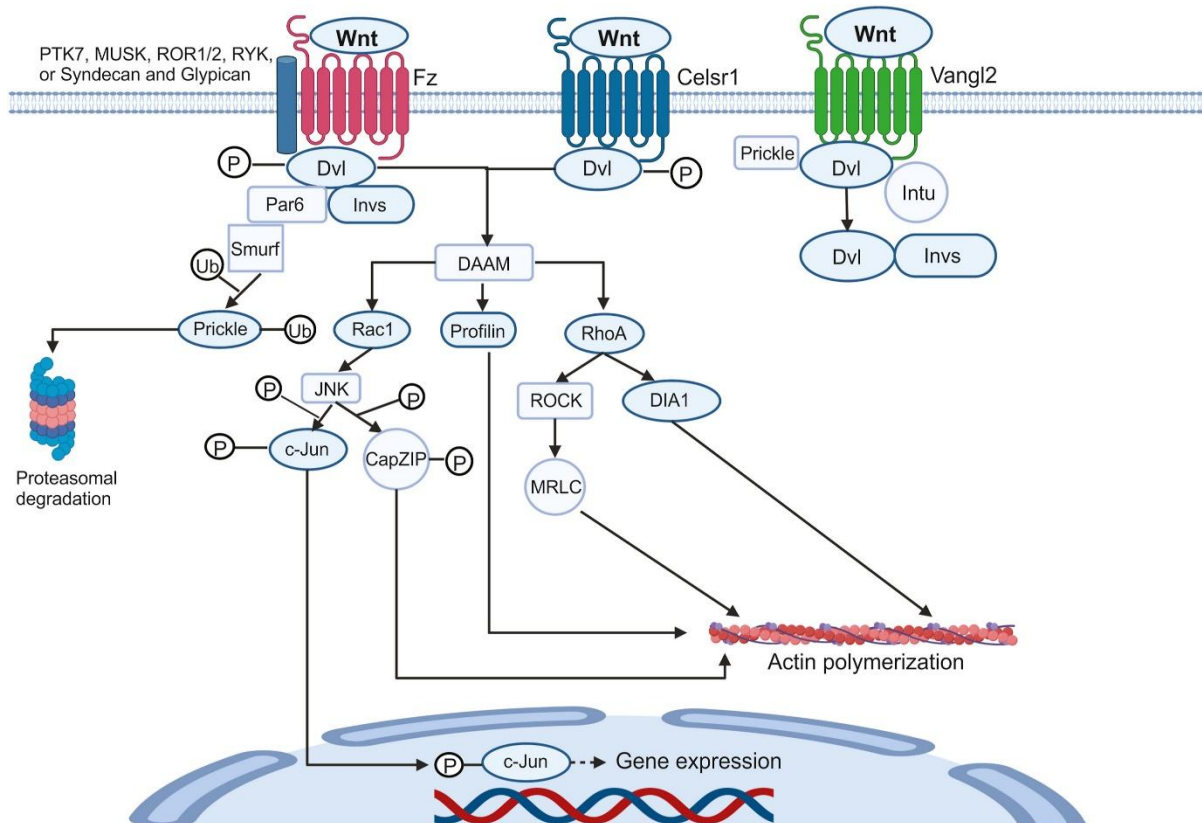


Figura i-9. Esquema de la vía de Wnt/PCP y su conexión con la polimerización de actina y la regulación de la expresión génica, detallando los principales efectores (DVL, DAAM, RHOA, RAC1, JNK) y rutas involucradas en la remodelación del citoesqueleto y la activación de c-Jun. Adaptado de (Qin et al, 2024).

WNT EN CM Y OTROS TIPOS DE CÁNCER

La vía de señalización Wnt regula diferenciación, proliferación y supervivencia celular, y su desregulación se ha vinculado a múltiples cánceres, incluido el de mama. En el desarrollo normal de la glándula mamaria, esta señalización está finamente controlada, pero en CM alteraciones en componentes clave, como β -catenina o reguladores de su degradación, conducen a una activación aberrante que favorece la tumorigénesis y la diseminación metastásica; en particular, la activación positiva de Wnt/ β -catenina se asocia con subtipos agresivos como el TNBC (Zhan et al, 2017).

Además del CM, la vía de Wnt participa en cánceres colorrectal, de hígado y de pulmón, donde la señalización desregulada contribuye al crecimiento descontrolado, la invasión y la resistencia a la apoptosis (Zhan et al, 2017). En cáncer colorrectal, mutaciones en APC alteran el complejo de destrucción de β -catenina, favoreciendo su acumulación nuclear y la activación de genes blanco que impulsan la progresión tumoral (Fodde & Brabletz, 2007).

Se ha establecido que mutaciones en la vía canónica de Wnt desempeñan un papel central en distintos tumores, lo que obliga a definir qué cánceres están impulsados por la activación de Wnt y en qué nivel se localizan las alteraciones para diseñar terapias efectivas. Algunos tumores presentan mutaciones a nivel de receptor, como RNF43 o fusiones de RSPO, que aumentan la sensibilidad a ligandos Wnt y mantienen dependencia de señales exógenas (mutaciones dependientes de ligando), mientras que otros muestran mutaciones en componentes citoplasmáticos como APC o CTNNB1 que confieren una activación constitutiva de la vía incluso en ausencia de ligando (Zhan et al, 2017).

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DIRIGIDAS A LA VÍA DE WNT

Las terapias dirigidas a ligandos y receptores de Wnt exploran el potencial terapéutico de bloquear etapas tempranas de la vía, especialmente en cáncer. Las estrategias principales se basan en neutralizar ligandos WNT o impedir su unión a FZD mediante proteínas de fusión “receptores señuelo”, anticuerpos monoclonales o pequeñas moléculas. Ipafricept (OMP-54F28), una proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de FZD8 unido a IgG1, actúa como señuelo para múltiples ligandos WNT y ha demostrado reducir el crecimiento tumoral y la frecuencia de células iniciadoras de tumor en modelos preclínicos y en un ensayo fase I en tumores sólidos avanzados (Jimeno et al, 2017; Jung & Park, 2020; Le et al, 2015).

Los inhibidores de Porcupine constituyen otra clase prometedora, ya que esta aciltransferasa es

esencial para la palmitoilación y secreción de ligandos WNT. Al bloquear PORCN, compuestos como LGK-974 impiden la liberación de ligandos funcionales y, en consecuencia, bloquean el inicio de la señalización de Wnt. Se ha mostrado una inhibición potente de la vía y efectos antitumorales en modelos de tumores Wnt-dependientes, en ensayos fase I en tumores sólidos avanzados (Liu et al, 2013; Rodon et al, 2021).

En neoplasias con activación de β -catenina, una estrategia es perturbar su función como coactivador nuclear en lugar de bloquear completamente la vía. Moléculas pequeñas como ICG-001 y su derivado clínico PRI-724 inhiben de forma selectiva la interacción entre β -catenina y el coactivador CBP, desplazando la señalización hacia p300 y favoreciendo programas de diferenciación más que de proliferación y autorrenovación; PRI-724 ha mostrado factibilidad clínica y reducción de expresión de genes blanco de β -catenina en estudios fase I/II en tumores sólidos y patologías hepáticas (Kimura et al, 2022; Zhan et al, 2017).

Otra aproximación consiste en modular el complejo de destrucción de β -catenina, formado por AXIN, APC, GSK-3 β y otras proteínas que regulan su degradación. Inhibidores de tankirasa como XAV939 y G007-LK estabilizan AXIN, potencian la degradación de β -catenina y han mostrado una inhibición significativa de la señalización Wnt y del crecimiento tumoral en modelos preclínicos, al reducir la acumulación citoplasmática y la translocación nuclear de β -catenina (Huang et al, 2009; Lau et al, 2013).

Estas intervenciones ilustran cómo es posible modular la transcripción mediada por β -catenina o su estabilidad sin bloquear por completo las funciones fisiológicas de la vía Wnt. No obstante, la traducción clínica sigue siendo un reto debido a la naturaleza multifuncional de Wnt y a su papel en la homeostasis tisular, lo que ha impulsado el desarrollo de estrategias más selectivas como PROTACs, conjugados anticuerpo-fármaco y oligonucleótidos antisentido para degradar o modular de manera dirigida ligandos WNT, receptores o la propia β -catenina y ampliar así las posibilidades terapéuticas en distintos cánceres (Jung & Park, 2020; Zhan et al, 2017).

INTERRELACIÓN ENTRE LAS VÍAS DE WNT Y OTRAS VÍAS

En CM, las interacciones entre la señalización de Wnt con otras vías, como los receptores hormonales (ER, AR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el eje PI3K/AKT/mTOR,

son especialmente relevantes y modulan proliferación, invasión, supervivencia y resistencia terapéutica en distintos subtipos tumorales.

Crosstalk entre Wnt y ER

En tumores ER⁺, se ha descrito un *crosstalk* funcional entre Wnt/ β -catenina y el ER, donde β -catenina puede actuar como coactivador de receptores esteroideos y compartir coactivadores como CBP/p300, modulando la transcripción de genes proliferativos y de supervivencia (Chen et al, 2022; MacDonald et al, 2009; Valenta et al, 2012). Esta cooperación contribuye al crecimiento tumoral y a la resistencia a la apoptosis en CM ER⁺, y se ha vinculado a cambios en la actividad de CBP/p300, en la expresión de genes blanco de ER y en la regulación de *ESR1* (Nusse & Clevers, 2017; Zhan et al, 2017).

Crosstalk entre Wnt y AR

La vía de Wnt/ β -catenina también interactúa con AR, favoreciendo la acumulación nuclear de β -catenina y la formación de complejos con AR que actúan como coactivadores transcripcionales de genes regulados por andrógenos (Valenta et al, 2012; Wan et al, 2012). En tumores de mama con expresión de AR, este *crosstalk* puede potenciar programas de proliferación y supervivencia, asociarse con fenotipos más agresivos y contribuir a la resistencia a terapias hormonales (Abreu de Oliveira et al, 2022; Zhan et al, 2017).

Existe, además, una regulación recíproca: AR puede modular la vía de Wnt mediante la regulación de DKK1, un antagonista secretado de Wnt, lo que sugiere que AR puede atenuar la señalización de la vía en ciertos contextos (Hall et al, 2005). La alteración del equilibrio entre AR, β -catenina y reguladores como DKK1 puede favorecer niveles elevados de β -catenina nuclear y una señalización Wnt sostenida, asociándose con progresión tumoral y variabilidad en la respuesta a terapias dirigidas en distintos subtipos de CM (Abreu de Oliveira et al, 2022; Zhan et al, 2017).

Desde el punto de vista terapéutico, la comprensión de estos *crosstalks* ha impulsado el estudio de combinaciones de inhibidores de Wnt y antagonistas de AR en tumores AR⁺, con datos preclínicos que indican que la inhibición simultánea de AR y β -catenina reduce el crecimiento tumoral y la señalización de ambos ejes (Lee et al, 2013; Luo et al, 2020). Algunos trabajos muestran que bloquear Wnt/ β -catenina aumenta la sensibilidad a inhibidores de AR y ayuda a superar resistencias adquiridas, apoyando estrategias combinadas dirigidas a múltiples vías (Atawia et al, 2023; Hou et al, 2024).

Crosstalk entre Wnt y EGFR y PI3K/AKT/mTOR

En los subtipos TNBC, la interacción entre la vía de Wnt y EGFR es particularmente relevante: EGFR, frecuentemente sobreexpresado en estos tumores, puede activar β -catenina a través de la activación de las vías de PI3K/AKT y RAS/RAF/MEK/ERK, inhibiendo GSK-3 β , evitando la degradación de β -catenina y favoreciendo su translocación nuclear y actividad transcripcional (He et al, 2021; Merikhian et al, 2021; Perry et al, 2011; Pohl et al, 2017). Esto se traduce en mayor proliferación, invasión, activación de programas de transición epitelio-mesenquimal y metástasis, contribuyendo a la agresividad y falta de respuesta terapéutica característica del TNBC (Abreu de Oliveira et al, 2022; Merikhian et al, 2021; Rodgers et al, 2023).

ANTECEDENTES

Isoformas de PR y resistencia endocrina

Las isoformas de PR y su relación con la resistencia endocrina se han estudiado tanto en modelos murinos como en líneas celulares humanas. En el modelo murino de carcinogénesis mamaria inducido por acetato de medroxiprogesterona, los tumores expresan ER y PR y transitan por distintos estadios de progresión; algunas variantes son sensibles a antiprogestágenos y otras son resistentes (*Lanari et al, 2009*). En ensayos previos de nuestro laboratorio demostramos que las primeras expresan una mayor proporción de isoforma A de PR respecto de PRB, mientras que las segundas presentan la proporción inversa (Wargon et al, 2015).

A partir de la línea celular humana T47D, el grupo de la *Dra. Horwitz* generó variantes que expresan exclusivamente la isoforma A o B de PR, denominadas T47D-YA y T47D-YB, respectivamente, y demostró que las T47D-YA son sensibles, mientras que las T47D-YB son resistentes al tratamiento con antiestrógenos como tamoxifeno (Jacobsen et al, 2002; Sartorius et al, 2003). Posteriormente, nuestro laboratorio demostró que las T47D-YA son sensibles y las T47D-YB resistentes al tratamiento con antiprogestágenos (Wargon et al, 2015).

Por otra parte, en 2017 publicamos un trabajo (Rojas et al, 2017), en el que utilizamos muestras de pacientes con CM categorizadas según su perfil de isoformas de PR, y demostramos que los tumores mamarios humanos con mayor proporción de isoforma B de PR (PRB-H) presentan un mayor índice de proliferación (Ki-67) y un menor porcentaje de PR total que los tumores PRA-H que presentan la relación inversa (**Figura a-1 A-B**). Asimismo, los tumores PRB-H se asociaron con un patrón de expresión génica luminal B y los tumores PRA-H se asociaron con el subtipo luminal A.

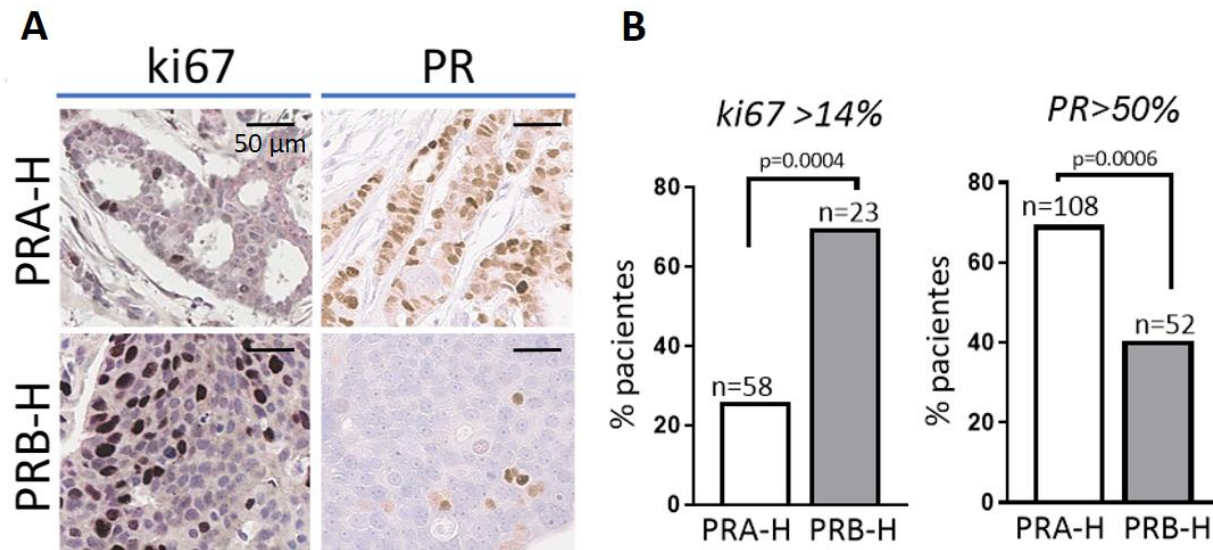


Figura a-1 A-B. Expresión de Ki-67 y PR en carcinomas mamarios luminales clasificados según el perfil de isoformas de PR. **(A)** Imágenes representativas de inmunohistoquímica para Ki-67 y PR en tumores PRA-H y PRB-H. **(B)** Porcentaje de pacientes con Ki-67 > 14 % (izquierda; $p=0,0004$) o con PR total > 50 % (derecha; $p=0,0006$) en los subgrupos PRA-H y PRB-H (n indicado en cada barra); las barras muestran la proporción de casos positivos. Análisis estadístico: Fisher. Adaptado de (Rojas et al, 2017). PRA-H/PRB-H: tumor mamario con mayor expresión de PRA o PRB, respectivamente.

Isoformas de FGF2 y progresión tumoral

Recientemente demostramos que variantes resistentes endocrinas, tanto en un modelo murino como en xenotransplantes de T47D-YB, expresan mayores niveles de las HMW-FGF2 en el núcleo del parénquima tumoral que los tumores sensibles (Sahores et al, 2018).

Con el objetivo de determinar la participación de estas isoformas de alto peso en la progresión tumoral, se generaron variantes celulares a partir de las líneas sensibles endocrinas T47D, infectadas con un plásmido control (V) o con plásmidos de sobreexpresión de la isoforma de 18 kDa de FGF2 (T47D-LMW) o de 22 kDa (T47D-HMW) (**Figura a-2 A**). Demostramos que tanto la sobreexpresión de HMW-FGF2 como LMW-FGF2 indujo resistencia al tratamiento con antiprogéstágenos en ambos modelos experimentales tanto *in vitro* (**Figura a-2 B**) como *in vivo* (**Figura a-2 C**) donde además observamos un aumento en el número de metástasis pulmonares (Tesis Dra. Figueroa). Estos mismos ensayos se replicaron en el modelo sensible T47D-YA y se obtuvieron resultados similares (Sahores et al, 2018).

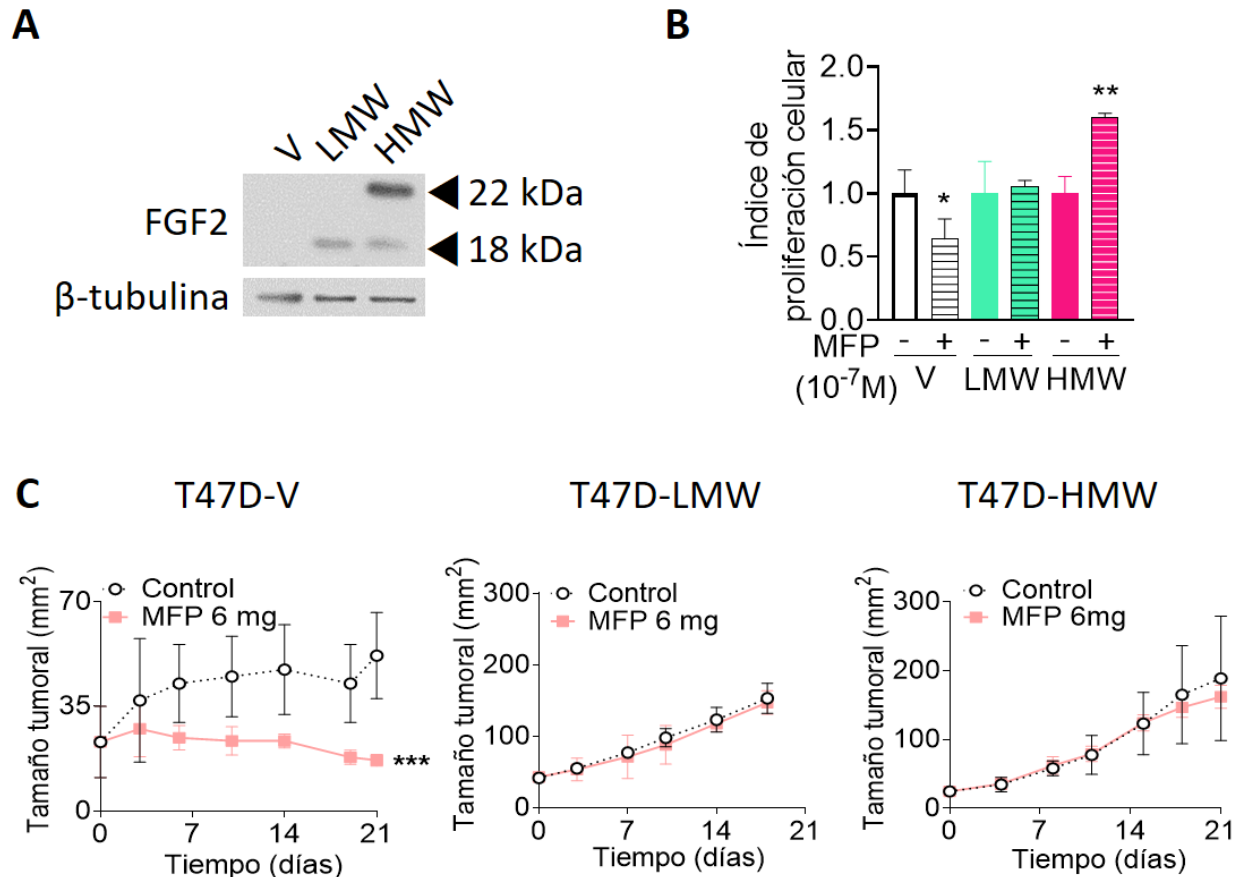


Figura a-2 A-C. El modelo T47D que sobreexpresa LMW-FGF2 o HMW-FGF2 son resistentes a mifepristona (MFP). **(A)** Expresión de FGF2 por Wb en extractos celulares totales de T47D-V, T47D-LMW y T47D-HMW; β -tubulina como control de carga. **(B)** Índice de proliferación celular in vitro de T47D-V, -LMW y -HMW tratadas o no con mifepristona (MFP; 10^{-7} M) durante 6 días. **(C)** Crecimiento tumoral in vivo en ratones inmunodeficientes tratados con o sin MFP (pellet 6 mg, sc); T47D-V (izquierda), T47D-LMW (centro) o T47D-HMW (derecha). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. control. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-LMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de bajo peso molecular (18 kDa); T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). Adaptado de Tesis Dra. Figueroa.

Isoformas de FGF2, regulación de la expresión de receptores hormonales y disregulación de vías

Las evidencias experimentales indican que las HMW-FGF2 favorecen la progresión tumoral en distintos modelos experimentales de CM humano (Sahores et al, 2018). Por lo tanto, para dilucidar los mecanismos involucrados en estos procesos, se realizaron ensayos de ARNseq. El análisis de los resultados (colaboración con el Dr. Martín Abba, Universidad Nacional de La Plata) reveló 1146

transcriptos diferencialmente expresados entre la línea T47D-YA-V (plásmido vacío) y T47D-YA-22,5 (sobreexpresa la isoforma de 22,5 kDa de FGF2). Agrupamos los genes desregulados de acuerdo con las vías que pudieran estar afectadas. Como se observa en la **Figura a-3 A**, dentro de las vías más desreguladas se encuentran las vías de señalización de cadherina y Wnt, así como también varias vías asociadas a resistencia, metabolismo de xenobióticos y tamoxifeno. Si bien muchas de estas vías y los genes desregulados, resultan interesantes para estudiar los mecanismos implicados tanto en la resistencia como en la diseminación metastásica, en este trabajo de tesis profundizamos en la asociación entre la vía de Wnt y las vías de receptores hormonales. Como se mencionó en la *Introducción*, la desregulación de la vía de Wnt está implicada en la progresión tumoral del CM [revisado en (Nusse & Clevers, 2017)]. En la **Figura a-3 B** se observa una selección de genes desregulados y el grado de desregulación en la línea celular T47D-YA-22,5 respecto de la línea celular T47D-YA-V para la vía de Wnt. Cabe destacar que se encontró aumentada la expresión de *WNT6*, *WNT3A* y *WNT4*, así como también del receptor *FZD4*. De manera interesante, observamos que los transcriptos para *SP5* y *SP6* [factores de transcripción pertenecientes a la familia de proteínas SP y regulados por Wnt; (Chen et al, 2006) se encontraron aumentados en la línea que sobreexpresa HMW-FGF2 respecto de la línea control (Tesis *Dra. Figueroa*). Cabe destacar que la línea T47D-YA-LMW también presentó una desregulación en la vía de Wnt respecto a la T47D-YA-V.

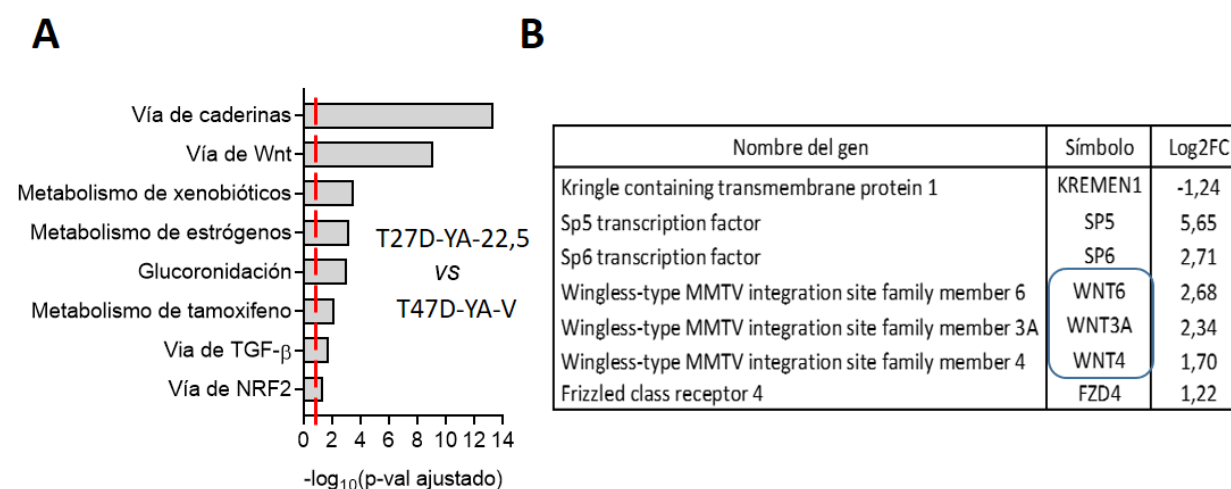


Figura a-3 A-B. La sobreexpresión de HMW-FGF2 en T47D-YA induce la desregulación de la vía de Wnt. **(A)** Enriquecimiento de vías biológicas alteradas según ARNseq ($-\log_{10}$ del p ajustado) en T47D-YA-22,5 vs. T47D-YA-V. **(B)** Genes seleccionados diferencialmente expresados en T47D-YA-22,5 vs. T47D-YA-V ($\log_2$ FC), destacándose los ligandos *WNT3A*, *WNT4* y *WNT6* sobreexpresados. T47D-YA-V: T47D-YA

transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-YA-22,5: línea T47D-YA que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22,5 kDa). Adaptado de Tesis Dra. Figueroa.

Asimismo, el ARNseq también reveló cambios en la expresión de receptores hormonales que fueron corroborados a nivel de proteína. En la **Figura a-4 A-B** observamos los resultados con el modelo T47D en el que la sobreexpresión de LMW- y HMW-FGF2 indujeron una disminución en los niveles de ER, y PR. De manera interesante, la sobreexpresión de LMW-FGF2 redujo los niveles de AR mientras que HMW-FGF2 los incrementó comparado con la expresión en la línea T47D-V (**Figura a-4 A-B**). Lo destacable es que ambas isoformas de PR se regulan de forma diferencial dando como resultado una inversión en la proporción de isoformas de PR, estableciéndose un fenotipo PRB-H tanto para T47D-LMW como T47D-HMW (**Figura a-4 C**). Según lo expuesto en párrafos anteriores, esto se asocia a un fenotipo resistente a antiprogestágenos. Además, la disminución de ER y PR viene acompañada por un aumento o disminución de AR en T47D-HMW o -LMW, respectivamente, lo que altera también la relación entre ellos (**Figura a-4 D-E**). El aumento en las relaciones AR/ER y AR/PR han sido asociados a la progresión del CM (Cochrane et al, 2014).

Asimismo, lo interesante es que el promotor de AR posee sitios TCF/LEF que permitirían la unión de factores de transcripción de la familia TCF/LEF interactuando con β -catenina, de manera que miembros de la vía de Wnt podrían estar regulando la expresión de AR (Yang et al, 2006). El estudio del mecanismo implicado en esta regulación forma parte de los objetivos propuestos para este trabajo de tesis.

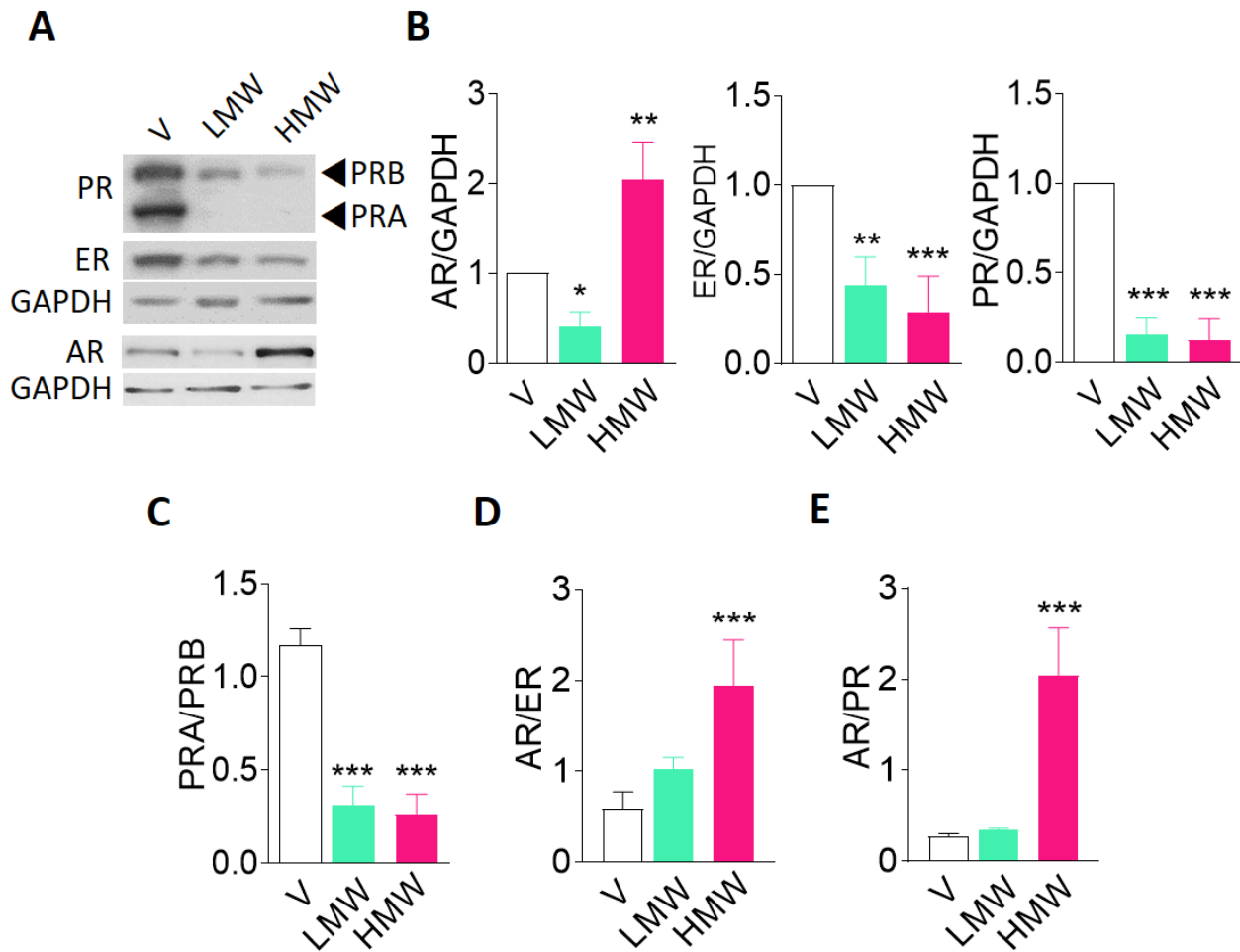


Figura a-4 A-E. La sobreexpresión de HMW-FGF2 y LMW-FGF2 en T47D altera los niveles de receptores hormonales, modificando las proporciones PRA/PRB, AR/ER y AR/PR. (A) Wb de PR (isoformas PRA y PRB), ER y AR en células T47D-V (control, vector vacío), T47D-LMW y T47D-HMW, con GAPDH como control de carga. (B) Cuantificación relativa (proteína/GAPDH) de AR, ER y PR correspondiente al Wb mencionado en A. (C-E) Relación PRA/PRB (C), AR/ER (D) y AR/PR (E) calculadas a partir de los valores normalizados de expresión proteica. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. T47D-V. Análisis estadístico: t de Student. T47D-V: T47D infectada con plásmido vacío; T47D-LMW: T47D que sobreexpresa FGF2 de bajo peso molecular (18 kDa); T47D-HMW: T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). Adaptado de Tesis Dra. Figueroa.

Expresión de AR en muestras de pacientes con CM luminal

Los tumores agrupados como luminales B se caracterizan por tener un peor pronóstico que los luminales A. Asimismo, de acuerdo con la expresión de marcadores, se trata de un grupo heterogéneo que incluye todos los tumores ER⁺ que no encajan dentro del subgrupo luminal A (ER⁺, PR⁺, Ki-67 bajo y HER2⁻). En el

año 2020 publicamos un trabajo en el que demostramos que, dentro del subtipo luminal B, los tumores ER⁺PR⁻ expresaban mayores niveles de AR que en el subgrupo ER⁺PR⁺ (Garcia et al, 2020).

En conjunto, estas evidencias apuntan a que altos niveles de FGF2 se asocian a cambios en los niveles de receptores hormonales y alteraciones en vías proliferativas y de desarrollo (como la vía de Wnt). Estas alteraciones podrían estar dirigiendo la progresión tumoral. Sin embargo, los mecanismos implicados aún no se han podido determinar y conocerlos podría ser la clave para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para aquellas pacientes con cáncer mamario que recaen a la terapia endocrina o no responden a tratamientos de primera línea.

HIPÓTESIS

Dado que los carcinomas mamarios luminales resistentes endocrinos con sobreexpresión de HMW-FGF2 poseen la vía de Wnt desregulada, bajos niveles de PR con predominio de PRB, y altos niveles de AR, postulamos que, durante la adquisición de la resistencia endocrina, el FGF2 contribuye a la activación de la vía de Wnt que, a su vez, regula la expresión de AR. Por lo tanto, la expresión conjunta de AR y FGF2 puede utilizarse como biomarcadores de mal pronóstico en subtipos luminales con bajos niveles de PR o predominio de PRB.

Es por ello, que el bloqueo de la vía de Wnt y/o AR podría constituir una terapia dirigida para el tratamiento de pacientes con CM luminal que han adquirido resistencia a la terapia endocrina.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer los mecanismos implicados en la progresión del CM luminal inducido por FGF2, determinando la participación de la vía de Wnt en la regulación de receptores hormonales, en particular los AR.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar la expresión y estado de activación de la vía de Wnt en modelos experimentales luminales resistentes endocrinos (ER⁺PRB-H) con distintos niveles de expresión de AR y FGF2.
- 2) En modelos experimentales luminales resistentes a antiprogéstágenos (ER⁺PRB-H) que expresan altos niveles de AR y HMW-FGF2:
 - a) Estudiar el efecto de antiandrógenos, la dihidrotestosterona e inhibidores de la vía de Wnt sobre la proliferación celular.
 - b) Estudiar el efecto de inhibidores de la vía de Wnt sobre la expresión de AR.
 - c) Estudiar la unión de β -catenina y TCF4 a sitios TCF/LEF en el promotor de AR.
- 3) En modelos derivados de xenotransplantes de pacientes luminales (ER⁺PR^{bajo/-}AR⁺), estudiar el efecto de la dihidrotestosterona e inhibidores de la vía de Wnt sobre la proliferación celular.
- 4) En modelos PR⁻ o PRB-H creciendo en presencia o ausencia de estradiol exógeno, estudiar el efecto de agonistas androgénicos sobre el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica.
- 5) En una cohorte de pacientes ER⁺ clasificados según la expresión de PR (PR⁺, PR⁻, PRA-H o PRB-H):
 - a) Evaluar los niveles de expresión de FGF2, AR, WNT4 y WNT6 por subgrupo.
 - b) Correlacionar la expresión de AR y FGF2 con parámetros clínico-patológicos.
 - c) Evaluar la expresión conjunta de AR y FGF2 por subgrupo.
 - d) Investigar la supervivencia global en pacientes con altos o bajos niveles de AR o FGF2 nuclear por subgrupo.

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR

Líneas celulares utilizadas

Líneas celulares con expresión diferencial de isoformas de PR

Se empleó la línea celular T47D (ATCC HTB-133), derivada de una efusión pleural de una paciente con un carcinoma mamario ductal infiltrante (Keydar et al, 1979). Esta línea expresa ER, PR, AR y el receptor de glucocorticoides. En la década del 90, el grupo de la *Dra. Horwitz* seleccionó un clon que no expresa PR, al que denominaron T47D-Y. A partir de este clon, realizaron transfecciones estables con plásmidos de expresión de PRA o PRB, generando las variantes T47D-YA y T47D-YB, respectivamente (Jacobsen et al, 2002). Ambas conservan la expresión de GR, AR y exhiben niveles de PR similares a T47D (Ghatge et al, 2005). Las variantes T47D-YA y T47D-YB fueron gentilmente cedidas por la *Dra. Horwitz* (Universidad de Colorado, EE. UU.).

Líneas que sobreexpresan FGF2

Se utilizaron variantes estables generadas previamente en el laboratorio por infección lentiviral (Tesis *Dra. Figueroa*) que expresan el vector vacío (T47D-V) o que sobreexpresan las isoformas de 18 y 22 kDa de FGF2 (T47D-LMW y T47D-HMW, respectivamente), para evaluar el impacto funcional de FGF2 en un contexto genético comparable.

Mantenimiento de líneas celulares

Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM/F12 suplementado con 10 % de SFB y 1 nM insulina (Denver, Argentina), en atmósfera humidificada a 37 °C con 5 % CO₂. Para las líneas T47D-YA y T47D-YB, el medio se complementó con 200 µg/ml de neomicina (Calbiochem) para mantener la presión selectiva sobre las células transfectadas con los respectivos plásmidos. Las líneas T47D-V, T47D-LMW y T47D-HMW se cultivaron en presencia de 200 µg/ml de zeocina, asegurando la selección continua de las células que expresan las distintas isoformas de FGF2 o el plásmido vacío.

Medios y soluciones

Los medios y soluciones utilizados para los cultivos celulares se detallan en el (ver **Apéndice**).

Repique celular

Se retiró el medio de cultivo y las células adherentes se lavaron con PBS 1X estéril. Posteriormente, se

incubaron con tripsina-EDTA a 37 °C durante 2–4 min, utilizando un volumen suficiente para cubrir el fondo de la placa. Una vez desprendidas, las células se recolectaron en un tubo que contenía DMEM/F12 con 10 % SFB y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, el *pellet* celular se resuspendió en DMEM/F12 con 10 % SFB y las células se sembraron en nuevas placas para su posterior cultivo.

Congelamiento y almacenamiento de líneas celulares

Tras tripsinizar y centrifugar, se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en medio de congelación. Las células se distribuyeron en alícuotas de 1 ml en criotubos, que se colocaron a –80 °C en un sistema de enfriamiento gradual. Luego de 24 h, los criotubos se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento definitivo hasta su uso.

Ensayos de proliferación celular

Conteo celular. Para los ensayos de respuesta a drogas, se sembraron 2×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos en DMEM/F12 con 10 % SFB y 10^{-9} M insulina. Tras 24 h, las células se sometieron a ayuno durante 24 h adicionales en DMEM/F12 con 2,5 % de suero fetal bovino charcolizado (SFBch; depletado de hormonas esteroideas de bajo peso molecular). Posteriormente, se trataron con las drogas indicadas en la **Tabla ap-1** (ver **Apéndice**), renovando el medio cada 48 h. Para el conteo celular, las células se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en 135–180 µl de tripsina según la densidad; se llevó luego a un volumen final de 150–200 µl con medio conteniendo SFB para frenar la tripsina. El recuento celular se realizó con el contador automático *Countess II* (*Thermo Fisher*) luego de 6 días de tratamiento. Se efectuaron al menos dos experimentos independientes, con un mínimo de cinco réplicas por condición.

Confluencia. En otros experimentos, las células se sembraron en placas de 96 pocillos y la proliferación se evaluó como porcentaje de confluencia. Se procedió de la misma manera que en los ensayos de conteo celular, y la proliferación celular se determinó a partir del análisis de imágenes obtenidas con el equipo *IncuCyte* (*Sartorius*), que permite el monitoreo automático y en tiempo real de la confluencia celular. El porcentaje de confluencia a tiempo final (8 días desde el plaqueo) se relativizó al valor del tiempo inicial.

ENSAYOS DE WESTERN BLOT (*Wb*)

Soluciones y anticuerpos. (ver **Apéndice**)

Preparación de extractos celulares

Los extractos se obtuvieron a partir de líneas celulares cultivadas en placas de p60. En cada caso se sembraron 8×10^5 células por placa para alcanzar ~80 % de confluencia en DMEM/F12 con 10 % SFB. A las 48 h, las células se lavaron y se dejaron en ayuno durante 24 h, según el diseño experimental. Se obtuvieron extractos en condiciones de crecimiento basal (ayuno 24 h en DMEM/F12 sin SFB) o luego de los distintos tratamientos detallados en la (ver **Apéndice, Tabla ap-1**). Para preparar los extractos de proteínas, las células se lavaron con PBS 1X frío y se adicionaron 50 μ l de *buffer* RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa por placa, en hielo. Con ayuda de un *scraper* se levantaron los lisados, que se recuperaron en tubos de 1,5 ml y se incubaron 30 min en hielo con agitación suave para favorecer la extracción proteica. Finalmente, las muestras se centrifugaron 20 min a 12.000 rpm y 4 °C (centrífuga 5415 R, *Eppendorf*). Los sobrenadantes (fracción proteica) se transfirieron a tubos limpios de 1,5 ml y se almacenaron a -80 °C.

Extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas

Las fracciones nucleares y citoplasmáticas se aislaron utilizando el *kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (*Thermo Fisher Scientific*, cat. #78835), siguiendo las instrucciones del fabricante e incluyendo inhibidores de proteasas en todos los *buffers*. Todos los pasos se realizaron a 4 °C. Los extractos obtenidos se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

Preparación de extractos tumorales

Los tumores se pesaron y se transfirieron a tubos de poliestireno colocados en hielo, agregando un volumen de *buffer* A con inhibidores de proteasas equivalente a 4 veces el peso del tejido. Se incubaron 10 min en hielo y luego se homogeneizaron con un homogeneizador (*Polytron, Teckmar*) hasta obtener un homogenato uniforme, que se dejó reposar 15 min en hielo. A continuación, los homogenatos se sonicaron 3 veces durante 10 s, con intervalos de 10 s en hielo entre cada sonicación, y se incubaron 20 min adicionales en hielo. Las muestras se centrifugaron 20 min a 12.000 rpm y 4 °C (centrífuga 5415 R, *Eppendorf*); los sobrenadantes se recuperaron en tubos limpios de 1,5 ml y se almacenaron a -80 °C.

Cuantificación de proteínas

Se utilizó el *kit* comercial *Pierce BCA Protein Assay Kit* (cat. #23227; *ThermoFisher*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó una curva estándar con concentraciones crecientes de albúmina sérica bovina (BSA, *Thermo Fisher*) y las muestras se diluyeron 1:10 en agua destilada. La concentración se calculó a partir de la ecuación de la recta obtenida para la curva estándar, utilizando los valores de absorbancia medidos a 620 nm en un lector de placas de ensayo inmunoenzimático ligado a enzima

(ELISA).

Corrida electroforética y revelado

Las muestras de proteínas se mezclaron con *cracking buffer* y se calentaron 5 min. Se cargaron entre 25 y 50 µg de proteínas totales por calle y se separaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida discontinuo, utilizando el sistema de *buffers* de *Laemmli*, junto con un marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó inicialmente a 80 V durante 20–30 min para atravesar el gel concentrador y luego a 100 V durante 90–120 min para la migración en el gel separador. Tras la corrida, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 2 h a 80 V en frío. Las membranas se bloquearon 1 h a temperatura ambiente con solución bloqueante y se lavaron tres veces con TBS-T (3×5 min). Luego se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente overnight a 4 °C con agitación suave. Al día siguiente, tras tres lavados en TBS-T, se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La detección se realizó mediante quimioluminiscencia y exposición a película radiográfica. Finalmente, las películas se digitalizaron con un escáner y las bandas inmunorreactivas se cuantificaron usando el *software ImageJ*, considerando únicamente exposiciones no saturadas.

ENSAYOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA

Soluciones y anticuerpos

Detalles sobre las soluciones utilizadas (ver **Apéndice**). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se detallan en las **Tablas ap-2 y ap-3**, respectivamente.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Los cortes tumorales se desparafinaron en xileno *overnight* y se rehidrataron en etanol de graduación decreciente (100%, 96% y 70%). La peroxidasa endógena se bloqueó incubando 20 min con H₂O₂ 10 volúmenes al 10% en etanol 70%. Tras lavados en agua destilada, se realizó la recuperación antigénica en *buffer* citrato pH 6 a 95 °C durante 50 min y se dejó enfriar 30 min a temperatura ambiente. Luego de lavados en agua destilada y PBS 1X, los cortes se bloquearon 1 h con BSA 2,5% en PBS 1X (cámara húmeda) y se incubaron *overnight* a 4 °C con el anticuerpo primario en PBS 1X. Al día siguiente se realizaron lavados en PBS 1X y la detección se efectuó mediante incubaciones sucesivas con el anticuerpo secundario biotinilado y el complejo ABC (*Vectastain*, Vector). El revelado se realizó con diaminobencidina (DAKO); los núcleos se contrastaron con hematoxilina y los cortes se deshidrataron y

montaron en medio sintético. Como control negativo se omitió el anticuerpo primario. Las muestras se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E800 con captura digital de imágenes.

Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica se realizó sobre células cultivadas en portaobjetos, fijadas con paraformaldehído 4% en PBS 1X (10–20 min, temperatura ambiente) y lavadas con PBS 1X. Las células se permeabilizaron con metanol/Tritón X-100 0,1% en PBS 1X (20 min, –20 °C) y se bloquearon 30 min con BSA 2,5% + Tritón X-100 0,1% en PBS 1X (cámara húmeda). Luego se incubaron overnight a 4 °C con el anticuerpo primario en PBS 1X y, tras lavados en PBS 1X, se procedió a la detección con anticuerpo secundario biotinilado, complejo ABC y revelado con DAB, como en IHQ.

ENSAYOS PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARNm

Extracción de ARN total

El ARN total se obtuvo a partir de células cultivadas en placas de p60 o p100 al ~80 % de confluencia, tras un ayuno de 24 h en DMEM/F12 sin SFB y lavado previo con PBS 1X. Se añadió TRIzol (Invitrogen; 1 ml en p60, 1,2 ml en p100), se homogeneizó por pipeteo y se extrajo con cloroformo, recuperando la fase acuosa tras centrifugación (12.000 rpm, 10 min, 4 °C). El ARN se precipitó con isopropanol overnight a –20 °C, se centrifugó (12.000 rpm, 20 min, 4 °C), se lavó dos veces con etanol 70 % frío y se resuspendió en 50 µl de H₂O DEPC (dietilpirocarbonato). La integridad se evaluó en un gel de agarosa 1,2 % y la concentración se determinó con un espectrofotómetro tipo *Nanodrop*.

PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa reversa (RT-qPCR)

El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total usando *RevertAid Reverse Transcriptase* (*ThermoScientific*) en un volumen de 20 µl (*random primers*, dNTPs 1 mM, *buffer* 5X y 200 U de transcriptasa), con el programa: 25 °C 10 min, 42 °C 60 min, 70 °C 10 min; el ADNc se almacenó a –20 °C. La expresión génica se analizó por qPCR en un C1000 *Touch* (Bio-Rad) usando *FastStart Universal SYBR Green Master* (ROX, *Roche*) en 15 µl finales (*mix SYBR Green* 7,5 µl, *primers* 0,5 µM, ADNc y agua). Cada condición se evaluó con al menos tres réplicas biológicas y réplicas técnicas por duplicado/triplicado, incluyendo controles sin molde y sin retrotranscripción. El programa de amplificación fue: 95 °C 10 min y 40 ciclos de 95 °C 10 s, 53–60 °C 30 s (según pares de *primers*, **Tabla m-1**) y 60 °C 30 s, seguido de curva de disociación. Los niveles de expresión se calcularon mediante el método $\Delta\Delta C_t$, normalizando al gen *GAPDH* ribosomal; las secuencias de *primers* se detallan en la **Tabla m-1**.

Gen	Secuencia <i>primer Forward</i>	Secuencia <i>primer Reverse</i>	T° ann (°C)
AR	GGCATGGTGAGCAGAGTG	GGGTGGAAAGTAATAGTCAATGG	60
GAPDH	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	GTCATTGATGGCAACAATATCCACT	60

Tabla m-1: Secuencias de los primers utilizados para el análisis de expresión de genes por qPCR. T° ann: temperatura de annealing.

Electroforesis en gel de agarosa

Para verificar el tamaño del producto de PCR, se cargaron ~50-100 ng de ARN mezclados con *buffer* de carga 6X y SYBR Green 5X (1X final) en geles de agarosa 1,2 %. Se corrieron a 90 V en *Buffer* TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA, pH 8) durante 30–40 min y se visualizaron las bandas en un GBOX con iluminación UV.

ENSAYOS *IN VIVO*

Animales

Se emplearon ratones NOD/LtSz-scid/IL-2R γ null (NSG; The Jackson Laboratory) hembras y machos, de ~2 meses de edad, criados en el Bioterio del IByME. Esta cepa presenta deficiencias profundas de inmunidad innata y adaptativa, lo que facilita el trasplante de líneas tumorales humanas (xenotrasplantes). Los animales se mantuvieron en condiciones de esterilidad, con alimento balanceado y agua *ad libitum*, ciclo luz/oscuridad 12/12 h y temperatura de 20 $\pm$ 2 °C.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (*Institute of Laboratory Animal Resources*, 1996) y fueron aprobados por Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) del IByME.

Inoculación de líneas celulares

Se inocularon 5–7 $\times$ 10⁶ células en 100 μ l por ratón en el flanco inguinal derecho (sc, aguja 25G). Para favorecer la toma tumoral se implantó subcutáneamente un *pellet* de E2 de 0,25 mg 48 h antes del inóculo (Sahores et al, 2013). Cuando los tumores alcanzaron ~30 mm², los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento.

Valoración del crecimiento tumoral

El crecimiento tumoral se monitoreó dos veces por semana midiendo el tamaño del tumor con un calibre Vernier (largo $\times$ ancho, en mm²), permitiendo graficar curvas de crecimiento (tamaño tumoral

vs. tiempo) para cada grupo experimental. Al finalizar los estudios, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, tras lo cual se extrajeron y pesaron los tumores para comparar el peso tumoral final entre grupos experimentales.

Toma de muestras tumorales

Como se describió anteriormente, el día de la eutanasia se removieron los tumores y se tomaron muestras para posteriores ensayos de IHQ y *Wb*, evitando las zonas necróticas, que en general se encuentran en el centro del tumor. Las muestras destinadas a IHQ, se fijaron en formalina 10 % en PBS 1X para su posterior procesamiento para análisis histopatológicos (servicio tercerizado). Este análisis se realizó en colaboración con la médica patóloga *Dra. Silvia Vanzulli*. Las muestras destinadas a la extracción de proteínas se almacenaron a -80°C.

Detección de focos metastásicos

Para el estudio de metástasis, se realizaron necropsias completas a todos los animales. Durante la necropsia se efectuó un análisis macroscópico inicial y se recolectaron muestras de ganglios axilares, hígado, riñón, estómago, intestino, bazo, útero y ovario o testículo, según correspondiera. Ambos pulmones se extrajeron tras su insuflación con formalina al 10% a través de la tráquea, utilizando una jeringa y aguja 25G. Todas las muestras se fijaron en formalina al 10% en PBS 1X y se incluyeron en parafina. Para cada grupo experimental se determinó el número total de focos metastásicos pulmonares por ratón, cuantificándolos en toda la extensión de los cinco lóbulos pulmonares mediante examen microscópico.

Tratamientos hormonales de líneas T47D

Cuando los tumores alcanzaron ~30 mm², se iniciaron los tratamientos durante 21 días, con 5 animales por grupo.

- Dihidrotestosterona (DHT; *Sigma-Aldrich*): *pellets* subcutáneos de liberación continua de 10 mg (Fu et al, 2021; Manneras et al, 2007).
- Testosterona (*Sigma-Aldrich*): *pellets* subcutáneos de 5, 10 o 20 mg según el grupo experimental, para evaluar un posible efecto dosis-respuesta sobre el crecimiento tumoral.
- Estradiol (E2; *Sigma-Aldrich*): *pellet* sc de 0,25 mg o administración en el agua de bebida (2 µg/ml) mediante mamadera con agua estéril.
- Enzalutamida (*MedChem Express*): vía oral a 25 mg/kg, 3 veces/semana, utilizando como vehículo CMC 1 % (*Sigma-Aldrich*), Tween-80 0,1 % (*Sigma-Aldrich*) y DMSO 5 %

(*Sigma-Aldrich*) en 100 µl/animal (Tran et al, 2009).

MODELOS DE XENOINJERTO DERIVADOS DE PACIENTES (PDX)

Se emplearon modelos de PDX que se desarrollaron en nuestro laboratorio según se describió en un trabajo previo del laboratorio (Pataccini et al, 2025). Inicialmente, el PDX707 se desarrolló en hembras NSG tratadas con E2 mientras que los PDX767 y 781 se desarrollaron en hembras sin administración exógena de E2.

Ensayos *in vivo*: PDX707. Este modelo corresponde a un carcinoma de mama humano ER⁺, PR⁻, HER2⁻, AR⁺. Se transplantaron en el subcutáneo ratones hembra NSG con fragmentos tumorales de aproximadamente 2–3 mm² con suministro de E2. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~25–50 mm², los animales se asignaron aleatoriamente a recibir E2 solo o la combinación de E2 + testosterona (*pellets* de 20 mg). Se monitoreó con un calibre *Vernier* el crecimiento tumoral tres veces por semana hasta el sacrificio, registrándose tamaño y peso tumoral final. Los tumores se fijaron en formalina al 10 %, se incluyeron en parafina y se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina (H&E) e IHQ según se indica en cada caso.

Ensayos *in vivo*: PDX781. Este modelo corresponde a un carcinoma de mama humano ER⁺, PR⁻, HER2⁺, AR⁺. Se transplantaron en el subcutáneo ratones hembra NSG con fragmentos tumorales de aproximadamente 2–3 mm². Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~25–50 mm², los animales se asignaron aleatoriamente a recibir durante 5 días: vehículo, dihidrotestosterona (DHT; *Sigma-Aldrich*, A2570-000, 20 mg/kg, inyección subcutánea en aceite de ricino como vehículo), LGK-974 (*MedChem Express*, HY-17545/CS-2807, 5 mg/kg, inyección subcutánea en vehículo carboximetilcelulosa 0,5 %, Tween-80 0,5 % y DMSO 2 % en agua) o la combinación de ambos. El crecimiento tumoral se midió cinco veces por semana con un calibre *Vernier* y el tamaño se calculó como largo × ancho. Al finalizar, los tumores se extrajeron, fijaron en formalina al 10 %, se incluyeron en parafina y se realizaron H&E e IHQ según se indica en cada caso.

Ensayos *ex vivo*: PDX767. Este modelo corresponde a un carcinoma de mama humano ER⁺, PR⁻, HER2⁺, AR⁺. Los tumores se cortaron en secciones uniformes (~200 µm) con un vibrátomo (*Compressstome* VF-500-0Z). Se colocaron ~5 lonjas sobre una esponja (1 cm²), previamente embebida en medio de cultivo con el tratamiento correspondiente o control. Los tratamientos se mantuvieron durante 48 h. Tras la fijación en formalina 10% e inclusión en parafina, los cortes se procesaron para H&E e IHQ según se indica en cada caso.

ENSAYOS DE ELISA

Las concentraciones de WNT4 o WNT6 humano se determinaron en el medio condicionado mediante un ELISA tipo “sandwich” utilizando kits comerciales (*Human Protein Wnt-4 ELISA Kit*, CUSABIO, CSB-EL026137HU y *Human Wnt-6 ELISA Kit*, Assay Genie, HUF104726).

Para la obtención del medio condicionado, se plaquearon $1,5 \times 10^6$ células en placas p60, de manera de alcanzar una confluencia ~80 %, en medio DMEM F12 con 10 % SFB. A las 48 horas se lavaron con DMEM F12 y se las ayunó por 48 h en un volumen final de 4 ml de DMEM F12. Se recuperaron los medios condicionados, se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos para eliminar células muertas y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C.

Para el ELISA se emplearon microplacas de 96 pocillos pre-recubiertas con los anticuerpos correspondientes y se siguieron las instrucciones del fabricante para la detección de las proteínas. La reacción colorimétrica se midió con un espectrofotómetro a 450 nm. El rango de cuantificación fue de 23,5–1500 pg/ml y de 0,156–10 ng/ml para los kits de WNT4 y WNT6, respectivamente. Las muestras se analizaron por duplicado junto con una curva estándar generada por diluciones seriadas del estándar provisto.

ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Los ensayos de ChIP se realizaron con el kit *iDeal ChIP-qPCR* (Diagenode, manual C01010180), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se cultivaron en p150, se lavaron con DMEM y se incubaron con ICG-001 (1 μ M) en 15 ml de DMEM durante 45 min a 37 °C. Luego, se realizó un lavado con DMEM y se añadieron 15 ml de DMEM por placa. Se agregaron 400 μ l de formaldehído (36%) por placa, incubando 8 min a temperatura ambiente con agitación suave; la reacción se detuvo con glicina (125 mM, 5 min en agitación). Las células se lavaron tres veces con PBS frío, se lisaron con buffer de lisis frío y se recolectaron por raspado en hielo. Se incubó durante 20 min en agitación en hielo. Tras centrifugaciones sucesivas (5 min, 1600 rpm, 4 °C) y resuspensión en *buffer* de lisis, los núcleos se incubaron en hielo y se resuspendieron finalmente en *shearing buffer* suplementado con inhibidores de proteasas, manteniendo las muestras en hielo hasta la sonicación (15 ciclos de 30 seg *ON* y 30 seg *OFF* en alta potencia). La cromatina fijada se fragmentó por sonicación hasta obtener fragmentos de 200–600 pb. Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo con anticuerpos para β -catenina (sc-133238 o ab32572), TCF4 (ab217668) o IgG control, unidos a perlas magnéticas recubiertas con proteína A. Tras lavados secuenciales, el ADN se eluyó, se revirtió el entrecruzamiento, se purificó y se analizó por qPCR.

usando *primers* específicos para las regiones promotoras de interés; regiones del gen GAPDH se utilizaron como control negativo.

ENSAYOS CON MUESTRAS DE PACIENTES

Nuestro laboratorio mantiene una colaboración con el Hospital de Pacheco “Magdalena V. de Martínez”, del cual se reciben rutinariamente muestras frescas y fijadas en formol de tumores mamarios humanos. Todas las muestras remitidas por el Hospital son anonimizadas previamente. Se incluyeron en el estudio las pacientes con CM sometidas a cirugía entre abril 2008 y abril 2023 y se excluyeron a las pacientes HIV⁺ o hepatitis B⁺. El estudio fue aprobado por los comités de ética institucionales (CE08/2016) y los datos clínico-patológicos, incluyendo la expresión por IHQ de Ki-67, ER y PR, se obtuvieron de las historias clínicas.

Las muestras frescas se procesan en el marco de otros proyectos para obtener extractos nucleares y citosólicos, en los que se evalúa la expresión de PR y sus isoformas por *Wb*. Se consideraron PRA-H las muestras cuya relación PRA/PRB era mayor o igual a 1,2; PRB-H a todos los valores cuya relación PRA/PRB sea menor o igual a 0,83; y EQUI cuando la relación fue entre 0,83 y 1,2 (Rojas et al, 2017).

En esta tesis se realizaron IHQ para FGF2, AR, WNT4 y WNT6. Las inmunomarcaciones se cuantificaron con el asesoramiento de la médica patóloga *Dra. Silvia Vanzulli*, evaluando siempre el parénquima tumoral. La expresión nuclear de FGF2 se cuantificó considerando el porcentaje de células positivas (0-100%) y la intensidad de la señal (1 a 3), generando un *score* multiplicando el % de células positivas por la intensidad de la marcación (Sahores et al, 2018). La expresión nuclear de AR se determinó como el porcentaje de células tumorales viables positivas (0–100 %) (Garcia et al, 2020). La expresión citoplasmática de WNT4 y WNT6 se evaluó como porcentaje de células tumorales viables positivas (0–100 %).

Los cálculos de sobrevida global (SG) y sobrevida libre de progresión (SLP) se realizaron desde la fecha de cirugía hasta el fallecimiento por cualquier causa o hasta la progresión de la enfermedad, respectivamente. Se estableció en agosto 2025 como punto de corte para el seguimiento.

Datos públicos METABRIC

Se realizaron análisis exploratorios de asociación entre la expresión de AR (mRNA) y la SG o SLP utilizando datos públicos de la cohorte METABRIC accesible en *cBioPortal for Cancer Genomics* (Curtis et

al, 2012; Mucaki et al, 2016). Esta cohorte incluye más de 2.000 tumores mamarios primarios con información clínica y de seguimiento a largo plazo (hasta ~20 años), así como perfiles moleculares que integran expresión génica y alteraciones de número de copia. Los puntos de corte para la expresión de AR se determinaron mediante el *software Cut off finder* (Budczies et al, 2012). Las curvas de *Kaplan–Meier*, el cálculo del *hazard ratio* (HR), su intervalo de confianza y el valor de *p* (*test de Log-rank*) fueron generados en *GraphPad* a partir de la estratificación de las pacientes según el nivel de expresión de AR en los distintos subgrupos definidos según la expresión de ER y PR (ER⁺PR⁺ o ER⁺PR⁻) y ganglios negativos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el *software GraphPad Prism* (versión 8.0.2 para *Windows*; *GraphPad Software Inc.*). En las figuras, el nivel de significancia se indica mediante asteriscos. En los ensayos de proliferación celular, los valores de cada condición se expresaron como porcentaje relativo al grupo control y se compararon mediante ANOVA de una vía seguido de prueba de comparaciones múltiples de *Tukey* cuando se evaluaron tres o más grupos, o mediante prueba *t* de *Student* no pareada y bilateral cuando se compararon solo dos grupos. Las comparaciones de la expresión de ARNm y de proteína (*Wb* cuantificado con *ImageJ*, utilizando únicamente exposiciones no saturadas y al menos tres experimentos independientes, salvo indicación contraria) se efectuaron también con prueba *t* (dos grupos) o ANOVA de una vía seguido de *Tukey* (múltiples grupos).

En los experimentos *in vivo*, las curvas de crecimiento tumoral se analizaron mediante ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida, y los pesos tumorales finales se compararon mediante prueba *t* de *Student* o ANOVA de una vía cuando se evaluaron más de dos grupos. El número de focos metastásicos y otras variables de conteo se analizó con pruebas no paramétricas: *Mann-Whitney* para comparaciones entre dos grupos y *Kruskal-Wallis* seguido de la prueba de *Dunn* para comparaciones entre más de dos grupos. La cuantificación de las IHQ de experimentos *in vivo* se basó en el análisis de imágenes de diez campos por condición (400x), calculando el porcentaje de células positivas con *ImageJ* y comparando las condiciones mediante ANOVA de una vía seguido de *Tukey*.

Para el análisis de las muestras de pacientes, las asociaciones entre variables categóricas (por ejemplo, alta/baja expresión de AR o FGF2 y parámetros clínico-patológicos) se evaluaron mediante prueba exacta de *Fisher* o chi-cuadrado, según correspondiera al tamaño de las celdas. La correlación entre la expresión de AR y FGF2 se analizó mediante coeficiente de correlación de *Spearman*. La comparación de la expresión de AR entre grupos con bajo (*score* nuclear de FGF2 ≤ 5) y alto (*score* > 5)

FGF2 nuclear se realizó con la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*. Los análisis de sobrevida global se efectuaron mediante curvas de *Kaplan-Meier* y comparación entre grupos con la prueba de *log-rank* (*Mantel-Cox*), utilizando como puntos de corte AR nuclear $\geq 10\%$ y *score* de FGF2 nuclear ≥ 5 para definir alta expresión.

RESULTADOS

Parte I: Vía canónica de Wnt

O.E.1: Evaluar la expresión y estado de activación de la vía de Wnt en modelos experimentales luminales resistentes a antiprogéstágenos (ER⁺PRB-H) con distintos niveles de expresión de AR e isoformas de FGF2.

En el modelo endocrino sensible T47D-YA se observó que la sobreexpresión de la isoforma de alto peso molecular de FGF2 (22,5 kDa) induce resistencia endocrina, aumento de AR y desregulación de la vía de Wnt (ver **Antecedentes, Figuras a-3 A-B y a-4 B**). En función de estos resultados, nuestro primer objetivo fue evaluar la expresión de distintos componentes de la vía de Wnt en los modelos resistentes a mifepristona, T47D-HMW (PRB-H; sobreexpresión constitutiva de HMW-FGF2; AR elevado) y T47D-YB (expresión constitutiva de PRB; niveles elevados de HMW-FGF2 endógeno; AR elevado), en comparación con sus contrapartes sensibles, con el fin de determinar si esta vía se encuentra alterada en contextos con diferente expresión de PR y FGF2 y diferente sensibilidad endócrina.

Modelos endocrino resistentes T47D-HMW y T47D-YB. Ensayos *in vitro*

Ligandos WNT4 y WNT6

En primer lugar, evaluamos la expresión de los ligandos WNT4 y WNT6, ambos activadores de la vía a través de la unión a sus receptores de membrana y cuyos ARNm resultaron *sobreexpresados* en el modelo T47D-YA-22,5 (ver **Antecedentes, Figura a-3 A-B**).

En la **Figura r-1 A** observamos que en la línea T47D-YB, que expresa sólo PRB, se observó un incremento de WNT4 en comparación con la línea T47D-WT mientras que en T47D-HMW, sólo se observó una tendencia en el mismo sentido respecto de T47D-V. En relación con la expresión de WNT6, la sobreexpresión de la isoforma de 22 kDa de FGF2 se asoció con un aumento del ligando respecto de la línea T47D-V (T47D transfectada con el plásmido vacío; **Figura r-1 B**). En la línea T47D-YB, los niveles de WNT6 fueron similares a los de T47D-WT e -YA (**Figura r-1 B**).

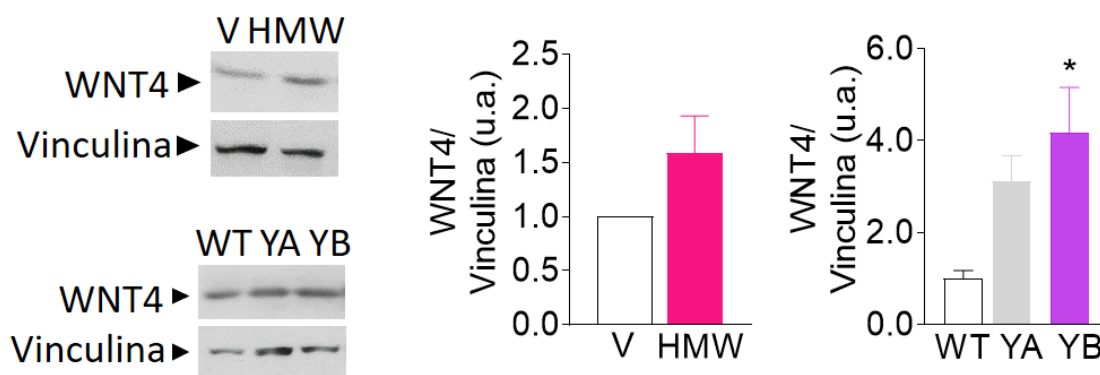
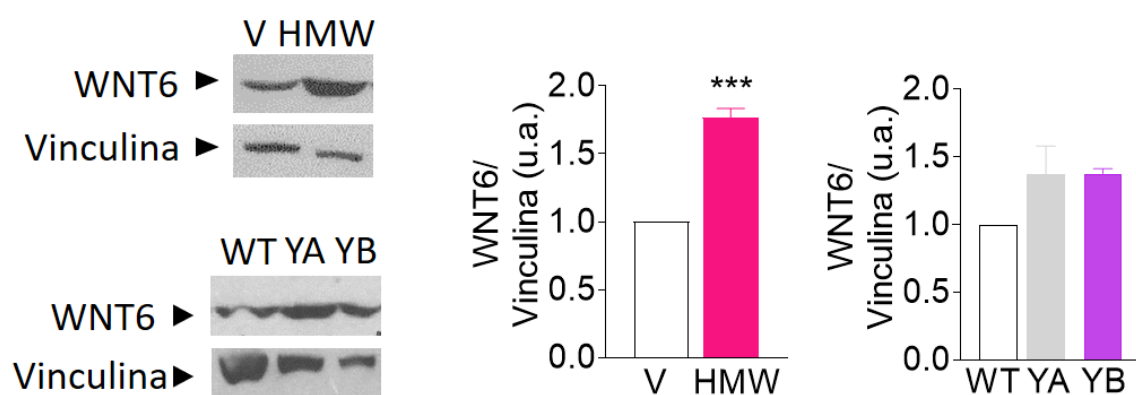
A**WNT4 *in vitro*****B****WNT6 *in vitro***

Figura r-1 A-B Expresión de los ligandos WNT4 y WNT6 en líneas sensibles y resistentes a mifepristona, *in vitro*. Expresión de WNT4 (A) y WNT6 (B) por Wb en extractos celulares totales de T47D-V y T47D-HMW, y de las líneas T47D-WT, -YA y -YB, con sus cuantificaciones relativizadas a vinculina, que se utilizó como control de carga. Los datos se expresan como media $\pm$ SE; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente.

Dado que el mecanismo de acción de estos ligandos es a través de su liberación al medio extracelular, se evaluaron sus niveles en el medio condicionado mediante ensayos de ELISA. Las concentraciones detectadas se encontraron mayoritariamente por debajo del límite de detección del kit utilizado, por lo tanto, estos resultados no fueron concluyentes por sí solos. Sin embargo, se

observaron leves tendencias al aumento de WNT4 y WNT6 en el modelo T47D-HMW respecto de su control con vector vacío, consistente con una mayor liberación de estos ligandos en la variante resistente (no se muestra) y que acompañan los resultados obtenidos por otras técnicas.

Correceptor LRP6

En segundo lugar, se evaluó la activación de la vía canónica de Wnt analizando los niveles del correceptor LRP6 y de su forma fosforilada (pLRP6), utilizada como marcador de activación de esta vía. En las líneas T47D-HMW y T47D-YB se detectó por *Wb* un aumento de pLRP6 en comparación con sus respectivas contrapartes sensibles (**Figura r-2 A-B**). Hasta el momento, los ensayos disponibles muestran que LRP6 total presentó una tendencia a aumentar su expresión en la variante T47D-HMW respecto de la línea control, por lo que la relación pLRP6/LRP6 no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, se requieren más ensayos para constatar esta tendencia.

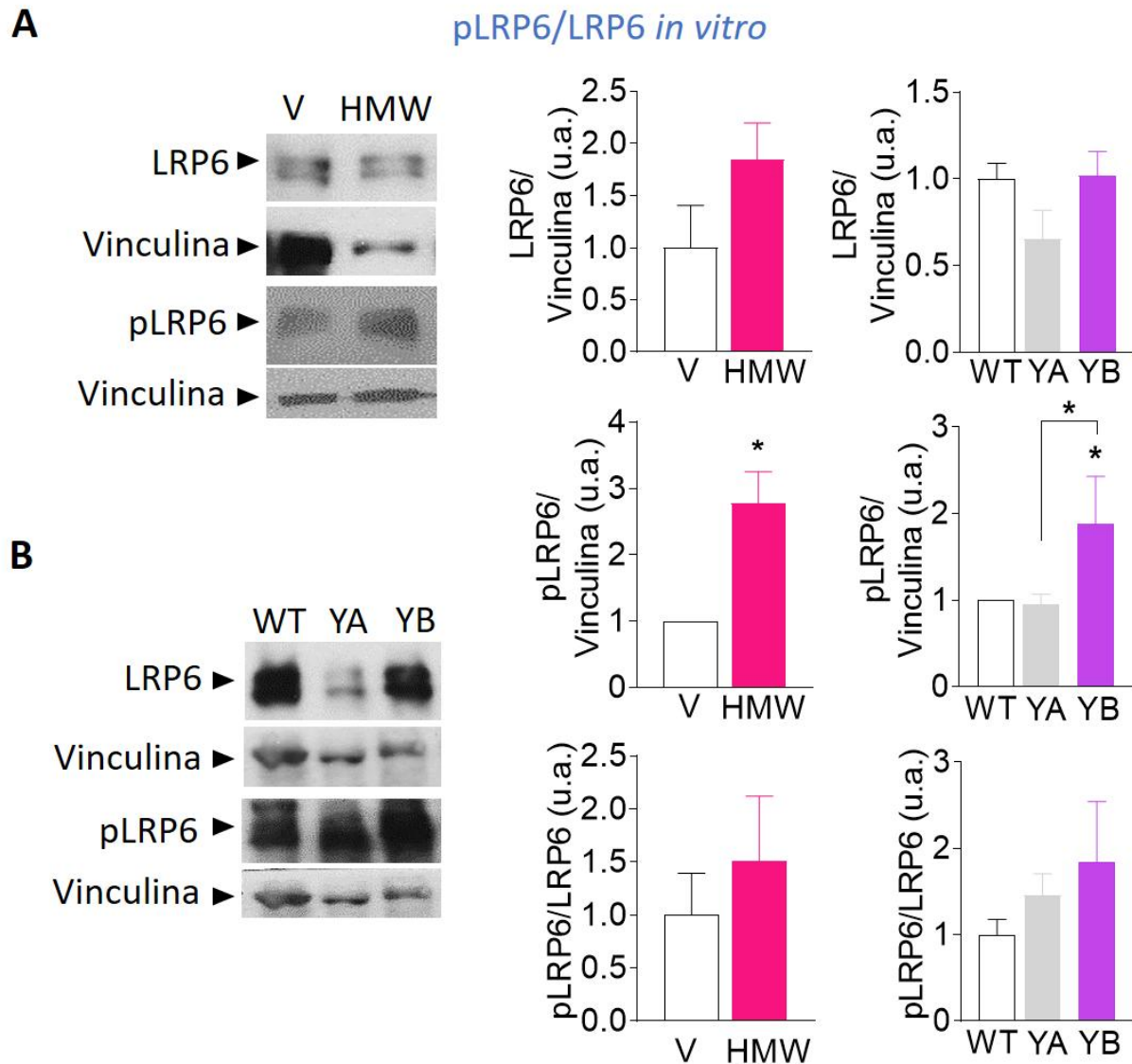


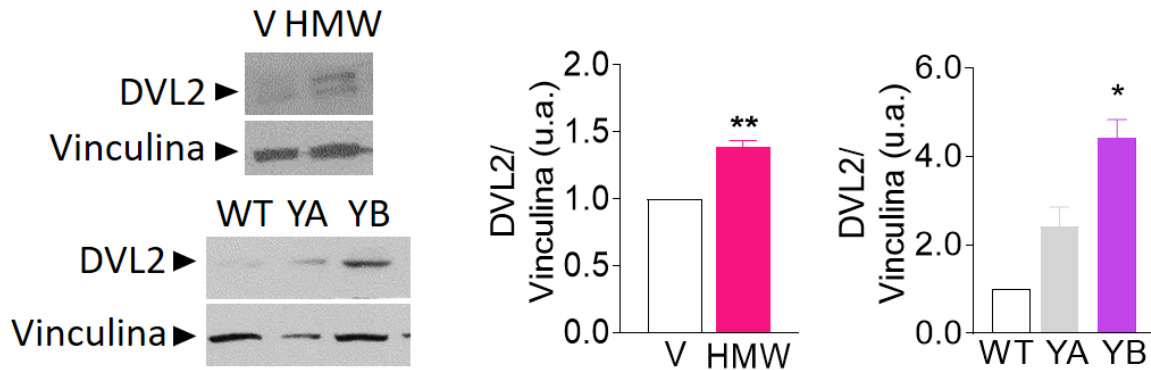
Figura r-2 A-B. Expresión y activación del correceptor LRP6 en líneas sensibles y resistentes a mifepristona, *in vitro*. (A-B) Expresión de LRP6 y pLRP6 por Wb en extractos celulares totales de T47D-V y T47D-HMW (A) o T47D-WT, -YA y -YB (B), con sus cuantificaciones relativizadas a vinculina y a LRP6. Vinculina se utilizó como control de carga. Los datos se expresan como media $\pm$ SE; * $p < 0,05$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente.

Otros componentes de la vía canónica de Wnt

Se evaluaron también componentes intracelulares de la vía de Wnt río abajo del receptor. En las líneas resistentes T47D-HMW y T47D-YB se observó un aumento de DVL2 por *Wb* respecto a las líneas sensibles (**Figura r-3 A**), mientras que los niveles de DVL3 y AXIN1 se mantuvieron comparables entre todas las líneas analizadas (**Figura r-3 B-C**).

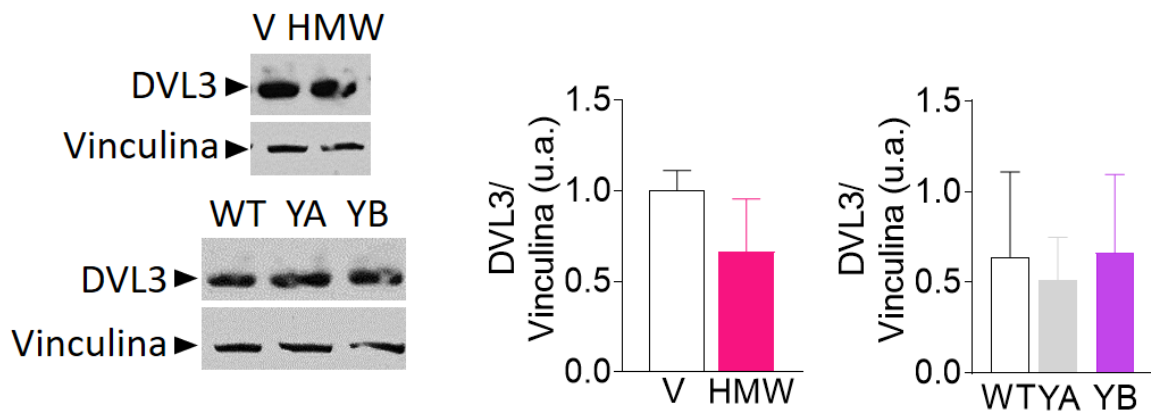
A

DVL2 *in vitro*



B

DVL3 *in vitro*



C

AXIN1 *in vitro*

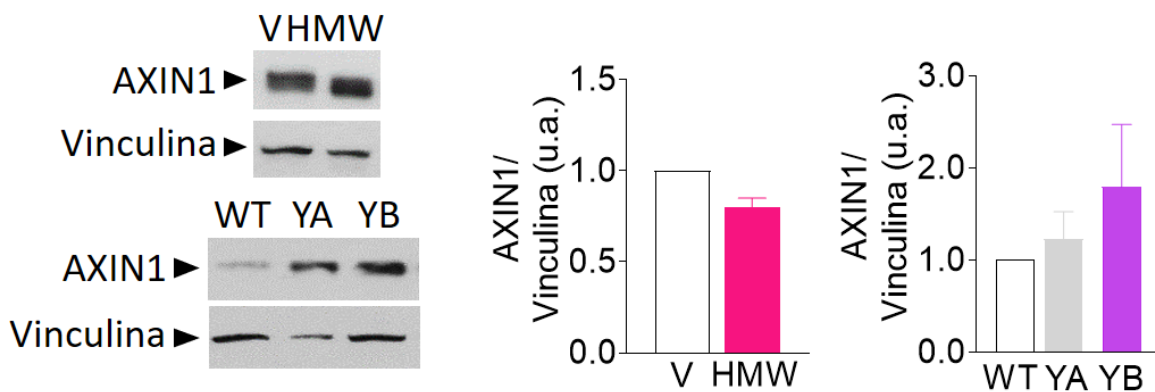


Figura r-3 A-C. Expresión de componentes citoplasmáticos de la vía de Wnt en líneas sensibles y resistentes *in vitro*. Expresión de DVL2 (**A**), DVL3 (**B**) y AXIN1 (**C**) por Wb en extractos celulares totales de T47D-V y T47D-HMW, y de las líneas T47D-WT, -YA y -YB, con sus cuantificaciones relativizadas a vinculina que se utilizó como control de carga. Los datos se expresan como media $\pm$ SE; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente.

Por otra parte, hasta el momento, ni la expresión total de GSK-3 β (**Figura r-4 A**) ni la de β -catenina (**Figura r-4 B**) mostraron diferencias significativas en las líneas resistentes T47D-HMW y T47D-YB respecto a las sensibles (**Figura r-4 A-B**). Dado que β -catenina trasloca al núcleo cuando la vía canónica de Wnt está activa, realizamos extractos citosólicos y nucleares de las dos líneas celulares resistentes a mifepristona y evaluamos la expresión por Wb. Observamos que, en ambos casos, no sólo había expresión citosólica sino también nuclear de la proteína (**Figura r-4 C**).

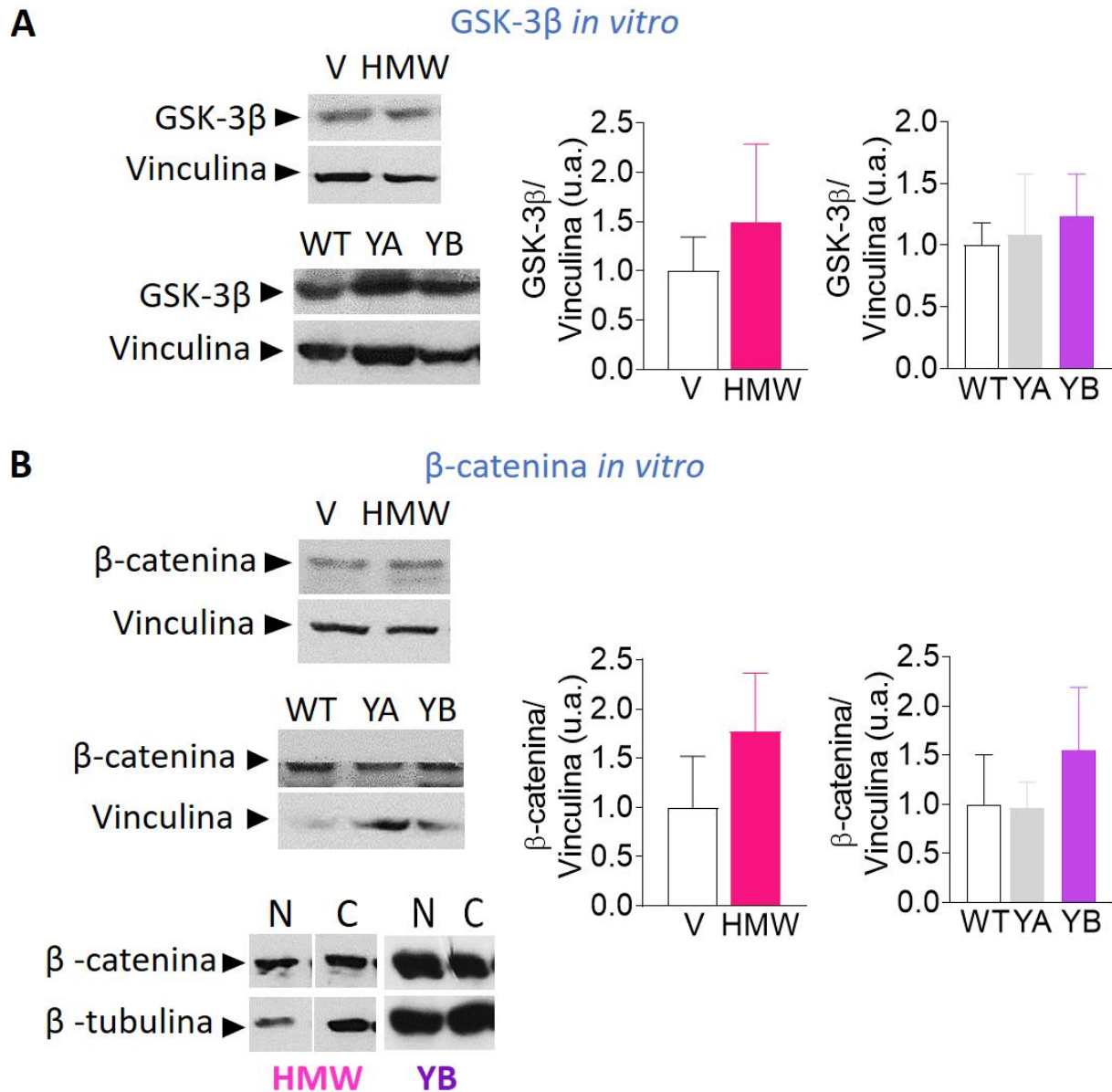


Figura r-4 A-C. Expresión de GSK-3 β y β -catenina en líneas sensibles y resistentes a mifepristona, in vitro. (A-B) Expresión de GSK-3 β (A) o β -catenina (B) por Wb en extractos celulares totales de T47D-V y T47D-HMW, y de las líneas T47D-WT, -YA y -YB, con sus cuantificaciones relativizadas a vinculina que se utilizó como control de carga. (C) Expresión de β -catenina en extractos nucleares (N) y citoplasmáticos (C) de T47D-HMW y T47D-YB. Se utilizó β -tubulina como control de carga. Los datos se expresan como media $\pm$ SD. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de test de Tukey. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente.

Modelo endócrino resistente T47D-HMW. Ensayos *in vivo*

También se estudiaron algunos de estos componentes de la vía en extractos tumorales derivados del modelo T47D-HMW donde se observó un aumento de WNT4 (**Figura r-5 A**) y de las proteínas adaptadoras DVL2 y DVL3 (**Figura r-5 B**) respecto de los controles. En el caso de pLRP6 (**Figura r-5 C**), se observó una tendencia hacia una mayor expresión en la línea resistente respecto de la sensible, en concordancia con los resultados obtenidos *in vitro* (**Figura r-2 A y r-3 A**).

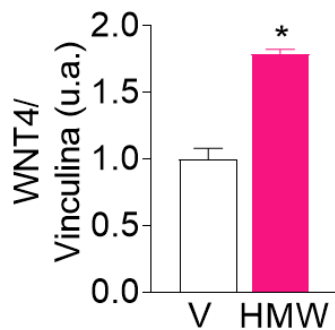
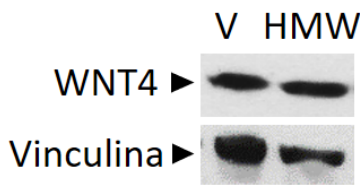
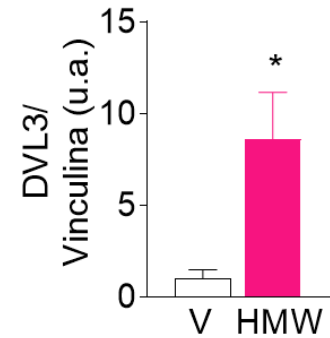
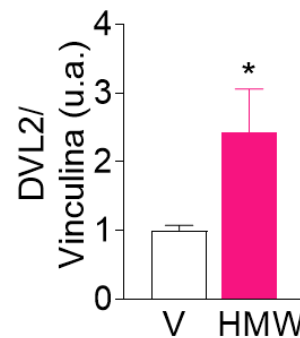
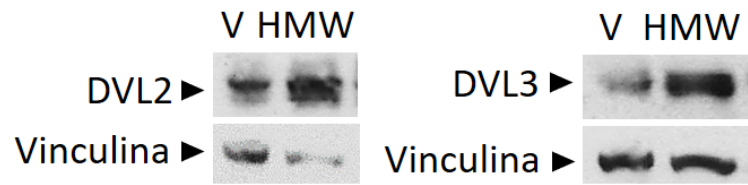
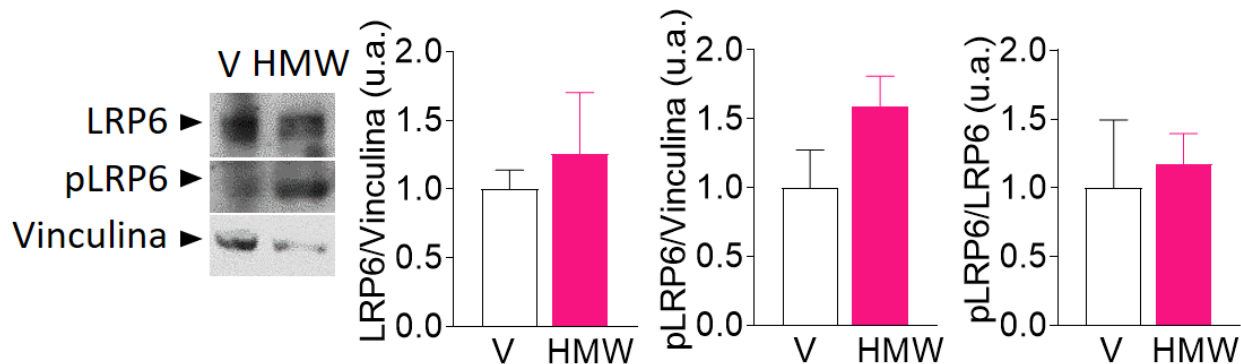
A *WNT4 in vivo***B** *DVL2 y DVL3 in vivo***C** *pLRP6 in vivo*

Figura r-5 A-C. Expresión de componentes de la vía de Wnt en tumores derivados de T47D-V y T47D-HMW. (A-C) Expresión de WNT4 (A), DVL2 y DVL3 (B) y LRP6 y pLRP6 (C) por Wb en extractos totales de tumores T47D-V y T47D-HMW, con su cuantificación relativizada a vinculina que se utilizó

como control de carga. Se graficó también pLRP6/LRP6. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; * $p < 0,05$. Análisis estadístico: t-test. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente.

En cortes histológicos derivados de todas las líneas celulares se realizaron IHQ para distintos componentes de la vía de Wnt (WNT4, WNT6, pLRP6, β -catenina y pGSK-3 β) (**Figura r-6 y r-7**). Aunque estos marcadores no se cuantificaron, se observó de forma consistente una marcación intensa de WNT4, WNT6, pLRP6, β -catenina (**Figura r-6**) y pGSK-3 β (**Figura r-7**) en los tumores correspondientes a los modelos resistentes (T47D-HMW e -YB) en comparación con sus contrapartes sensibles. Estas observaciones fueron en línea con lo observado por *Wb* e *in vitro*, reforzando la idea de una mayor activación de la vía de Wnt en las variantes resistentes respecto de las sensibles.

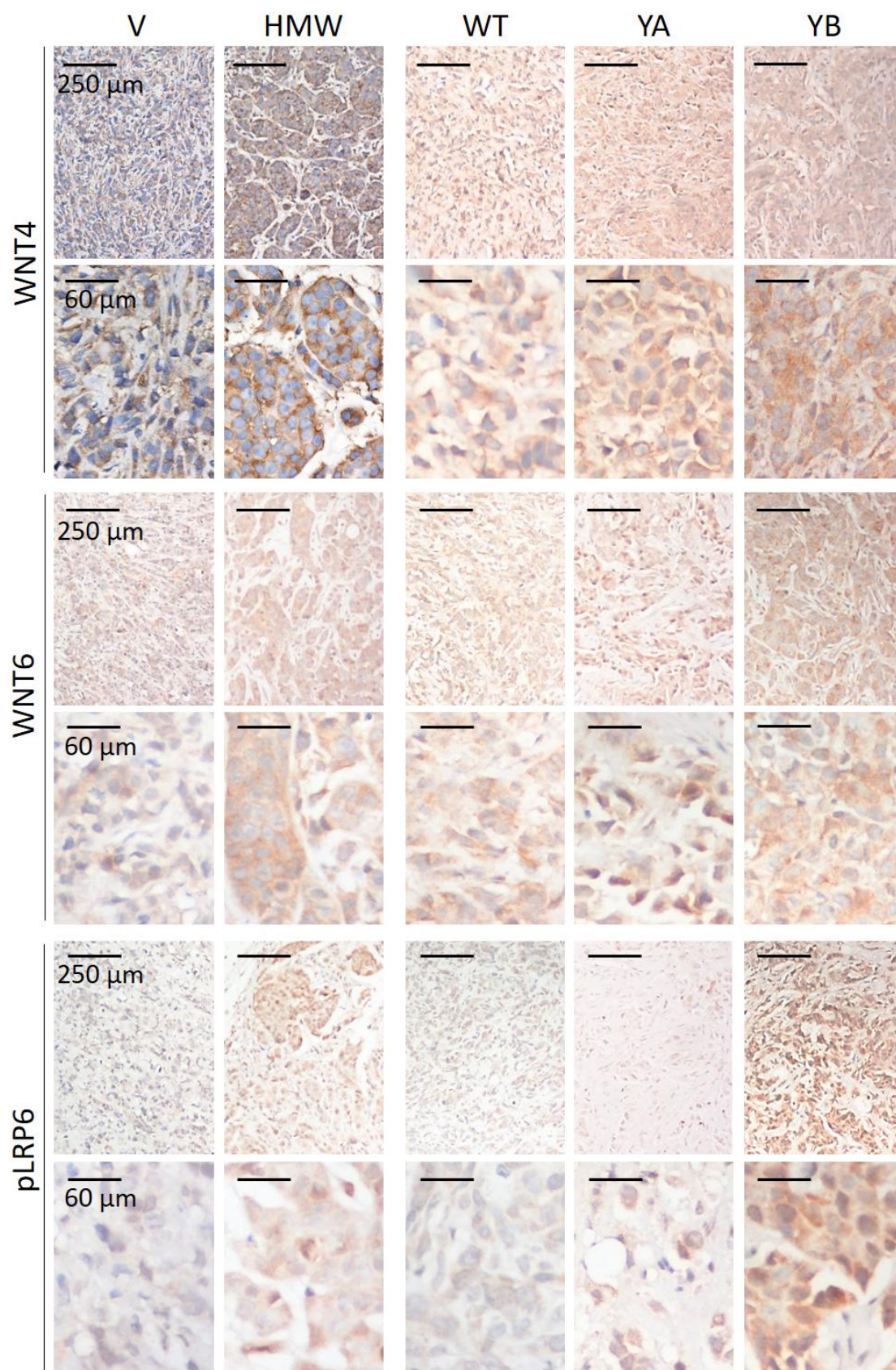


Figura r-6. Inmunomarcación de WNT4, WNT6 y pLRP6 en tumores derivados de líneas sensibles y resistentes. IHQ en cortes histológicos de tumores T47D-V, T47D-HMW; T47D-WT, T47D-YA y T47D-YB, para WNT4, WNT6 y pLRP6. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente. Escala: 250 μ m y 60 μ m.

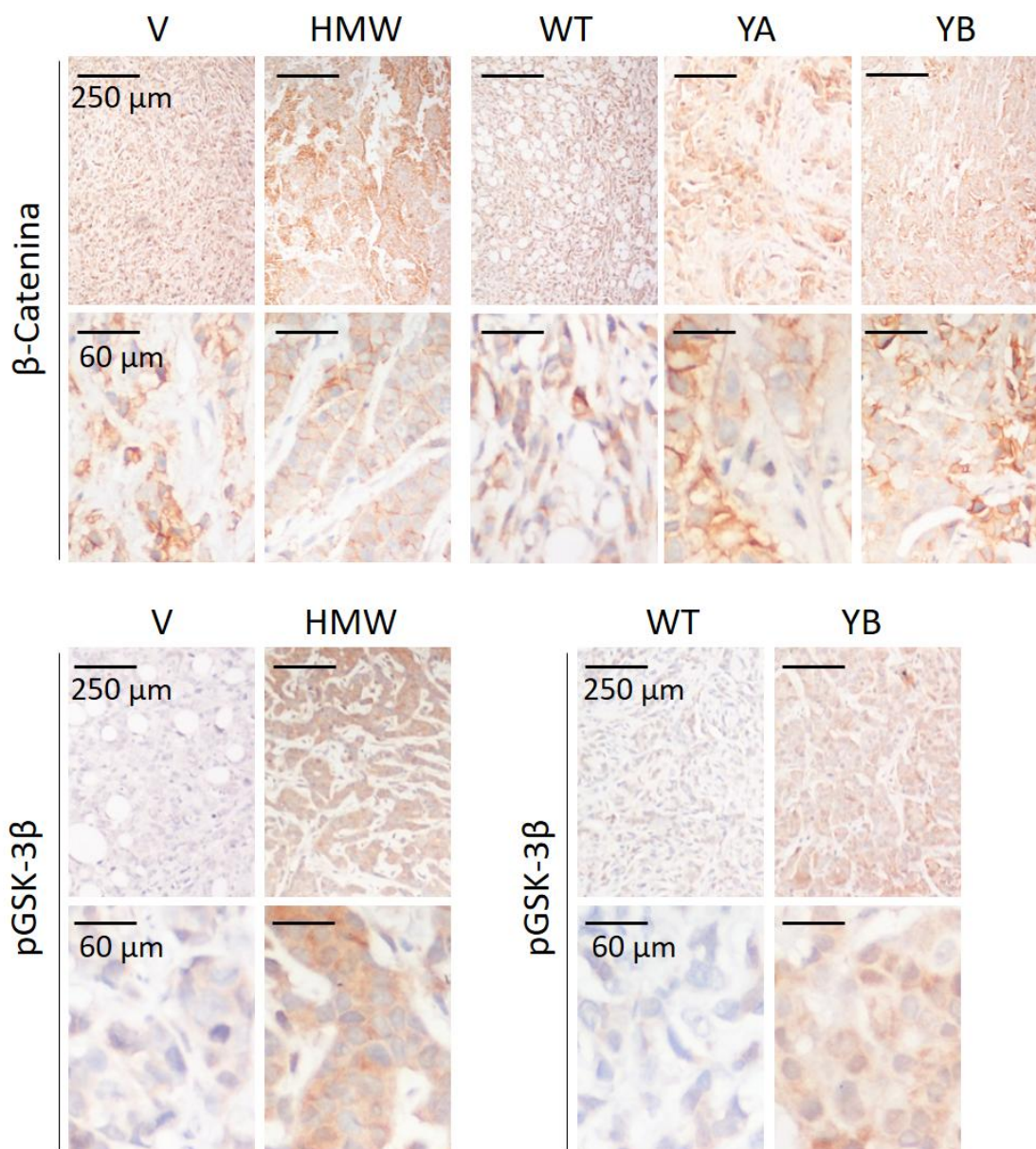


Figura r-7. Inmunomarcación de β -catenina y pGSK-3 β en tumores derivados de líneas sensibles y resistentes a mifepristona. IHQ en cortes histológicos de tumores T47D-V, T47D-HMW, T47D-WT,

T47D-YA y T47D-YB para WNT4, WNT6 y pLRP6. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente. Escala: 250 μ m y 60 μ m.

Con estos resultados se pudo establecer que los modelos resistentes T47D-HMW y T47D-YB presentaron una mayor expresión de algunos componentes de la vía de Wnt que sus líneas parentales sensibles. En ambos casos se observaron incrementos del ligando WNT4 (WNT6 también en T47D-HMW), y de los componentes tempranos pLRP6 y DVL2 (y DVL3 en determinados contextos), lo que indicó una activación de la señalización de la vía. A pesar de la activación, no se detectaron cambios robustos en los componentes del complejo de degradación (AXIN1, GSK-3 β) ni en la acumulación nuclear de β -catenina (aunque si observamos una acumulación citoplasmática de la misma).

Modelo endócrino resistente T47D-LMW *in vitro* e *in vivo*

Esta misma caracterización de la vía de Wnt se realizó en el modelo de T47D-LMW. Este modelo sobreexpresa la isoforma LMW de 18 kDa de FGF2, es resistente a antiprogestágenos, expresa menores niveles de PR y ER junto con baja expresión de AR respecto de la línea control T47D-V (ver **Antecedentes, Figura a-4 A-E**). Se observó también una desregulación de la vía de Wnt por ARNseq (Tesis *Dra. Figueroa*). En ensayos *in vitro*, la línea T47D-LMW mostró un aumento de WNT4, así como una tendencia al incremento de LRP6, pLRP6, DVL3 en comparación con la línea T47D-V (**Figura r-8 A-E**).

De manera similar, en tumores derivados de T47D-LMW se detectó un aumento de WNT6 y DVL3, junto con una tendencia al aumento de DVL2 respecto de los tumores control (**Figura r-9 A-D**). Por IHQ se obtuvieron imágenes representativas de los marcadores WNT4, WNT6, pLRP6 y β -catenina y se observó una marca intensa en el modelo T47D-LMW respecto al T47D-V (**Figura r-10**).

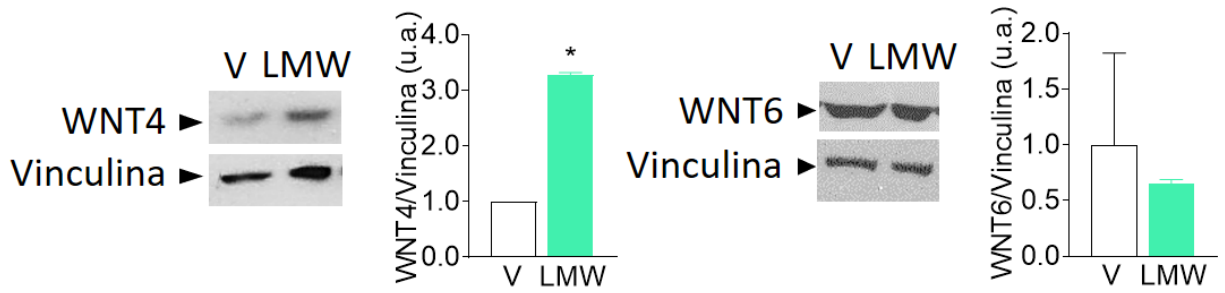
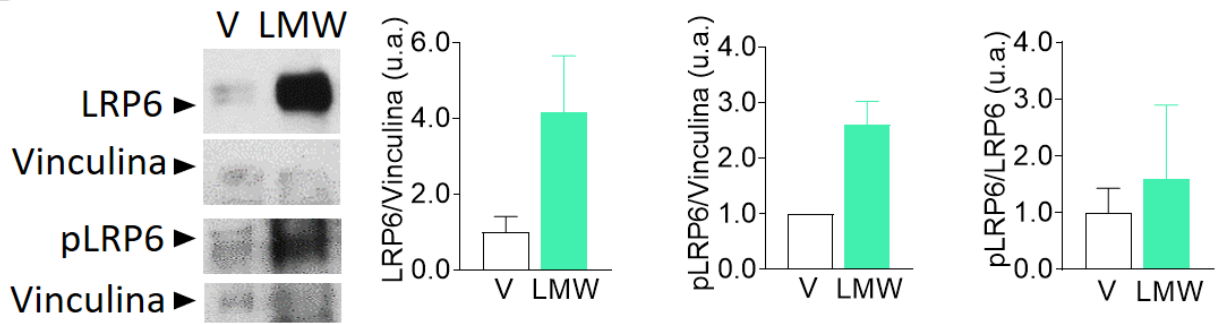
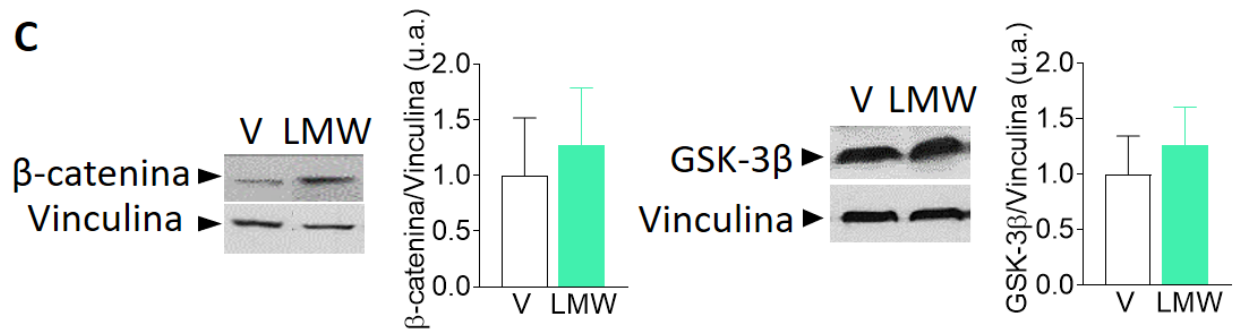
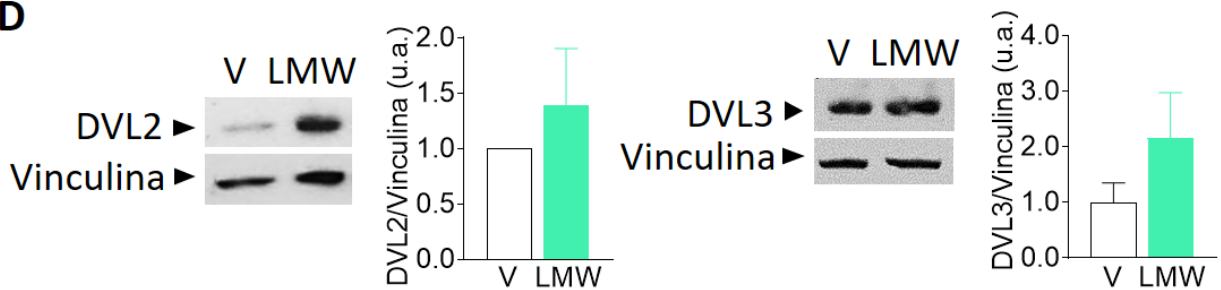
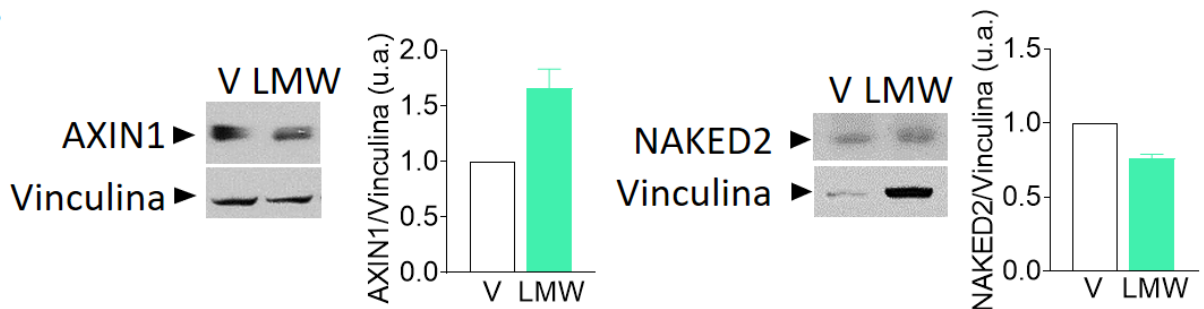
A**T47D-LMW *in vitro*****B****C****D****E**

Figura r-8 A-E. Expresión de componentes de la vía de Wnt en la línea T47D-V y T47D-LMW, in vitro. **(A-E)** Expresión de los ligandos WNT4 y WNT6 **(A)**; pLRP6 y LRP6 **(B)**; β -catenina y GSK-3 β **(C)**; DVL2 y DVL3 **(D)** AXIN1 y NAKED2 **(E)** por Wb en extractos celulares totales de T47D-V y T47D-LMW, con sus cuantificaciones relativizadas a vinculina, que se utilizó como control de carga. Además, se muestra pLRP6/LRP6 **(B, derecha)**. Los datos se expresan como media $\pm$ SE; * $p < 0,05$. Análisis estadístico: t-test. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-LMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de bajo peso molecular (18 kDa).

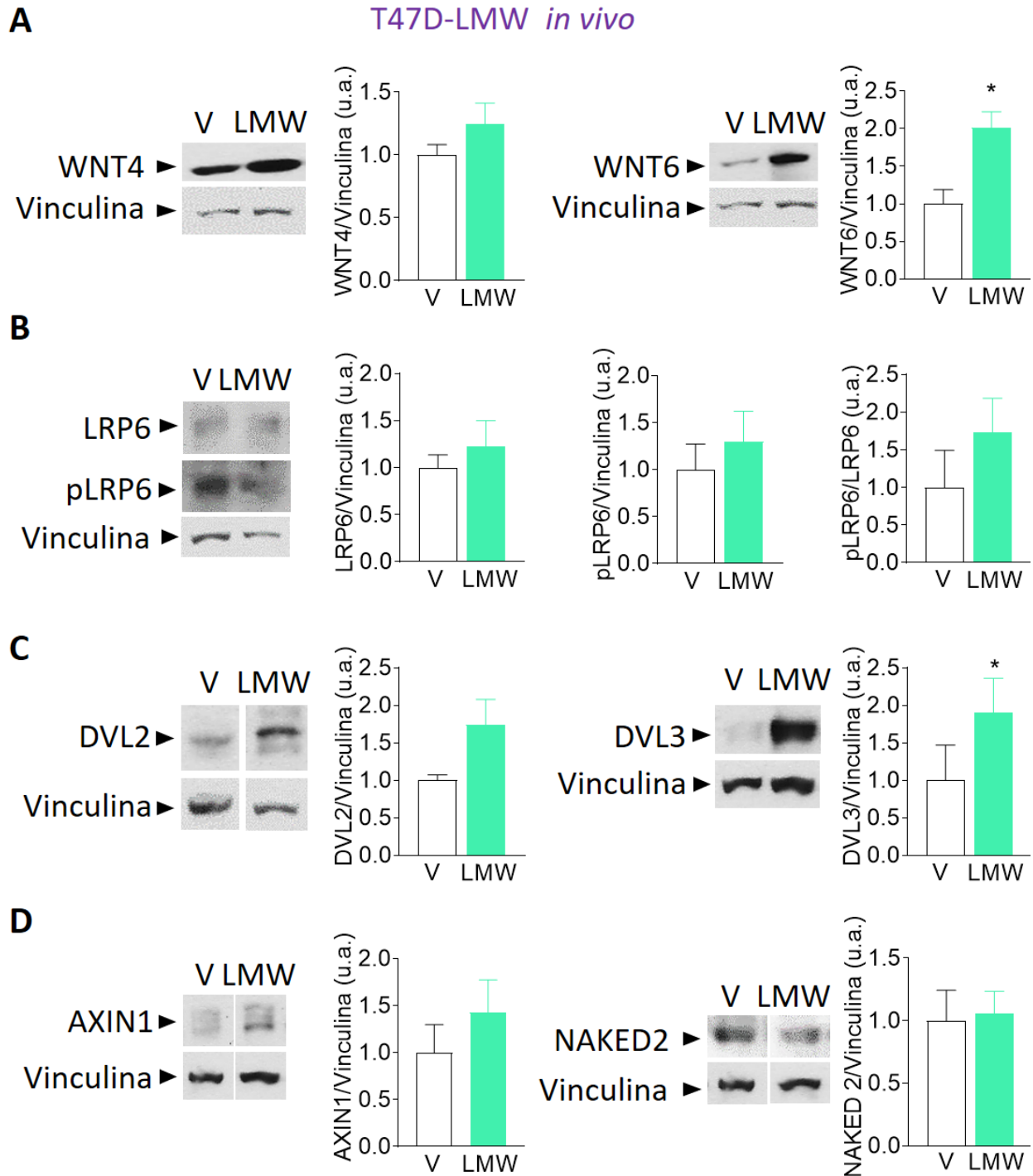


Figura r-9 A-D. Expresión de componentes de la vía de Wnt en tumores derivados de T47D-V y T47D-LMW. (A-D) Expresión de WNT4 y WNT6 (A); pLRP6 y LRP6 (B); DVL2 y DVL3 (C); AXIN1 y NAKED2 (D) por Wb en extractos totales de tumores, T47D-V y T47D-LMW, con sus cuantificaciones relativizadas a vinculina, que se utilizó como control de carga. Además, se muestra pLRP6/LRP6 (B, derecha). Los datos

se expresan como media $\pm$ SD; * $p < 0,05$. Análisis estadístico: t-test. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-LMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de bajo peso molecular (18 kDa).

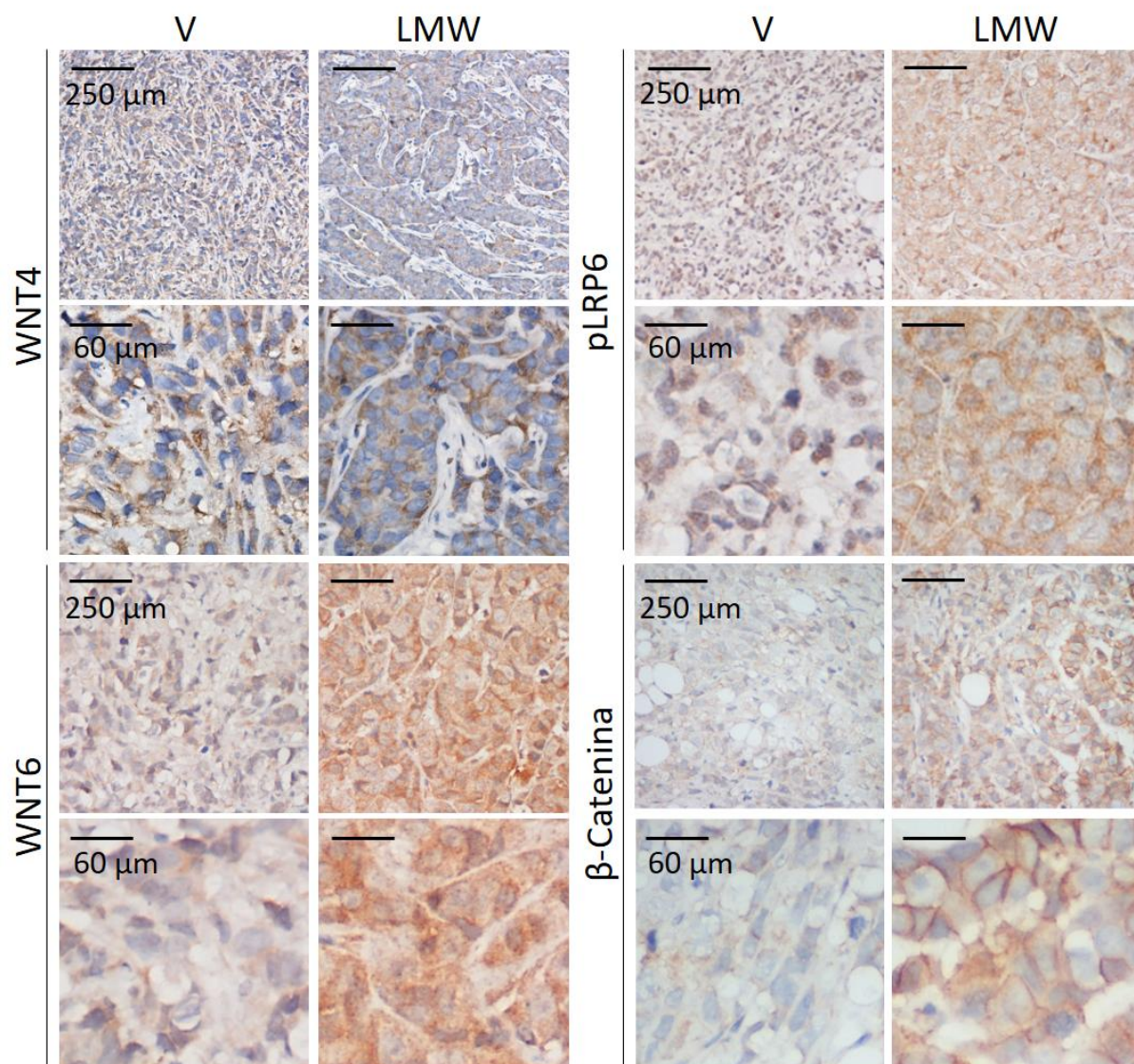


Figura r-10. Inmunomarcación de componentes de la vía de Wnt en tumores derivados de T47D-V y T47D-LMW. IHQ en cortes histológicos de tumores T47D-V y T47D-LMW para WNT4, WNT6, pLRP6 y β -catenina. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-LMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de bajo peso molecular (18 kDa). Escala: 250 μ m y 60 μ m.

En el modelo T47D-LMW, aun en un contexto biológico distinto al mencionado anteriormente con T47D-HMW (bajo AR y predominio de FGF2 citosólico/extracelular), la sobreexpresión de LMW-FGF2 también se asoció con un aumento en la expresión de componentes de la vía canónica de Wnt.

Inhibición de la vía de Wnt con LGK-974 en modelos resistentes

Los resultados anteriores indicaron cambios en la expresión de los distintos componentes de la vía canónica de Wnt en los modelos resistentes a mifepristona, sugiriendo así una activación de la vía. Con el objetivo de corroborar dicha activación realizamos ensayos preliminares inhibiendo la vía de Wnt con LGK-974. En ensayos de inmunocitoquímica observamos que la marcación para pLRP6 fue intensa y se localizó predominantemente en la membrana celular de células T47D-HMW (**Figura r-11 A**) e -YB (**Figura r-11 B**). Dicha expresión fue menos evidente al tratar las células durante 6 h con el inhibidor de Wnt LGK-974.

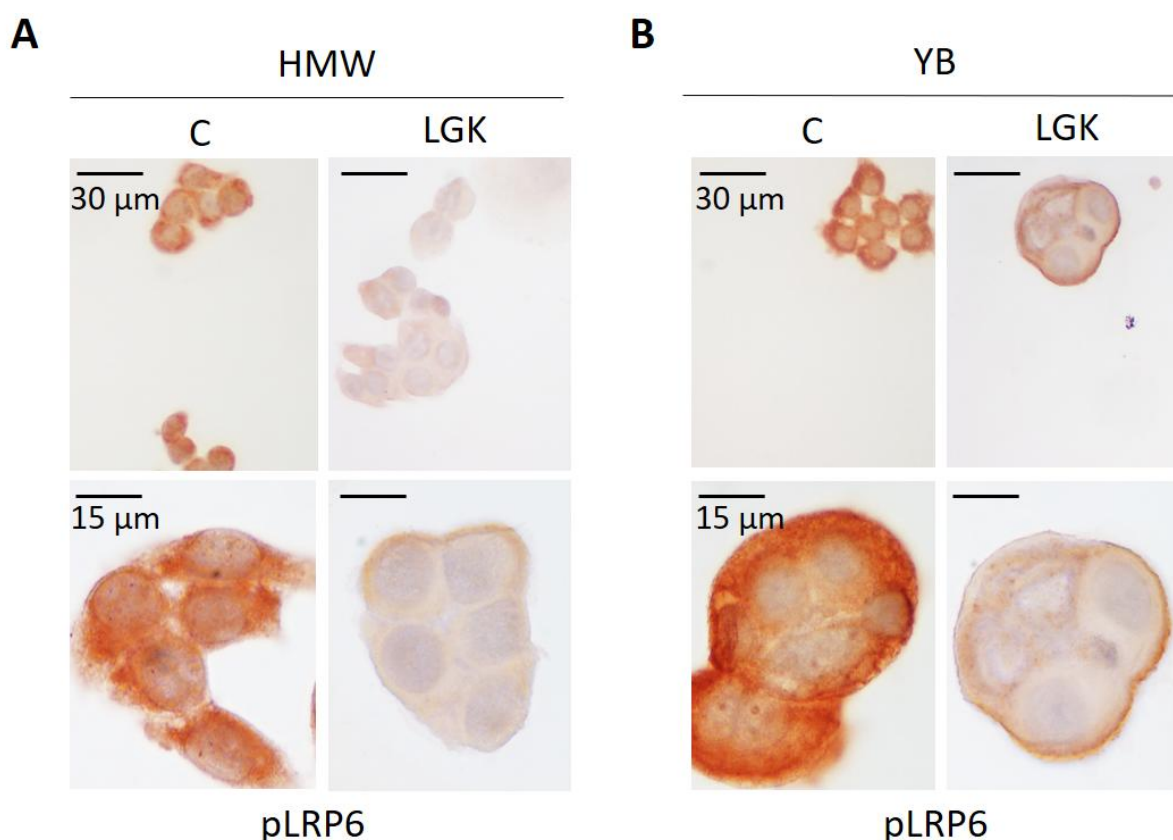


Figura r-11 A-B. Expresión de pLRP6 en líneas resistentes a mifepristona T47D-HMW y T47D-YB tratadas con LGK-974. Ensayo preliminar (N=1) de inmunocitoquímica para pLRP6 en T47D-HMW (A) y T47D-YB (B) tratados in vitro con LGK-974 (LGK; 1 μM) o con vehículo (C) durante 6 h. T47D-HMW: línea T47D que

sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa); T47D-YB: T47D que expresa la isoforma B de PR. Escala: 30 μ m y 15 μ m.

A su vez, evaluamos en la línea T47D-HMW los perfiles de expresión de β -catenina (**Figura r-12 A**), GSK-3 β total (**Figura r-12 B**) y fosforilada (**Figura r-12 C**) tras la exposición a distintos tiempos de LGK-974. Si bien estos ensayos son preliminares, se observa un patrón diferente a tiempos cortos y largos de tratamiento con el inhibidor. A tiempos cortos se observan tendencias a aumentar los niveles totales de β -catenina (**Figura r-12 A**), y GSK-3 β fosforilada (**Figura r-12 C**) mientras que estos disminuirían a las 24 h, particularmente pGSK-3 β , lo que sugiere que la vía se encuentra basalmente activa y que, por lo tanto, es capaz de inhibirse al tratar con el LGK-974.

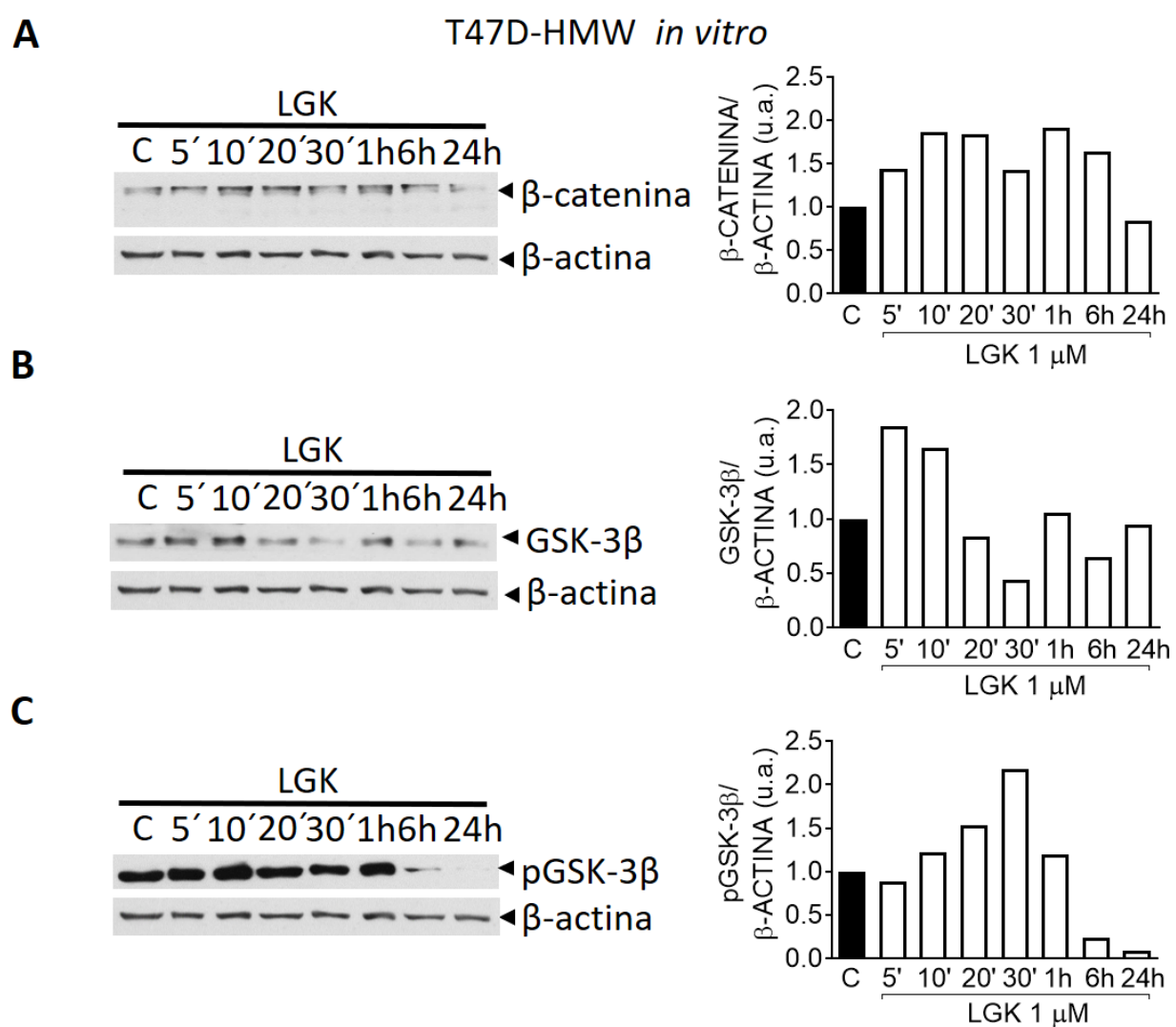


Figura r-12 A-C. Efecto de LGK-974 sobre la activación de la vía de Wnt en células T47D-HMW. Ensayo preliminar (N=1) de expresión de β -catenina (**A**), GSK-3 β total (**B**) y pGSK-3 β (**C**) por Wb a distintos

tiempos de tratamiento con LGK-974, con sus respectivas cuantificaciones. Se utilizó β -actina como control de carga. T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa).

Los resultados de este capítulo indican que la resistencia a mifepristona de los modelos T47D-HMW, T47D-YB y T47D-LMW se asociaría con una activación de la vía canónica de Wnt, evidenciada por el aumento de los ligandos WNT4 o WNT6 y de algunos de los componentes de la vía en comparación con sus líneas parentales sensibles, tanto in vitro como in vivo. Esta activación, sumada a las tendencias observadas en β -catenina, plantea la posibilidad de que la modulación de este eje contribuya a los mecanismos de resistencia endocrina que se exploran en los capítulos siguientes.

Parte II: Mecanismo

Como se mencionó en la *Introducción*, ya se había comenzado a estudiar la respuesta a andrógenos y antiandrógenos, así como a inhibidores de Wnt en el modelo T47D-HMW, uno de los modelos endócrino resistentes que expresa altos niveles de AR (Tesis *Dra. Figueroa*). Es por lo que extendimos nuestros resultados a otro modelo endócrino resistente, el T47D-YB, que expresa niveles elevados de FGF2 y de AR. En las figuras que se presentan a continuación se repitieron algunos de los ensayos con la línea T47D-HMW y, en otros casos, se muestran los resultados de la *Dra. Figueroa* (cuando es así se indica en la figura) para poder comparar las respuestas con el modelo T47D-YB.

O.E.2a: En modelos experimentales luminales resistentes a antiprogestágenos (ER⁺PRB-H) que expresan altos niveles de AR y HMW-FGF2, estudiar el efecto de antiandrógenos, la dihidrotestosterona (DHT) e inhibidores de la vía de Wnt sobre la proliferación celular.

Efecto de andrógenos y antiandrógenos sobre la proliferación celular

Para definir la dosis de dihidrotestosterona (DHT) con mayor actividad proliferativa se ensayaron concentraciones en el rango de 0.01 a 10 μM a distintos tiempos de incubación en la línea T47D-HMW (**Figura r-13 A**). Observamos que la DHT 0.01 μM fue el más potente e indujo la proliferación celular a partir de las 96 h de tratamiento. Por lo tanto, esta concentración fue seleccionada para continuar con los siguientes ensayos. Se muestran imágenes representativas tomadas a tiempo inicial y final (**Figura r-13 B**), que reflejan la actividad proliferativa de la DHT 0.01 μM tanto en campo claro como en fluorescencia, aprovechando que el plásmido de expresión de HMW-FGF2 también expresa la proteína fluorescente verde (GFP). Luego comparamos el efecto del andrógeno en los dos modelos resistentes respecto de sus contrapartes sensibles endocrinas. Ya sabíamos que en el modelo T47D-HMW la DHT aumenta la proliferación celular mientras que el efecto es inhibitorio en su contraparte sensible, T47D-V (**Figura r-13 C; Tesis Dra. Figueroa). Al evaluar el efecto del andrógeno en el modelo resistente T47D-YB también se observó un aumento significativo en la proliferación celular mientras que el fármaco no tuvo un efecto significativo en el modelo sensible, T47D-YA (**Figura r-13 D**).**

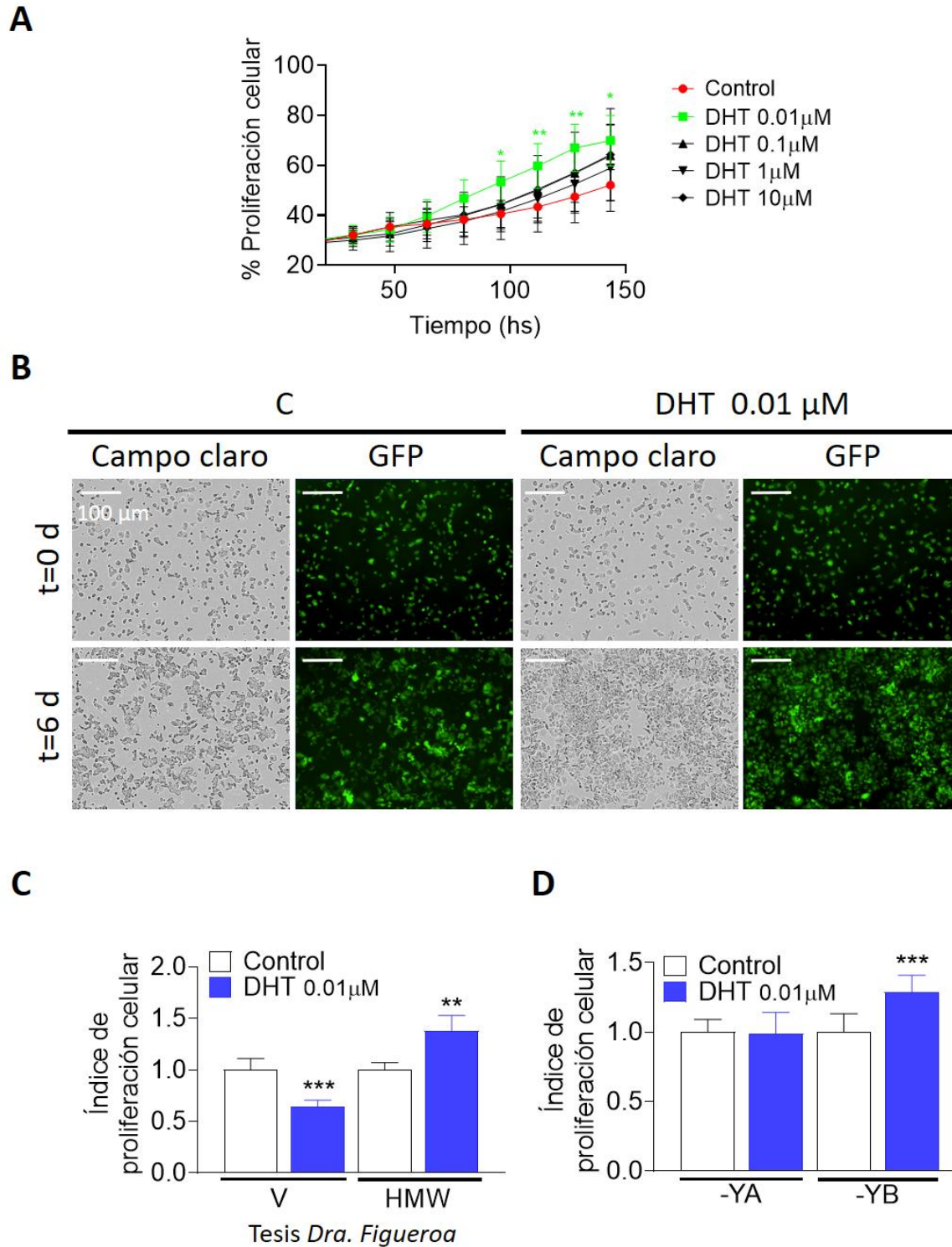


Figura r-13 A-D. Proliferación celular en líneas T47D bajo tratamiento con DHT. **(A)** Índice de proliferación celular en la línea T47D-HMW en condiciones control o tratadas con distintas concentraciones de DHT (0,01; 0,1; 1 y 10 μM) durante 6 días. **(B)** Imágenes representativas en campo claro y fluorescencia GFP

en células T47D-HMW al día 0 y 6, en condiciones control (C) o tratadas con DHT 0,01 μM . Cuantificación de la proliferación por conteo celular al día 6 en T47D-V y T47D-HMW (C) o T47D-YA e -YB (D), en condiciones control o tratadas con DHT 0,01 μM . En cada caso los datos se relativizaron a la condición control. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías para las curvas de crecimiento (A) y t de Student para los gráficos de barras (C, D). DHT: dihidrotestosterona; T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente. Escala: 100 μm .

Luego, evaluamos el efecto del bloqueo del AR utilizando antiandrógenos con distintos mecanismos de acción como la enzalutamida, flutamida y AZD-3514. Observamos que ambas concentraciones de enzalutamida inhibieron la proliferación celular en la línea T47D-YB mientras que el antiandrógeno no tuvo efectos significativos en T47D-YA (Figura r-14 B). A modo comparativo, observamos un efecto similar de la enzalutamida en T47D-HMW (Figura r-14 A; Tesis Dra. Figueroa).

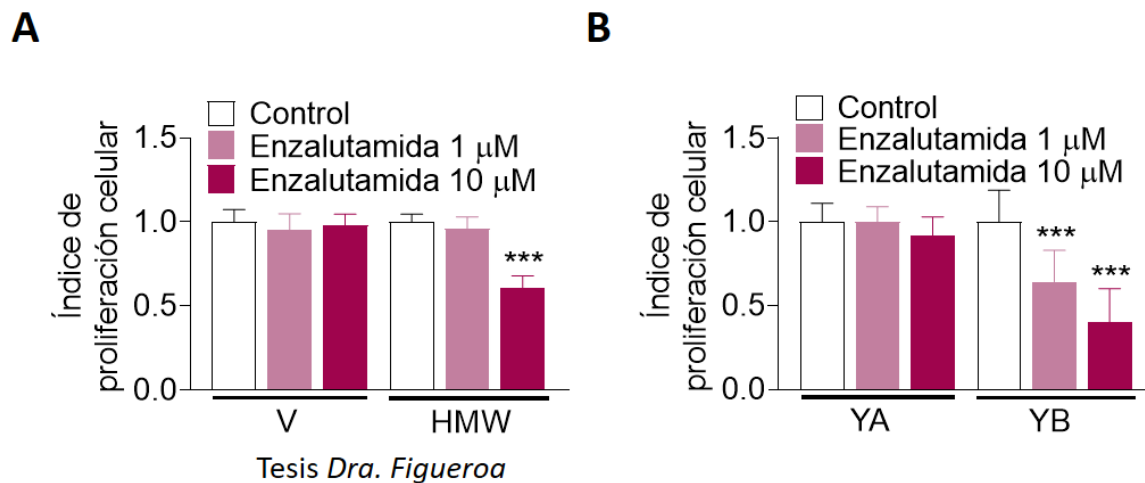


Figura r-14 A-B. Proliferación celular en líneas T47D bajo tratamiento con enzalutamida. Cuantificación de la proliferación por conteo celular en T47D-V y T47D-HMW (A) o T47D-YA y T47D-YB (B) en condiciones control o tratadas con enzalutamida 1 o 10 μM . En cada caso los datos se relativizaron a la condición control. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: T47D transfectada con un plásmido que expresa la isoforma de FGF2 de 22 kDa. T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente.

Otro de los antiandrógenos estudiados fue la flutamida. Primero se analizó un rango de concentraciones desde 0.01 a 10 μM a distintos tiempos de tratamiento, y se observó que las dosis más altas de 1 y 10 μM indujeron una inhibición significativa en la proliferación celular de la línea T47D-HMW, incluso a partir de 50 h de tratamiento (**Figura r-15 A**). Imágenes representativas ilustran los resultados observados tanto en campo claro como en fluorescencia (**Figura r-15 B**). Se seleccionaron las concentraciones de 1 y 10 μM para realizar los siguientes ensayos utilizando los dos modelos resistentes y sus contrapartes sensibles. Observamos que ambas concentraciones de flutamida inhibieron la proliferación celular a 6 días de tratamiento tanto en T47D-HMW como en T47D-YB. En las líneas sensibles, la concentración de 10 μM estimuló e inhibió la proliferación celular de T47D-V (Tesis *Dra. Figueroa*) y T47D-YA, respectivamente (**Figura r-15 C-D**).

Además, se realizaron ensayos con el antiandrógeno AZD-3514 que presenta un mecanismo de acción similar al de la enzalutamida inhibiendo tanto la unión de andrógenos al receptor como la translocación nuclear y la actividad transcripcional. Este ensayo se realizó sólo en las líneas resistentes y observamos que el fármaco indujo una inhibición de la proliferación celular en las dosis de 1 μM y 10 μM para T47D-HMW (**Figura r-16 A**) y de 10 μM para T47D-YB (**Figura r-16 B**). Como era de esperar, el antiandrógeno en la concentración de 10 μM fue capaz de inhibir el efecto proliferativo de la DHT en el modelo T47D-YB (**Figura r-16 C**).

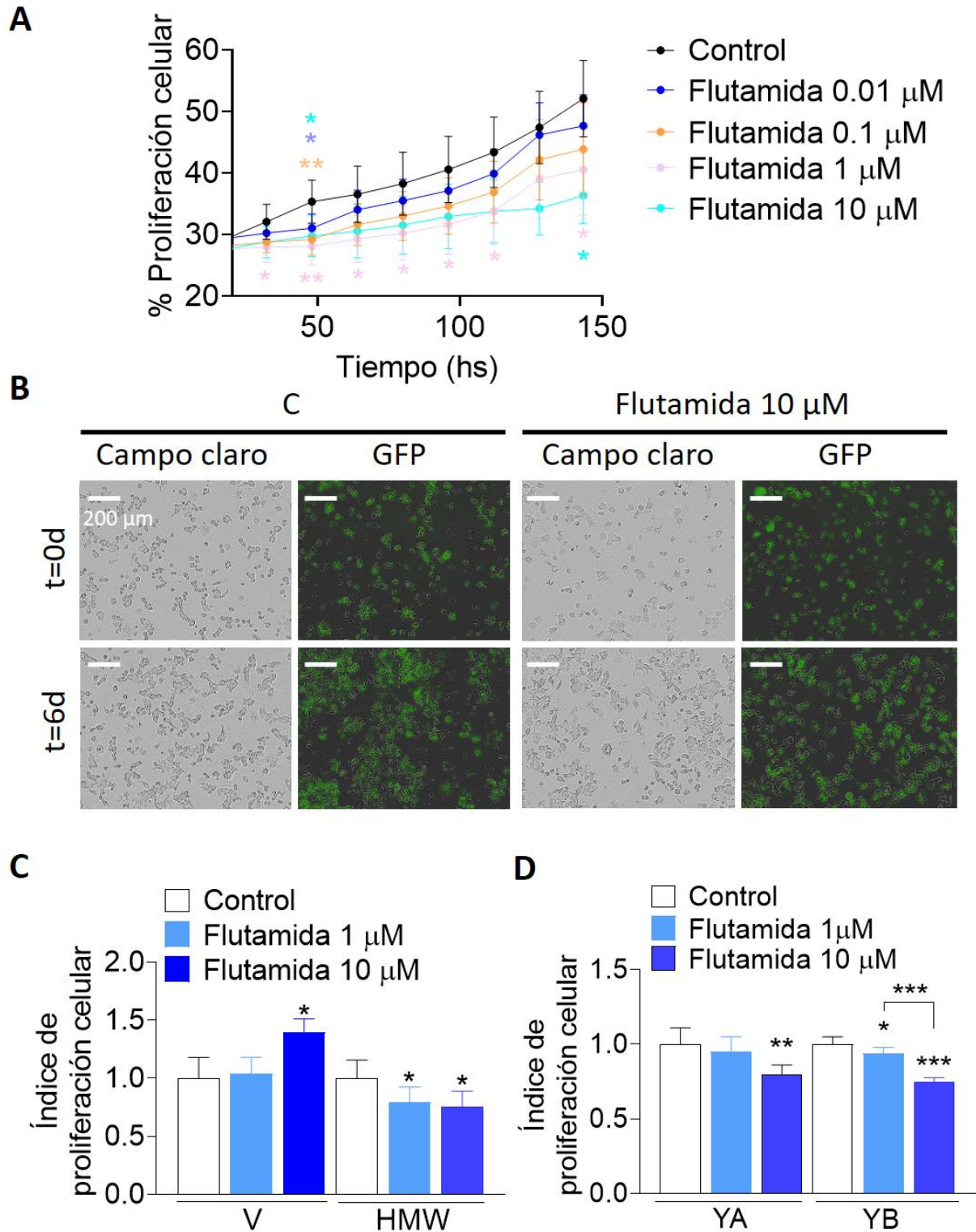


Figura r-15 A-D. Proliferación celular en líneas T47D bajo tratamiento con flutamida. **(A)** Índice de proliferación celular en la línea T47D-HMW en condiciones control o tratadas con distintas concentraciones de flutamida (0,01; 0,1; 1 y 10 μM) durante 6 días. **(B)** Imágenes representativas en

campo claro y fluorescencia GFP al día 0 y 6 en células T47D-HMW, control o tratadas con flutamida 10 μM . Cuantificación de la proliferación por conteo celular en las líneas T47D-V y T47D-HMW (C) o T47D-YA y T47D-YB (D) en condiciones control o tratadas con flutamida 1 o 10 μM por 6 días. En cada caso los datos se relativizaron a la condición control. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: T47D transfectada con un plásmido que expresa la isoforma de FGF2 de 22 kDa; T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente. Escala: 200 μm .

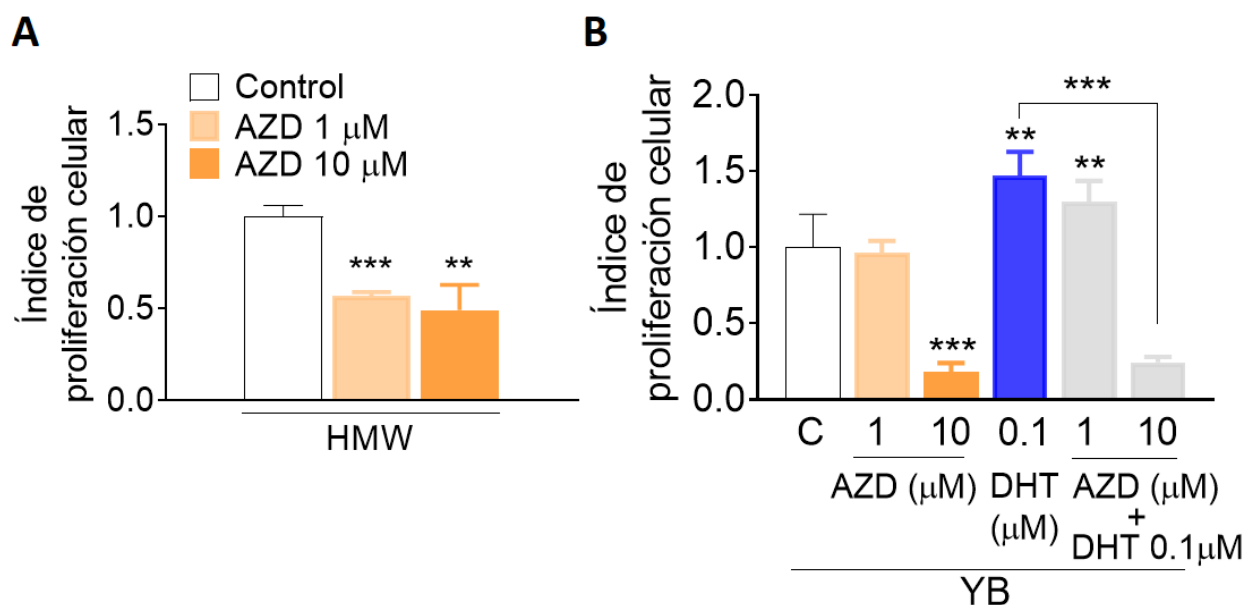


Figura r-16 A-B Proliferación celular en líneas T47D bajo tratamiento con AZD-3514. (A) Índice de confluencia en condiciones control o tratadas con AZD-3514 (1 y 10 μM) durante 6 días en la línea T47D-HMW. (B) Índice de proliferación celular en la línea T47D-YB tratada durante 6 días con AZD-3514 (1 o 10 μM), DHT 0,1 μM o la combinación de ambos tratamientos. En cada caso los datos se relativizaron a la condición control. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. T47D-HMW: T47D transfectada con un plásmido que expresa la isoforma de FGF2 de 22 kDa; T47D-YB: T47D que expresa la isoforma de B de PR.

Por lo tanto, podemos concluir que ambos modelos resistentes, T47D-HMW y T47D-YB, son sensibles al tratamiento con agonistas o antagonistas del AR estimulando o inhibiendo la proliferación celular, respectivamente.

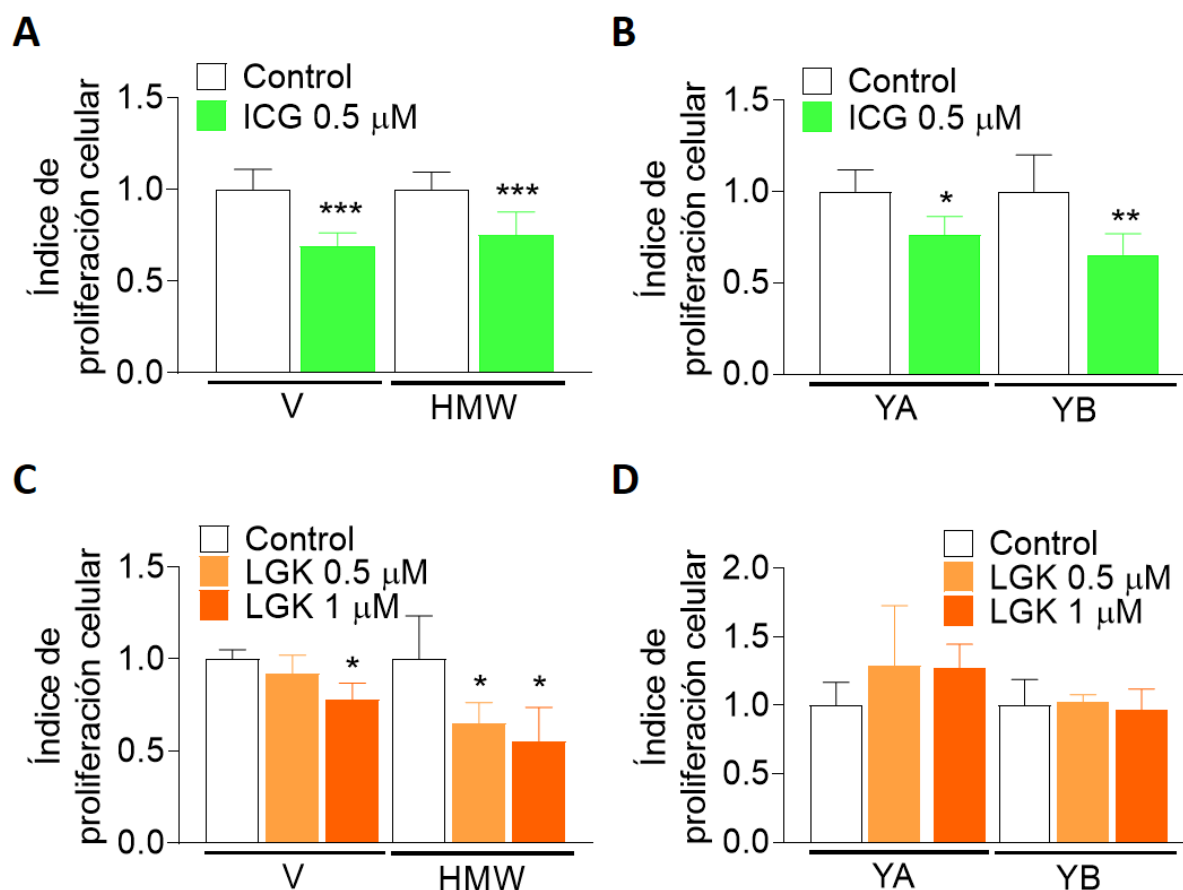
Efecto de inhibidores de la vía de Wnt sobre la proliferación celular

Teniendo en cuenta los resultados presentados en **Antecedentes** y en la sección anterior en los que mostramos que la sobreexpresión de FGF2 induce la desregulación de la vía de Wnt (**Figura a-3 A-B**) y que, a nivel de proteína, varios componentes de esta vía están aumentados en ambas líneas resistentes comparadas con sus variantes sensibles endocrinas, evaluamos el efecto del bloqueo de esta vía utilizando dos inhibidores con distinto mecanismo de acción, LGK-974 e ICG-001.

Como mencionamos en la **Introducción**, el LGK974 inhibe la vía de Wnt a nivel de los ligandos WNT y el ICG-001 interfiere en la vía canónica de Wnt/ β -catenina actuando a nivel nuclear inhibiendo la transcripción génica.

En ensayos previos del laboratorio (Tesis *Dra. Figueroa*) demostramos que tanto el LGK-974 como el ICG-001 inducen la inhibición de la proliferación celular tanto para la línea T47D-HMW como para T47D-V. Por lo tanto, aquí repetimos esos ensayos a fin de compararlos con el modelo T47D-YB. Observamos que ambas líneas celulares, T47D-YA e -YB, fueron sensibles al tratamiento con ICG-001 (**Figura r-17 B**), de manera similar a lo que ocurría con T47D-V y -HMW (**Figura r-17 A**)

En el caso del inhibidor LGK-974, se observa la inhibición de la proliferación celular en las líneas T47D-V y -HMW. El LGK-974 en su dosis más baja inhibió la proliferación celular en el modelo T47D-HMW, con lo cual este parecería tener una mayor sensibilidad que su contraparte T47D-V (**Figura r-17 C**, Tesis *Dra. Figueroa*). Por otro lado, este fármaco no indujo cambios significativos en la proliferación celular de las líneas T47D-YA e -YB (**Figura r-17 D**).



Tesis Dra. Figueroa

Figura r-17 A-D. Proliferación celular en líneas T47D bajo tratamiento con ICG-001 y LGK-974. **(A, C)** Índice de conteo celular en las líneas T47D-HMW y T47D-V en condiciones control o tratadas con ICG-001 (0,5 μ M; **A**) o LGK-974 (0,5 y 1 μ M; **C**) durante 6 días. **(B, D)** Índice de conteo celular en las líneas T47D-YB y T47D-YA en las mismas condiciones de tratamiento con ICG-001 (**B**) o LGK-974 (**D**). En cada caso los datos se relativizaron a la condición control. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. T47D-V: T47D transfectada con plásmido vacío (p6NST50); T47D-HMW: T47D que expresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa); T47D-YA o T47D-YB: T47D que expresa las isoformas A o B de PR, respectivamente.

En conjunto, estos resultados sugieren una mayor sensibilidad al bloqueo de la vía de Wnt de la línea que sobreexpresa artificialmente HMW-FGF2 (T47D-HMW) respecto de la línea T47D-YB que expresa niveles mayores de HMW-FGF2. Además, el bloqueo de la vía canónica de Wnt a nivel transcripcional (ICG-001) parece tener un mayor efecto sobre la proliferación celular que el bloqueo con LGK-974.

Dado que nuestros modelos resistentes expresaban altos niveles de AR y tenían una vía de Wnt desregulada y que, además, los andrógenos inducían y los bloqueantes de la vía de Wnt inhibían la proliferación celular, quisimos investigar si existía un *crosstalk* entre ambas vías de señalización con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en la resistencia endocrina.

***Crosstalk* AR-Wnt: proliferación celular**

Para ello, en primer lugar, evaluamos el efecto del bloqueo de la vía de Wnt sobre el aumento de la proliferación inducida por DHT.

Como el inhibidor de Wnt, ICG-001 mostraba un efecto inhibitorio más pronunciado que el LGK-974, y, acompañado de su mecanismo de acción a nivel nuclear, nos permitía explorar también una posible regulación transcripcional. Por lo tanto, elegimos el ICG-001 para continuar con los siguientes experimentos.

El tratamiento combinado de DHT con ICG-001, en ambas dosis, revirtió el efecto proliferativo de la DHT, tanto en la línea T47D-HMW (**Figura r-18 A**) como en T47D-YB (**Figura r-19 A**). Asimismo, en el modelo T47D-HMW la reversión es incluso mayor que en T47D-YB, alcanzando niveles por debajo del tratamiento control. Estos efectos se vieron reflejados también en las imágenes de las células creciendo en monocapa bajo los distintos tratamientos (**Figura r-18 B y r-19 B**).

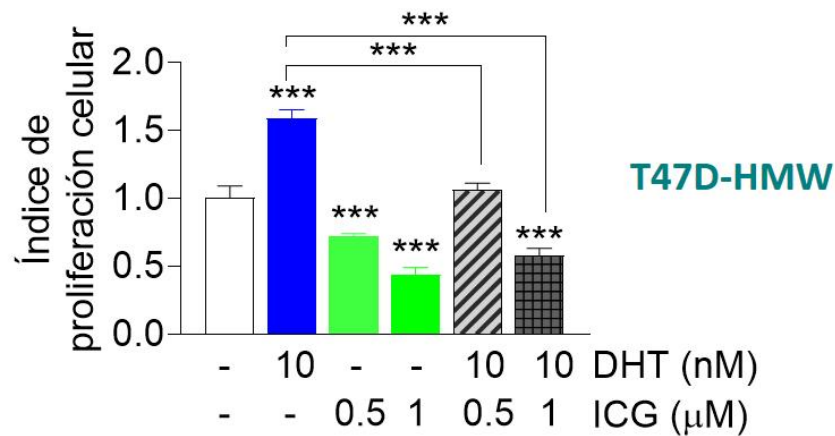
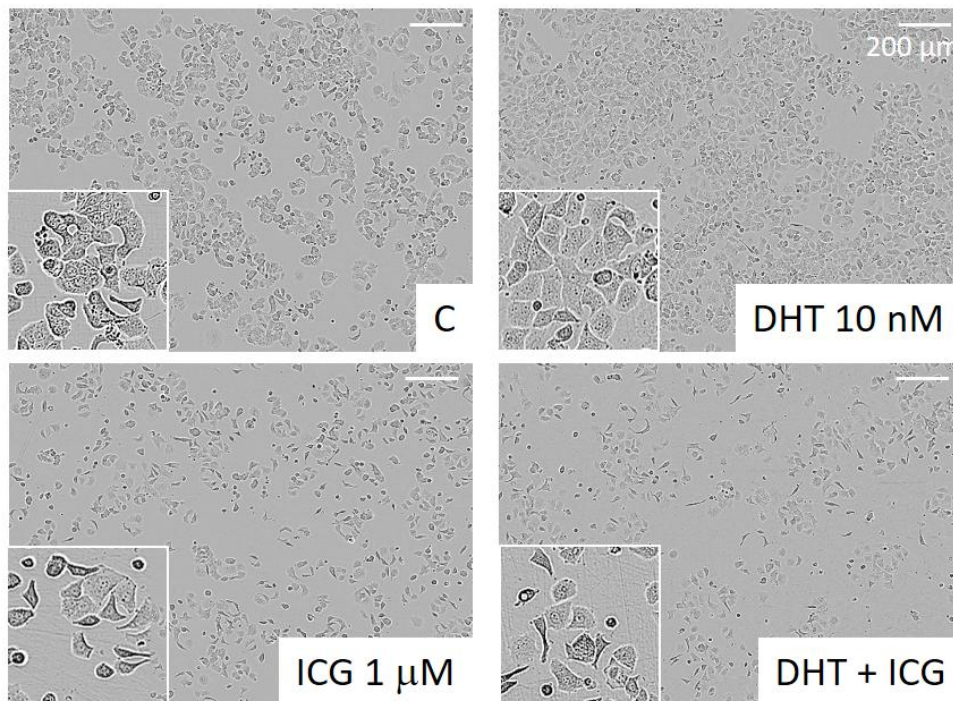
A**B**

Figura r-18 A-B. Efecto de DHT e ICG-001 en la proliferación celular de la línea T47D-HMW. **(A)** Índice de proliferación en T47D-HMW en condiciones control o tratadas con DHT (10 nM) e ICG-001 (0,5 y 1 μM), solos o en combinación, durante 6 días. En cada caso los datos se relativizaron a la condición control. **(B)** Imágenes representativas en campo claro al tiempo final en T47D-HMW bajo las condiciones control (C), DHT 10 nM, ICG-001 1 μM y tratamiento combinado (DHT + ICG). Escala 100 μm. Los recuadros muestran ampliaciones de áreas seleccionadas para una mejor visualización de las células. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. T47D-HMW: T47D transfectada con un plásmido que expresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). Escala: 200 μm.

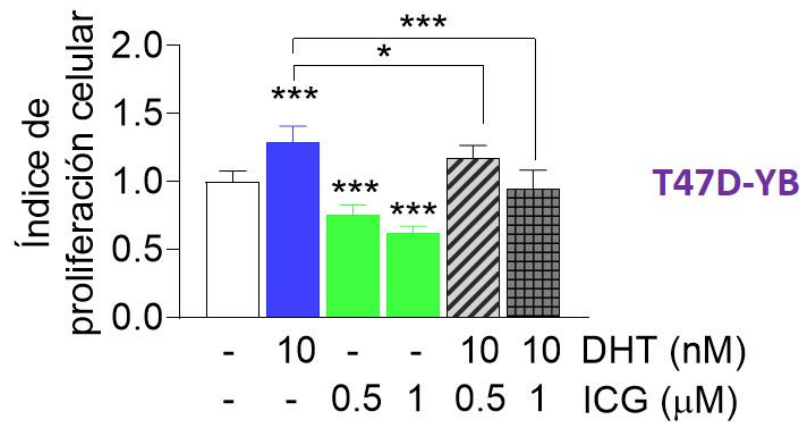
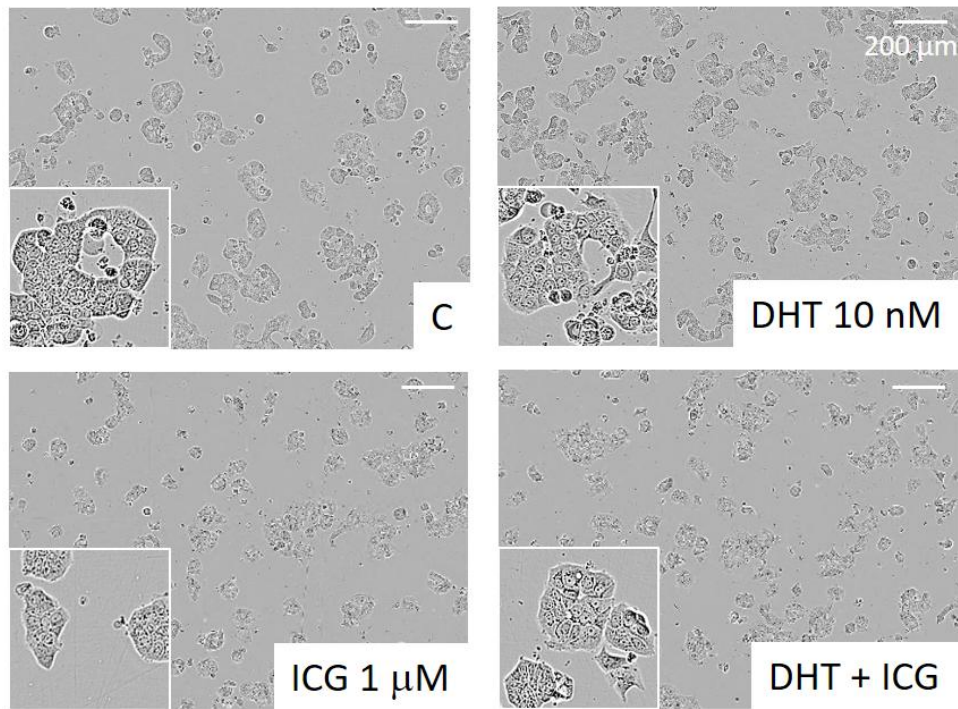
A**B**

Figura r-19 A-B. Efecto de DHT e ICG-001 en la proliferación celular de la línea T47D-YB. **(A)** Índice de proliferación en T47D-YB en condiciones control o tratadas con DHT (10 nM) e ICG-001 (0,5 y 1 μM), solos o en combinación, durante 6 días. En cada caso los datos se relativizaron a la condición control. **(B)** Imágenes representativas en campo claro al tiempo final en T47D-YB bajo las condiciones control (C), DHT 10 nM, ICG-001 1 μM y tratamiento combinado (DHT + ICG). Escala 100 μm. Los recuadros muestran ampliaciones de áreas seleccionadas para una mejor visualización de las células. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. T47D-YB: T47D que expresa la isoforma B de PR. Escala: 200 μm.

En conjunto, estos resultados sugieren un crosstalk entre las vías de AR y Wnt en las líneas celulares endocrino resistentes que expresan niveles elevados de HMW-FGF2.

O.E.2b: En modelos experimentales luminales resistentes a antiprogestágenos (ER⁺PRB-H) que expresan altos niveles de AR y HMW-FGF2, estudiar el efecto de inhibidores de la vía de Wnt sobre la expresión de AR.

Crosstalk AR-Wnt: expresión de AR

A partir de estos resultados, en una segunda instancia nos propusimos estudiar los mecanismos involucrados en dicho *crosstalk*. Para ello, y teniendo en cuenta los elevados niveles de AR en el modelo T47D-HMW, evaluamos el efecto de los inhibidores de Wnt sobre la expresión de AR.

En primer lugar, realizamos un ensayo exploratorio en células T47D-HMW para evaluar el efecto del LGK-974 a distintos tiempos sobre la expresión de AR por *Wb*. Observamos a los 10 minutos una expresión elevada de AR seguidos por bajos niveles a partir de las 6 h, que se mantienen al menos hasta las 24 h (**Figura r-20 A**). En base al perfil obtenido, se eligió el tiempo de 24 h para continuar con los ensayos. En la **Figura r-20 B** observamos que el tratamiento con LGK por 24 h inhibió la expresión de AR *in vitro*. Aprovechando que contábamos también con muestras del tumor T47D-HMW creciendo *in vivo* en condiciones control y tratados con LGK-974, evaluamos la expresión de AR por *Wb* e IHQ, donde también observamos una disminución en la expresión de AR en los tumores tratados con el inhibidor (**Figura r-20 C**).

Asimismo, realizamos ensayos similares, pero tratando con ICG-001 y determinamos que el tratamiento redujo la expresión de AR tanto a nivel de proteína (**Figura r-20 D**) como de ARNm (**Figura r-20 E**).

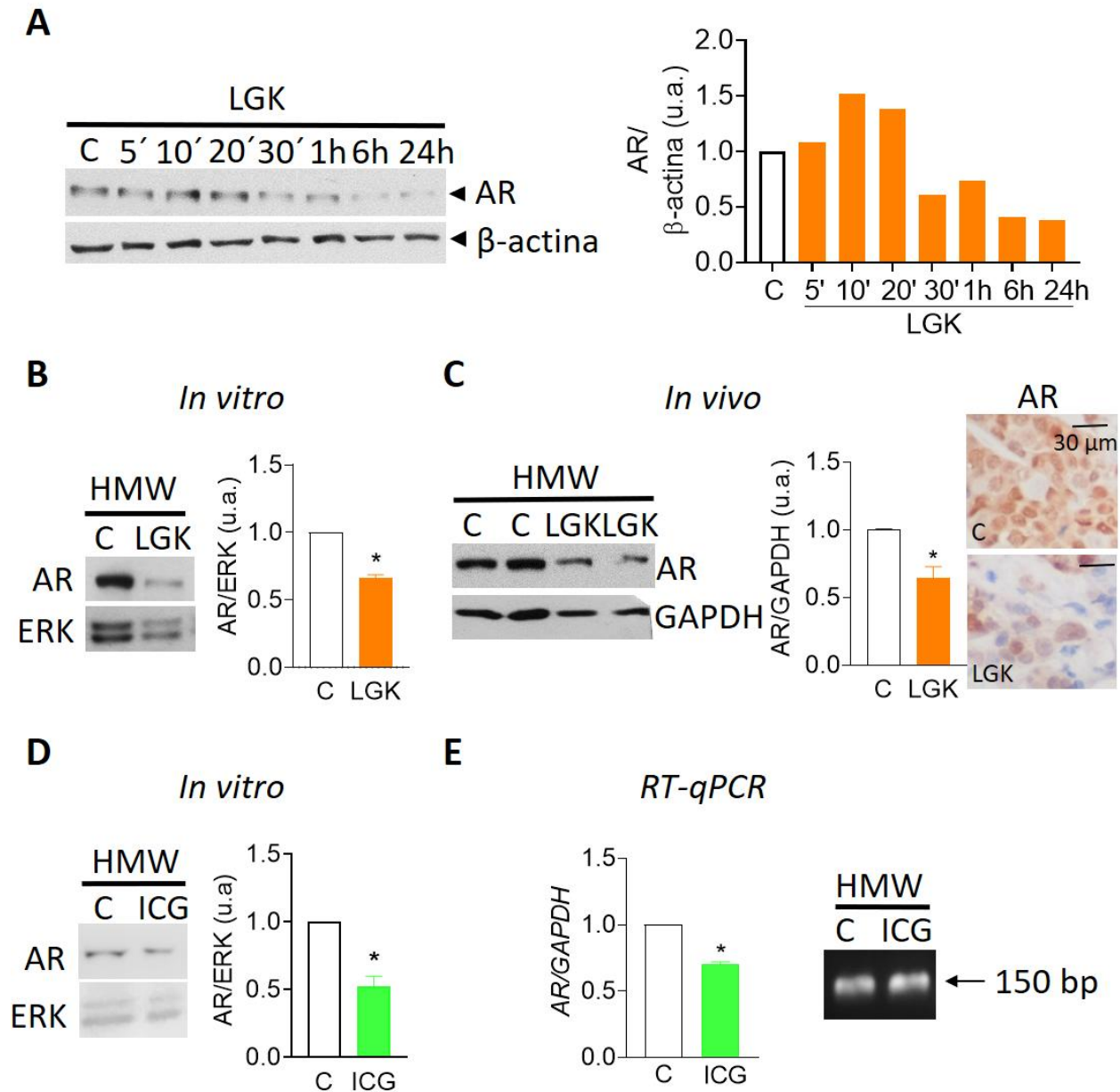


Figura r-20 A-E. Regulación de la expresión de AR por LGK-974 e ICG-001 en la línea T47D-HMW. **(A)** Expresión de AR por Wb y su cuantificación en células T47D-HMW tratadas con LGK-974 1 μ M a distintos tiempos; β -actina se utilizó como control de carga (Ensayo preliminar N=1). **(B-C)** Expresión de AR por Wb y su cuantificación en células T47D-HMW tratadas con LGK-974 1 μ M **(B)** y en tumores T47D-HMW **(C)**; se utilizaron ERK o GAPDH como controles de carga. A la derecha de **(C)** se muestran imágenes representativas por IHQ de AR en tumores T47D-HMW control o tratados con LGK-974 durante 21 días. **(D-E)** Expresión de AR a nivel de proteína por Wb **(D)** y de ARNm por RT-qPCR **(E)** y su cuantificación en células T47D-HMW tratadas con ICG-001 1 μ M; se muestra el producto de PCR de 150 pb a tiempo final,

en un gel de agarosa (E, derecha). Se utilizaron ERK o GAPDH como controles de carga. Los datos se expresan como media $\pm$ SD (A y C) o $\pm$ SE (B, D y E); * $p < 0,05$. Análisis estadístico: t-test. HMW: T47D transfectada con un plásmido que expresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa). Escala: 30 μ m.

Por otro lado, en el modelo T47D-YB, el tratamiento con los dos inhibidores de Wnt no afectó los niveles de AR en las mismas condiciones ensayadas para T47D-HMW (Figura r-21 A-B).

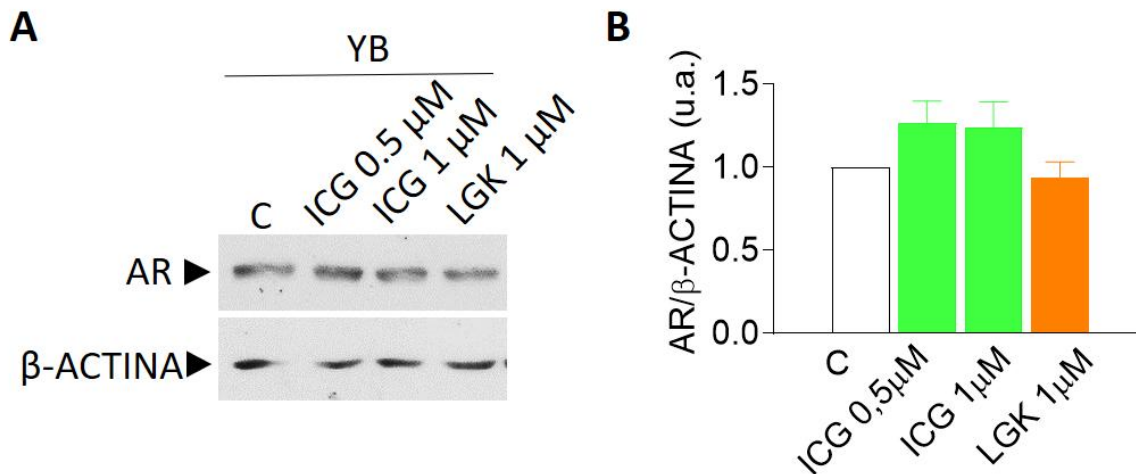


Figura r-21 A-B. Efecto de inhibidores de Wnt sobre la expresión de AR en la línea T47D-YB. (A) Expresión de AR por Wb en células T47D-YB en condiciones control o tratadas con ICG-001 (0,5 y 1 μ M) o LGK-974 (1 μ M). Se utilizó β -actina como control de carga y su correspondiente cuantificación relativizado al control (B). Los datos se expresan como media $\pm$ SE. * $p < 0,05$ T47D-YB: T47D que expresa la isoforma B de PR. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la sobreexpresión de HMW-FGF2 no sólo induce elevados niveles de AR sino también una reducción en los niveles de ER y PR (ver **Antecedentes**), evaluamos el efecto del LGK-974 sobre la expresión de ER y PR en la línea T47D-HMW. En ensayos exploratorios a distintos tiempos observamos que a la hora de tratamiento se induce la expresión de ER, mientras que a las 24 h la inhibición de la vía de Wnt no restauraría los niveles de ER (Figura r-22 A) ni tampoco los de PR (Figura r-22 B). En línea con estos resultados, la evaluación de ER y PR en extractos de tumores tratados con LGK-974 no alteró los niveles de ER (Figura r-22 C) ni PRB y disminuyó los niveles de PRA (Figura r-22 D), sugiriendo que la vía de Wnt no está involucrada en los bajos niveles de estos receptores hormonales, al menos directamente.

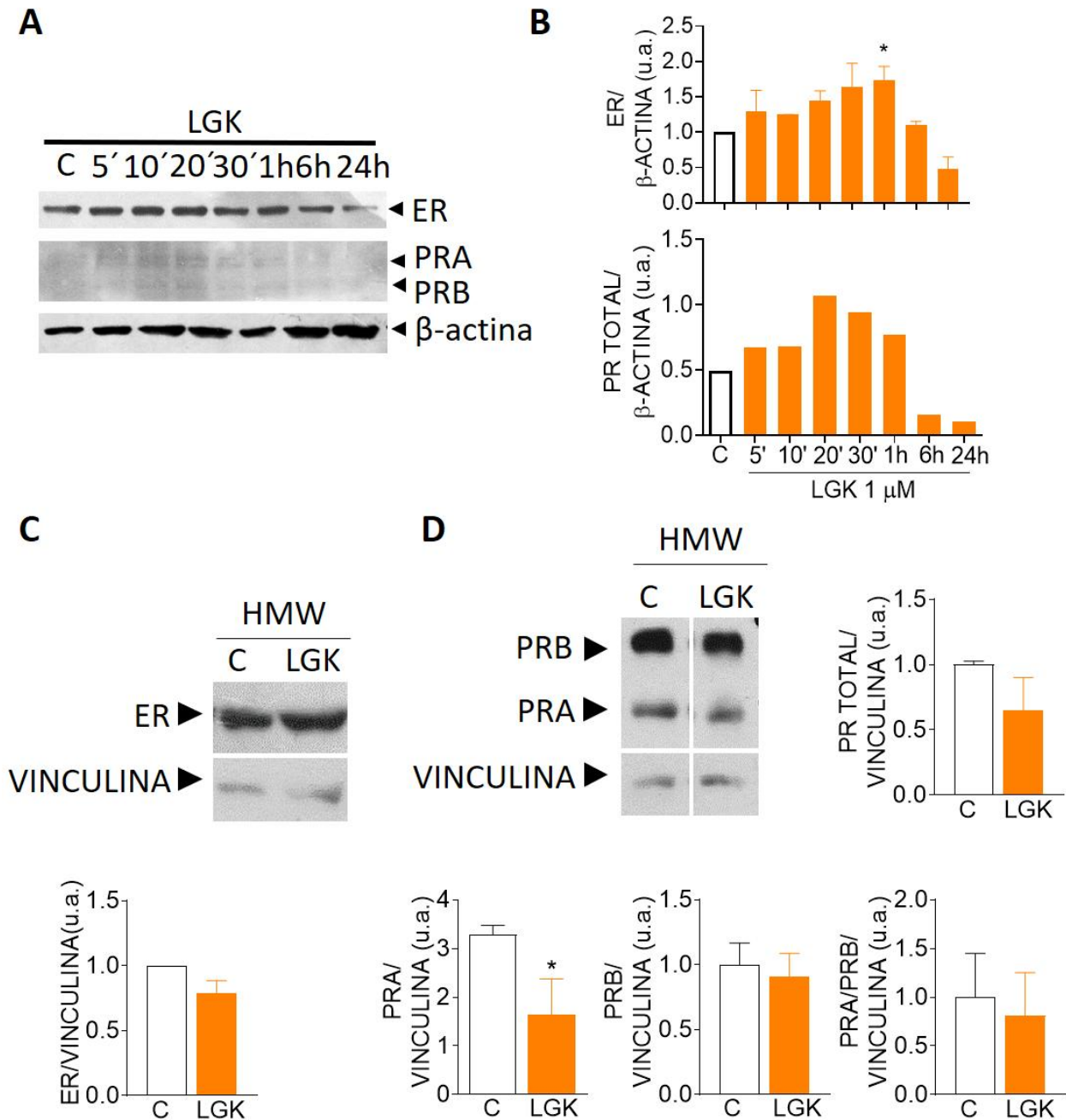


Figura r-22 A-D. Efecto de LGK-974 (1 μ M) sobre la expresión de ER y PR en células y tumores T47D-HMW. Wb (A) y cuantificación (B) para ER (N=2) y PR (N=1) a distintos tiempos de tratamiento de la línea celular T47D-HMW con LGK-974 (1 μ M). Se utilizó β -actina como control de carga. Wb y cuantificación de ER (C), PR total, PRA, PRB, y relación PRA/PRB (D) en tumores T47D-HMW tratados con LGK-974 in vivo. Se utilizó vinculina como control de carga. En cada caso los datos se relativizaron a la condición control.

Los datos se expresan como media $\pm$ SE; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Análisis estadístico: t-test. HMW: T47D transfectada con un plásmido que expresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa).

O.E.2c: En modelos experimentales luminales resistentes a antiprogestágenos (ER⁺PRB-H) que expresan altos niveles de AR y HMW-FGF2, estudiar la unión de β -catenina y TCF4 a sitios TCF/LEF en el promotor de AR.

Crosstalk AR-Wnt: ensayos de ChIP

En cáncer de próstata, el grupo del Dr. Buttyan y col. demostró que el promotor de AR presenta al menos tres sitios funcionales LEF-1/TCF activados por β -catenina (Yang et al, 2006). Por lo tanto, con el objetivo de investigar una posible regulación génica entre ambas vías, realizamos ensayos de ChIP. Las células T47D-HMW se trataron durante 45 minutos con ICG-001 y el ADN sonificado se inmunoprecipitó con anticuerpos para β -catenina o TCF4. Las células se trataron durante 45 minutos con ICG-001. Finalmente, se realizaron ensayos de qPCR utilizando *primers* diseñados para amplificar las secuencias conteniendo los sitios TCF/LEF descritos. Evaluamos varios sitios en el promotor de AR e identificamos dos sitios, el -1257 y el -733 (**Figura r-23 A**), en los cuales estaban interactuando β -catenina y TCF4 (**Figura r-23 B-D**) ya que el tratamiento con ICG-001, que impide el pegado de β -catenina a sus genes blanco, disminuyó el pegado de ambas proteínas en dichos sitios. Se utilizó *GAPDH* como control de la especificidad de la unión en el promotor de AR.

Estos ensayos de ChIP también se realizaron en el modelo T47D-YB, pero los resultados preliminares fueron insuficientes para poder sacar conclusiones.

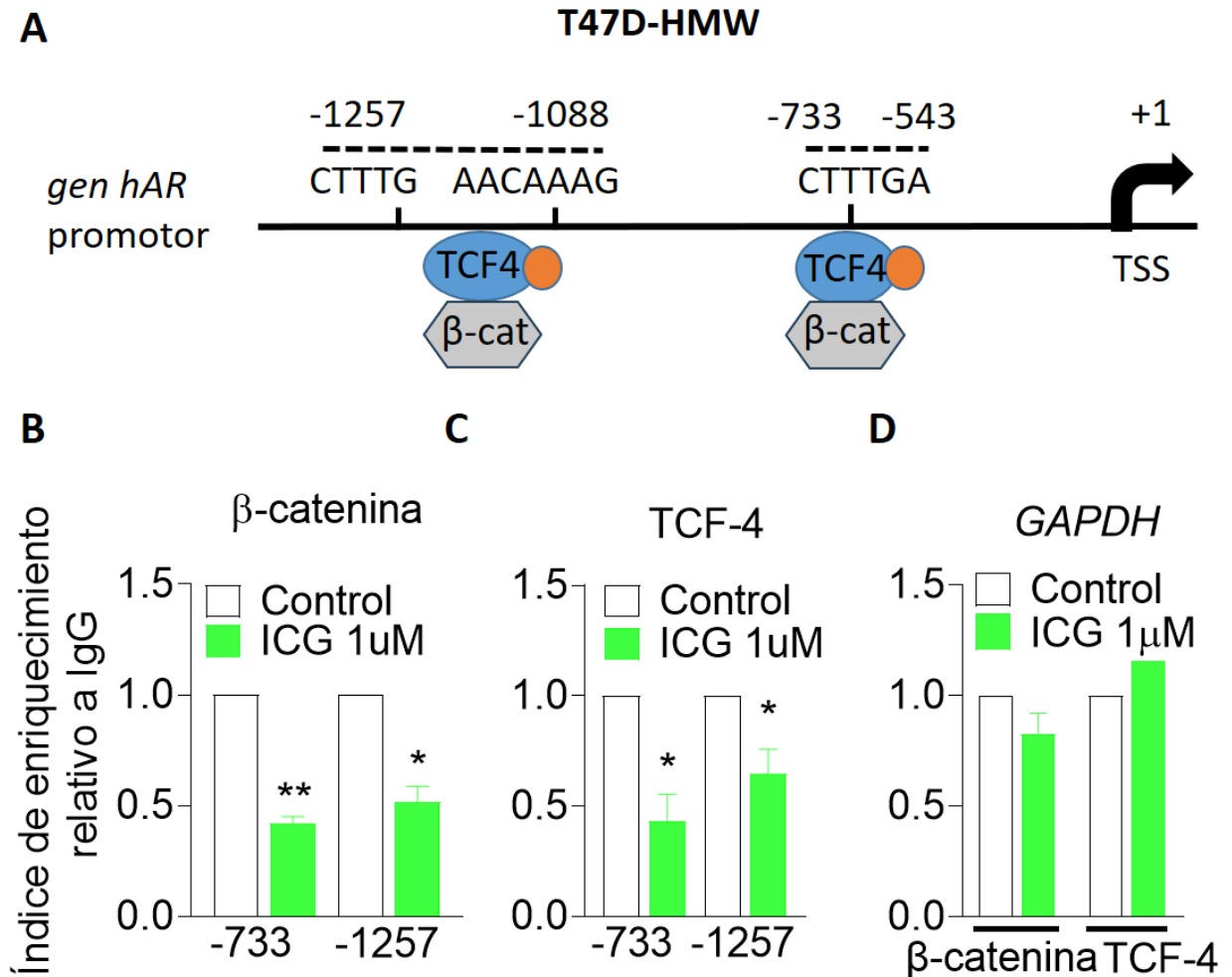


Figura r-23 A-D. Ensayos de ChIP en sitios TCF4/LEF del promotor del gen humano de AR para T47D-HMW. (A) Esquema del promotor del gen AR mostrando los sitios de unión TCF4/LEF (-1257, -733). Análisis por ChIP de la ocupación de β-catenina (B) y TCF-4 (C) en los sitios -733 y -1257 del promotor de AR en células T47D-HMW en condiciones control o tratadas durante 45 min con ICG-001 (1 μM). (D) Análisis por ChIP del gen GAPDH usado como control técnico para la especificidad de la inmunoprecipitación en las mismas condiciones de tratamiento. Los sitios TCF4/LEF fueron definidos según (Yang et al, 2006). En cada caso los datos se relativizaron a la condición control. Los datos se expresan como media ± SE; *p<0,05; **p<0,01. Análisis estadístico: t-test. HMW: T47D transfectada con un plásmido que expresa FGF2 de alto peso molecular (22 kDa).

En el modelo T47D-HMW, los inhibidores de la vía de Wnt inhiben la expresión de AR, in vitro e in vivo, y disminuyen la interacción de β-catenina y TCF-4 en sitios TCF/LEF en el promotor de AR. De esta manera pudimos dar una interpretación mecánica para la interrelación entre las vías de Wnt y de AR.

O.E.3: En PDX luminales ($ER^+PR^{bajo/-}AR^+$), estudiar el efecto de la dihidrotestosterona e inhibidores de la vía de Wnt sobre la proliferación celular.

Crosstalk AR-Wnt: PDX

Como prueba de concepto, se estudió el *crosstalk* entre AR y Wnt en dos modelos PDX (767 y 781) luminales desarrollados previamente en el laboratorio, ambos ER^+PR^- y $HER2^+$.

PDX767 – ensayo *ex vivo*. Se realizó un análisis *ex vivo* en el que se utilizó un vibrátomo para cortar finas lonjas del tumor. Estas lonjas fueron cultivadas sobre esponjas durante 48 h en placas de cultivo y se trataron durante ese tiempo con DHT, ICG-001 o la combinación. Luego, sobre los cortes fijados, se realizaron IHQ para Ki-67, como indicador de proliferación celular (**Figura r-24 B**) y AR (**Figura r-24 C**).

A nivel histológico, el grupo control mostró cúmulos con baja cohesión entre células. Tanto este grupo como el tratado con ICG-001 mostraron esbozos de diferenciación glandular, mientras que tratamiento con DHT favorece la cohesividad celular, sin signos de diferenciación. En el grupo con tratamiento combinado, el efecto sobre la diferenciación glandular fue mayor, observándose estructuras glandulares mejor definidas (**Figura r-24 A**).

En cuanto al recuento de Ki-67 se obtuvo un aumento con el tratamiento con DHT y una tendencia a la disminución para ICG-001. El tratamiento combinado indujo una disminución de la proliferación celular, sugiriendo una interrelación entre ambas vías (**Figura r-24 B**). Por otra parte, el tratamiento con DHT indujo un aumento en la expresión de AR tanto por sí solo como en combinación con ICG-001 (**Figura r-24 C**).

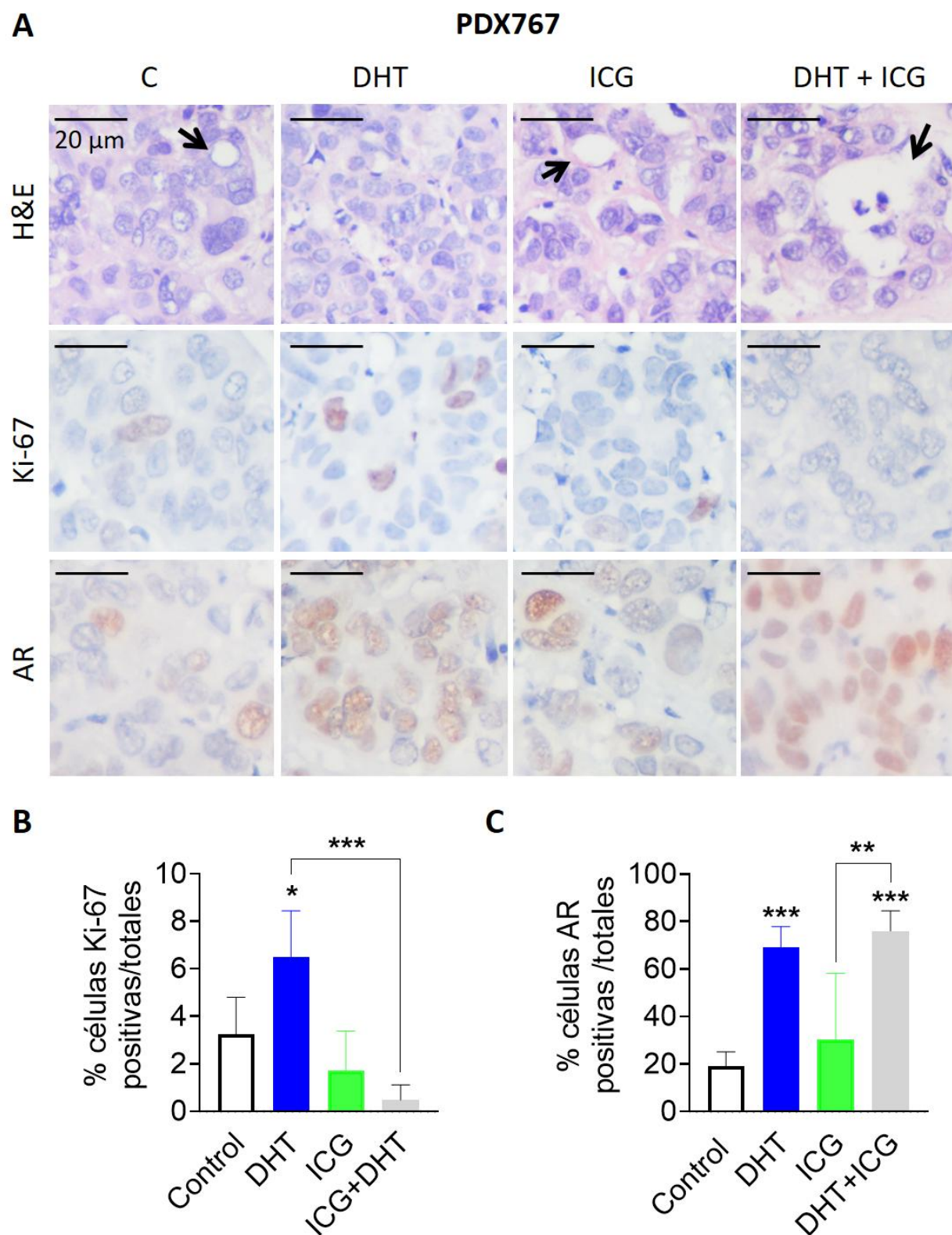


Figura r-24 A-C. Ensayo ex vivo. Análisis inmunohistoquímico de AR y Ki-67 en cortes de vibrátomo del modelo PDX767 (ER⁺PR⁺). (A-B) (A) Imágenes representativas de cortes tumorales teñidos con

hematoxilina y eosina (H&E), e inmunomarcación para Ki-67 y AR de explantos tratados durante 48 h en las siguientes condiciones: control (C), DHT 10 nM (DHT), ICG-001 1 μ M (ICG) y la combinación DHT + ICG-001 (DHT + ICG). **(B-C)** Cuantificación del porcentaje de células positivas para Ki-67 **(B)** o AR **(C)** respecto al total de células tumorales en cada condición experimental. Flechas: C e ICG, esbozo de diferenciación glandular; DHT+ICG, diferenciación glandular. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. Escala: 20 μ m.

PDX781 – ensayo in vivo. En este caso se hizo un ensayo *in vivo* de los tumores tratados durante 5 días con DHT, LGK-974 o el tratamiento combinado, evaluando los mismos marcadores que para el PDX767.

Al sacrificar los animales a los cinco días post-tratamiento observamos una leve tendencia hacia un mayor tamaño tumoral en el grupo tratado sólo con DHT (**Figura r-25 A**). Para corroborar la distribución sistémica de la hormona se evaluó el peso y la histología de las glándulas salivales ya que estas son susceptibles a la acción de los andrógenos (Dart et al, 2013). Observamos que el peso de las glándulas salivales era superior en el grupo que había sido tratado con DHT (**Figura r-25 B**). A nivel histológico, las glándulas salivales presentaron acumulación de microfilamentos y agrandamiento de acinos y conductos (no mostrado en las figuras) lo que causa un aumento generalizado del tamaño glandular, sin evidencia de proliferación celular. Los tumores no presentaron cambios histológicos significativos con los distintos tratamientos, observándose nidos celulares bien estructurados en todos los casos (**Figura r-26 A**). En cuanto a la expresión de Ki-67, tanto la DHT como el LGK-974 disminuyeron su expresión, siendo más evidente en el caso del inhibidor de Wnt. Con el tratamiento combinado prevaleció el efecto inhibitorio del LGK-974 (**Figura r-26 B**). En contraposición al PDX767, cuyos niveles de AR en condiciones control son más bajos que los del PDX781, el tratamiento con DHT no indujo cambios en la expresión de AR. Sin embargo, de manera similar a lo observado en los modelos experimentales, el LGK-974 disminuyó la expresión de AR respecto del control, aunque el efecto se anula en presencia de DHT (**Figura r-26 C**).

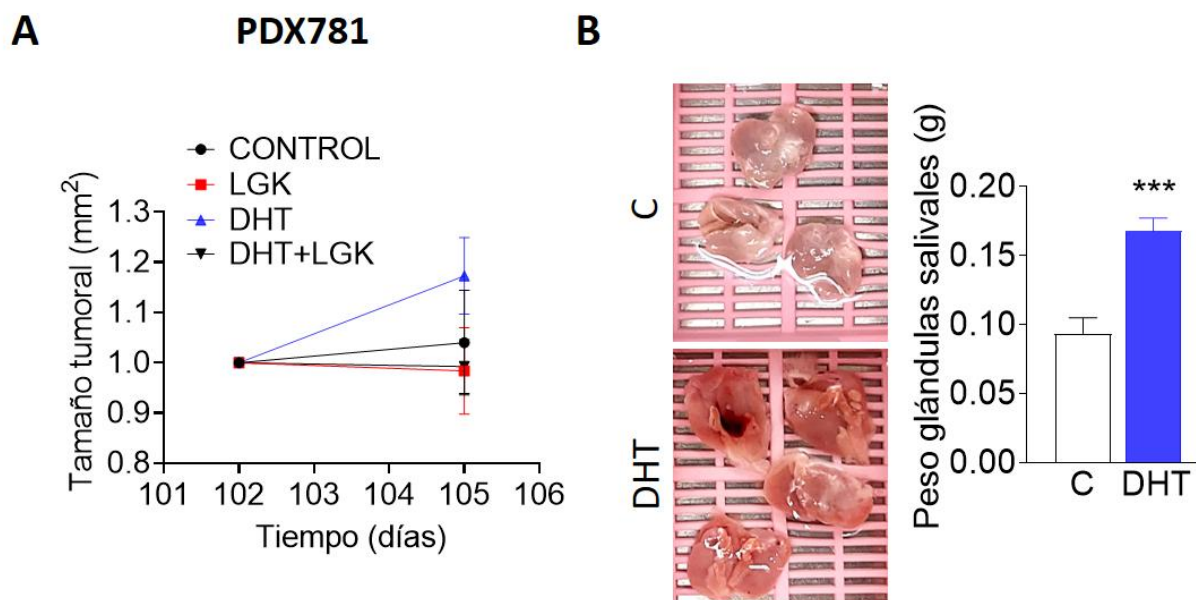


Figura r-25 A-B. Ensayo de crecimiento tumoral y peso de glándulas salivares en el modelo PDX781. **(A)** Curva de crecimiento tumoral representada como tamaño tumoral (mm²) medido desde el inicio de los tratamientos (días 101 a 105) en los grupos control, LGK-974 (5 mg/kg), DHT (20 mg/kg) y combinación DHT + LGK-974. **(B)** Imágenes representativas de glándulas salivares en los grupos control (C) y DHT (izquierda), acompañadas por la cuantificación del peso de las glándulas salivales (g; derecha). Los datos se expresan como media $\pm$ SD; *** $p < 0,001$ Análisis estadístico: t-test Student.

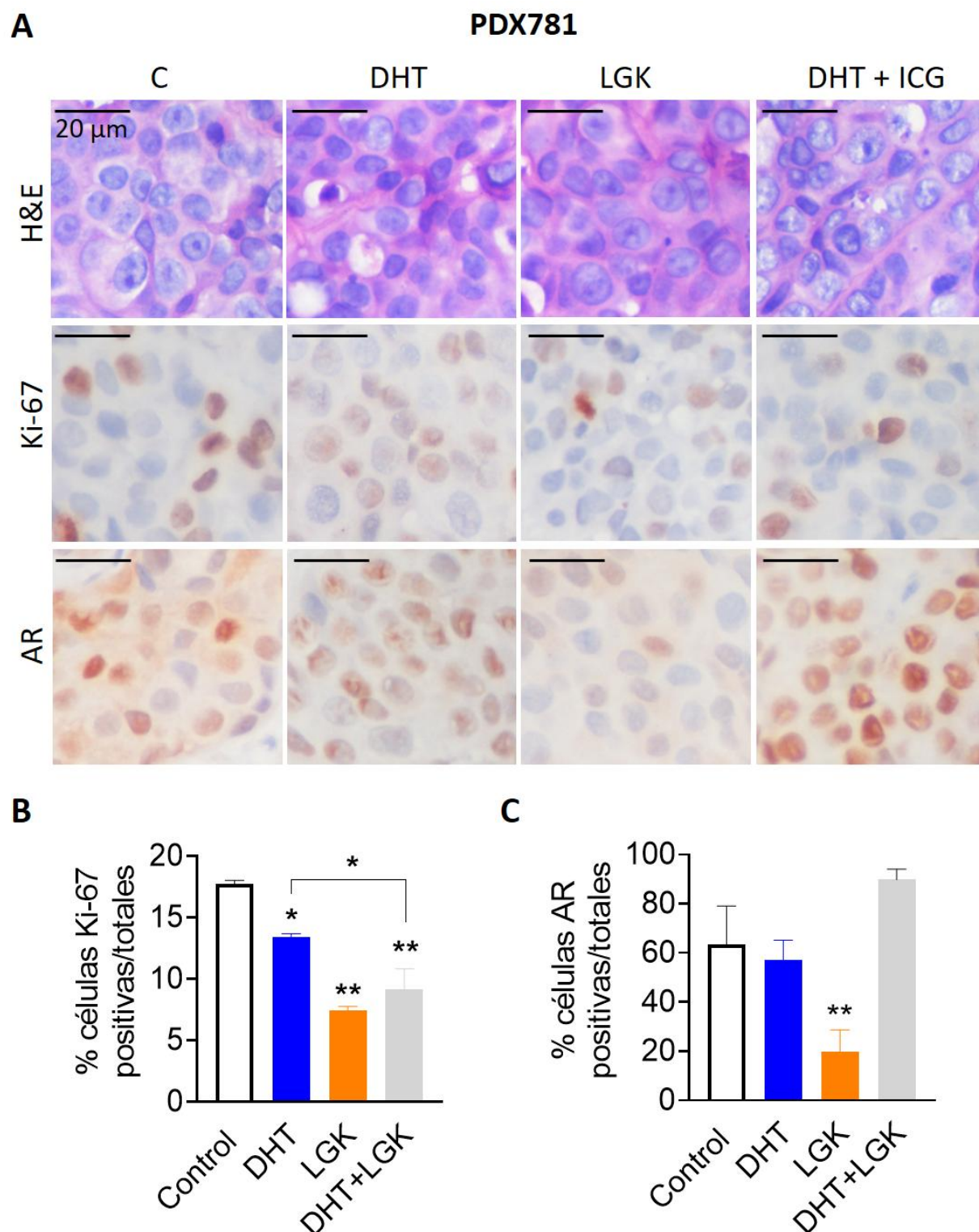


Figura r-26 A-C. Ensayo in vivo. Evaluación histológica y análisis inmunohistoquímico de AR y Ki-67 en el modelo PDX781. (A) Imágenes representativas de cortes tumorales teñidos con hematoxilina y eosina (H&E), e inmunomarcación para Ki-67 y AR en ratones tratados durante cinco días en las siguientes

*condiciones: control (C), DHT (20 mg/kg), LGK-974 (5 mg/kg) y combinación DHT + LGK-974. Cuantificación del porcentaje de células positivas para Ki-67 (B) o AR (C) respecto al total de células tumorales en cada condición experimental. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido de Tukey. Escala: 20 μ m.*

En conjunto, estos ensayos en modelos PDX permitieron complementar los resultados obtenidos previamente en los modelos celulares endócrino-resistentes. Si bien cada PDX posee características propias, pudimos determinar un crosstalk entre las vías de AR y Wnt a nivel de proliferación celular (PDX 767) o de expresión de AR (PDX781), reforzando en xenoinjertos humanos los resultados obtenidos con líneas celulares.

Como cierre de este capítulo podemos decir que el bloqueo de las vías de señalización de AR y/o Wnt redujo la proliferación celular en los modelos de CM resistentes derivados de la línea T47D y en los PDX evaluados. En particular, nos enfocamos en las líneas T47D-HMW y T47D-YB, siendo el efecto más marcado en el modelo que sobreexpresa FGF2, es decir el HMW. En este último modelo, se comprobó una interacción funcional directa entre las vías de AR y Wnt: la inhibición de la vía Wnt no solo suprimió el efecto proliferativo inducido por el andrógeno, sino que también disminuyó los niveles de AR. Uno de los mecanismos propuestos para la disminución de AR es la interacción de proteínas como β -catenina y TCF4 en el promotor del gen de AR.

Parte III: Modelos *in vivo*: vía de AR

O.E.4: En modelos PR⁻ o PRB-H creciendo en presencia o ausencia de estradiol (E2) exógeno, estudiar el efecto de agonistas androgénicos sobre el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica.

Efecto de testosterona sobre el crecimiento tumoral de modelos luminales PRB-H y PR⁻ con E2

Antes del desarrollo del tamoxifeno, se utilizaban altas dosis de andrógenos para el tratamiento de pacientes con enfermedad avanzada y los resultados eran prometedores (Galton, 1950). Actualmente, la controversia respecto del rol de AR continúa y algunos estudios proponen el uso de agonistas androgénicos en tumores ER⁺ (Hickey et al, 2021; Palmieri et al, 2024), mientras que otros respaldan la inhibición de AR (D'Amato et al, 2016; De Amicis et al, 2010; Kono et al, 2017).

In vitro, nuestros resultados muestran que tanto T47D-HMW como T47D-YB se estimulan con DHT. Por lo tanto, en primer lugar, investigamos el efecto *in vivo* de la testosterona en los modelos T47D-HMW, T47D-YB y PDX707. Estos modelos son AR⁺, PRB-H (T47D-HMW e -YB) o PR⁻ (PDX707, xenoinjerto proveniente de paciente) y requieren de la administración exógena de E2 para crecer.

En contraposición con lo observado *in vitro*, la administración de testosterona, en presencia de E2, inhibió levemente el crecimiento de T47D-HMW (**Figura r-27 A**) y marcadamente el del PDX707 (**Figura r-27 C**) con una tendencia en el mismo sentido para el tumor T47D-YB (**Figura r-27 B**). Estos resultados se vieron reflejados también en el peso tumoral al final del experimento (**Figura r-27 A-C**). Además, observamos un mayor número de ratones con metástasis pulmonares en el grupo portador de tumores T47D-HMW tratado con E2 (100%, 5/5) respecto del grupo tratado con la terapia combinada (20%, 1/5; $p < 0.05$). Estos resultados estuvieron acompañados de una tendencia al desarrollo de un menor número de focos metastásicos en el grupo tratado con testosterona (**Figura r-27 A-B**). Ensayos de IHQ en el tumor PDX707, muestran una marcación nuclear intensa del AR luego del tratamiento con testosterona (**Figura r-27 C**, derecha).

El efecto inhibitorio del tratamiento combinado con testosterona en T47D-HMW y PDX707 se observó claramente a nivel histológico donde se observaron pocos nidos tumorales rodeados de abundante estroma (**Figura r-28**) en comparación con los tumores no tratados.

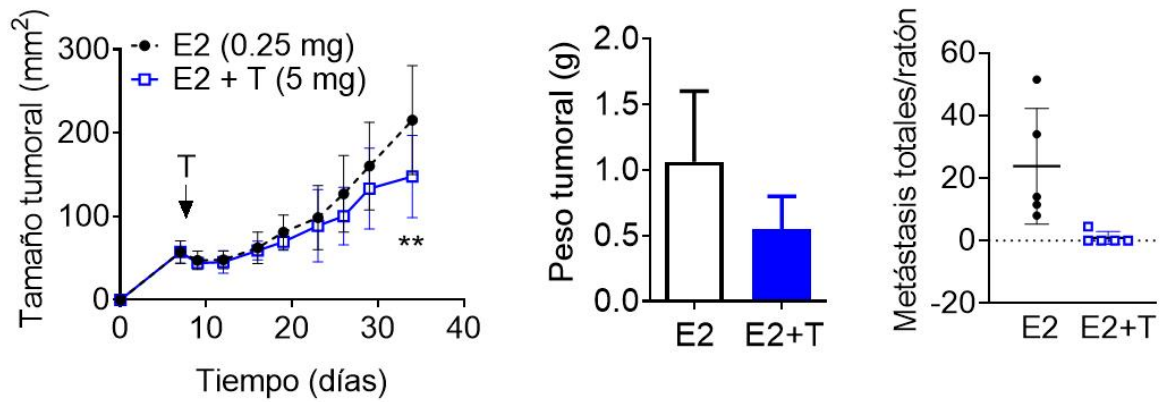
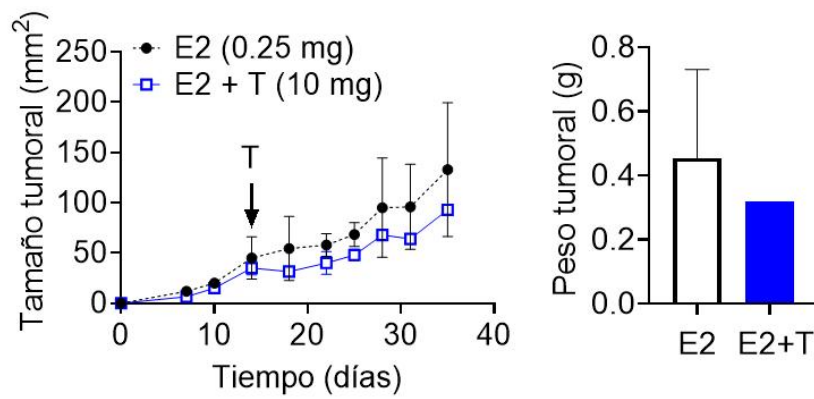
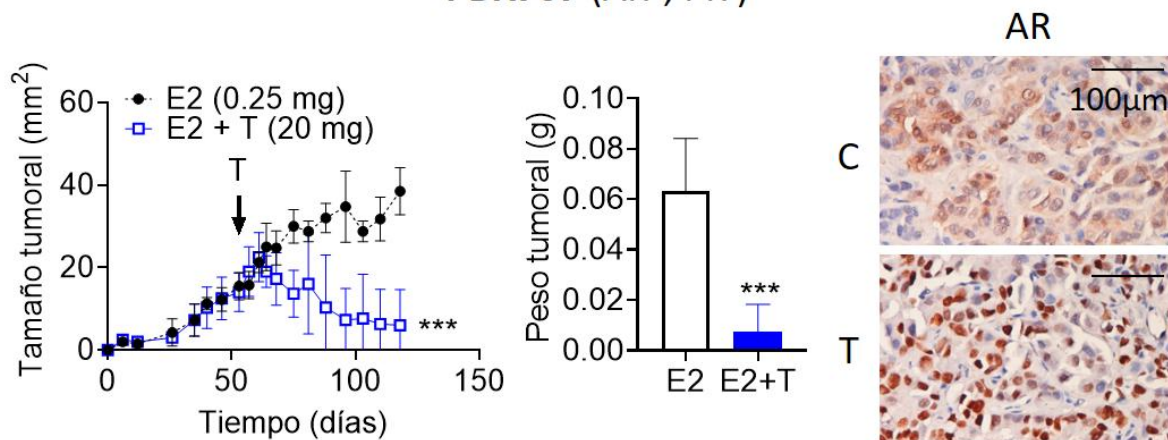
A T47D-HMW (AR⁺, PRB, HMW-FGF2^{alto})**B T47D-YB (AR⁺, PRB, HMW-FGF2^{alto})****C PDX707 (AR⁺, PR⁻)**

Figura r-27 A-C. Efecto de la testosterona sobre el crecimiento tumoral *in vivo* en modelos T47D-HMW, T47D-YB y PDX707. Curvas de crecimiento tumoral, peso tumoral final y número total de metástasis por ratón en T47D-HMW (AR⁺, PRB, HMW-FGF2^{alto}) tratados con estradiol (E2; 0.25 mg) o con estradiol y testosterona pellet 5 mg (E2+T) (A), y en T47D-YB (AR⁺, PRB, HMW-FGF2^{alto}) tratados con estradiol (E2) o estradiol y testosterona pellet 10 mg (E2+T) (B). (C) Curvas de crecimiento y peso tumoral final en el PDX707 (AR⁺, PR⁻) tratado con estradiol (E2) o estradiol y testosterona pellet 20 mg (E2+T), junto con imágenes representativas de la expresión de AR por IHQ en tumores control (C) y tratados con testosterona pellet 20 mg (T). Los datos se expresan como media $\pm$ SD; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: ANOVA para las curvas de crecimiento y *t* de Student para el peso tumoral y las metástasis. Escala: 100 μ m.

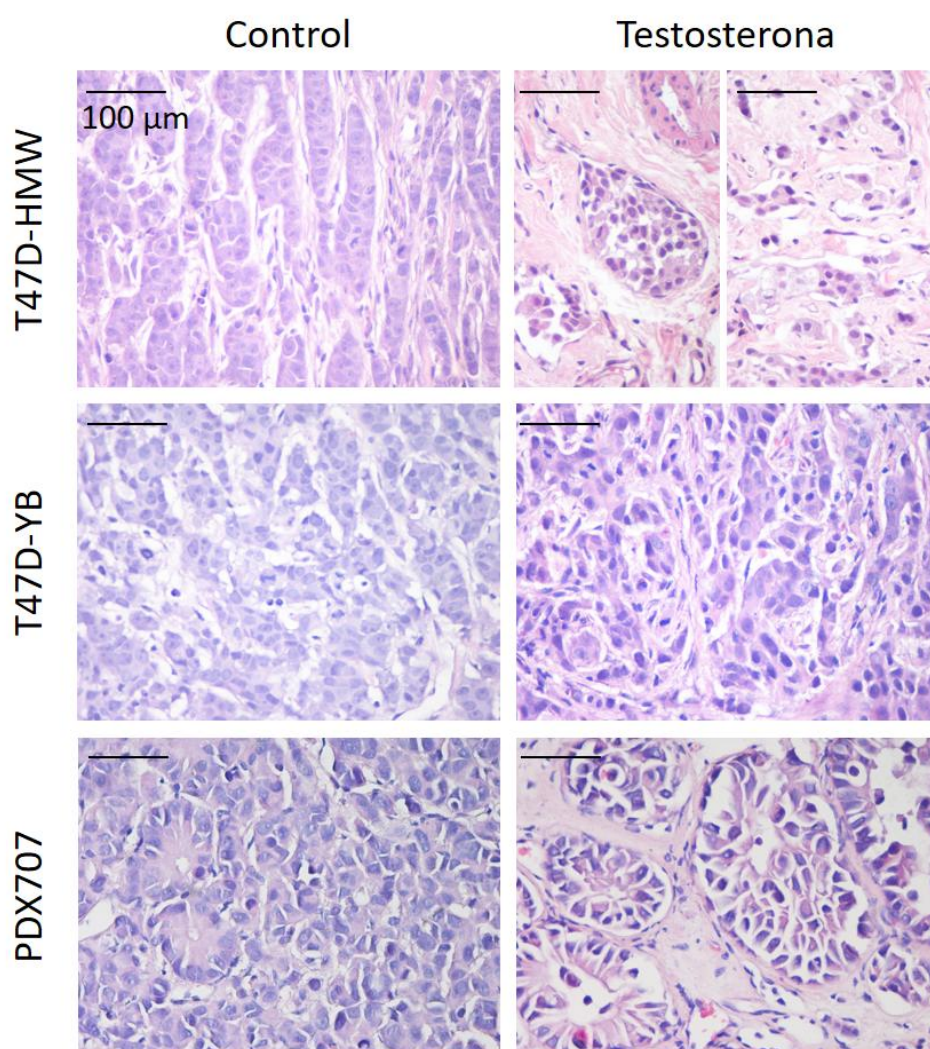


Figura r-28. Histología de tumores derivados de T47D-HMW, T47D-YB y PDX707 en condiciones control y tratadas con testosterona. Cortes tumorales teñidos con hematoxilina y eosina tratados con estradiol (control) o con estradiol y testosterona (T; pellets de 5 mg en T47D-HMW, 10 mg en T47D-YB y 20 mg en PDX707), que ilustran la histología general de los tumores en cada condición. Escala: 100 μ m.

En presencia de E2, la testosterona ejercería un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral de tumores luminales AR⁺PRB-H o AR⁺PR⁻.

Efecto de testosterona sobre el crecimiento tumoral de modelos luminales PRB-H en ausencia de E2

Como estos tumores crecieron en presencia de E2, y los ensayos *in vitro* habían sido realizados con suero depletado de hormonas, a continuación, evaluamos si el efecto de la testosterona cambiaba según si hubiera, o no, E2 sistémico.

Ya sabíamos que los tumores T47D-HMW y PDX707 no crecían en ausencia de E2, por lo tanto, hicimos un ensayo exploratorio con el tumor T47D-YB del cual desconocíamos si era capaz de crecer en ausencia de E2. Transplantamos los tumores y comenzamos los tratamientos desde el inicio según el siguiente esquema: Grupo 1 (sin E2), Grupo 2 (*pellet* E2), Grupo 3 (*pellet* testosterona), Grupo 4 (E2 en agua de bebida y *pellet* testosterona). Este último grupo se agregó para poder retirar el E2 una vez que los tumores hubieran crecido.

Curiosamente, este ensayo preliminar nos indicó que la testosterona induce el crecimiento del tumor T47D-YB en ausencia de la administración exógena de E2 (**Figura r-29**).

T47D-YB (AR⁺, PRB, HMW-FGF2^{alto})

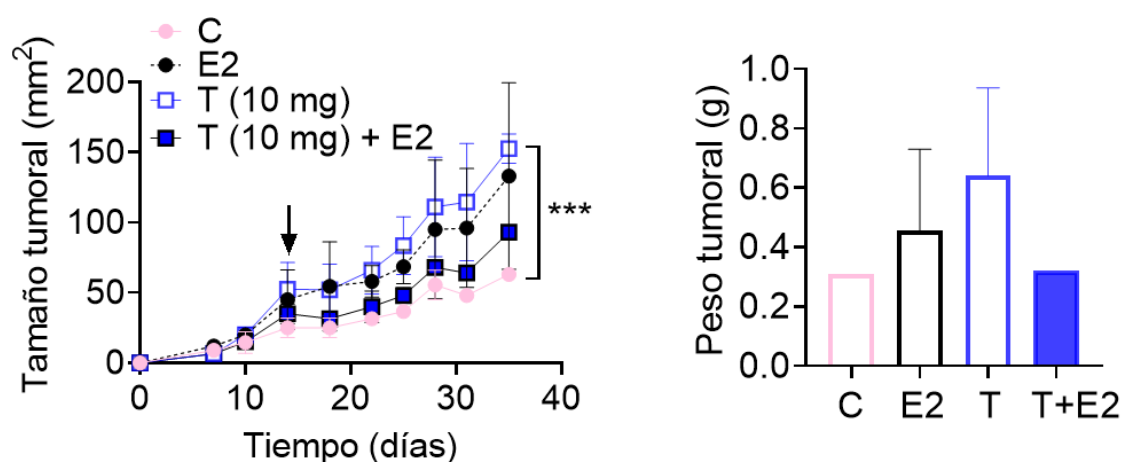


Figura r-29. Efecto de la testosterona sobre el crecimiento tumoral en T47D-YB. Curvas de crecimiento y peso tumoral final en tumores T47D-YB (AR⁺, PRB, HMW-FGF2^{alto}) implantados en ratones sin o con estradiol (E2; pellet 0.25 mg), con testosterona 10 mg (T) o con estradiol (2µg/ml) y testosterona (10 mg) (E2+T). Los datos se expresan como media $\pm$ SD; * $p < 0,05$. Análisis estadístico: ANOVA para las curvas de crecimiento y ANOVA de una vía seguido de test de comparaciones múltiples para el peso tumoral final.

En base a estos ensayos, profundizamos en el efecto del andrógeno sobre el crecimiento tumoral de T47D-YB en ausencia de E2. Tal cual lo observado en el ensayo exploratorio, corroboramos que la testosterona indujo el crecimiento tumoral, reflejado tanto en el tamaño tumoral a lo largo del tiempo como en el peso de los tumores al finalizar el experimento (**Figura r-30 A**). Está reportado que la testosterona puede aromatizarse a E2 por acción de la enzima aromatasa (Roncati et al, 2016). Por lo tanto, para asegurarnos que el efecto observado era a través de la vía de AR, evaluamos también la acción de la DHT y del tratamiento combinado con enzalutamida. Si bien las diferencias no fueron significativas, la DHT mostró tendencias similares a lo observado con testosterona. Más aún, la enzalutamida inhibió el efecto producido por la testosterona, indicando que el efecto observado era a través de la activación del AR. En relación con las metástasis, no se registraron diferencias significativas en el número de focos pulmonares (**Figura r-30 B**). En las imágenes histológicas se resaltan la gran cantidad de mitosis observadas con los tratamientos androgénicos (**Figura r-30 C**).

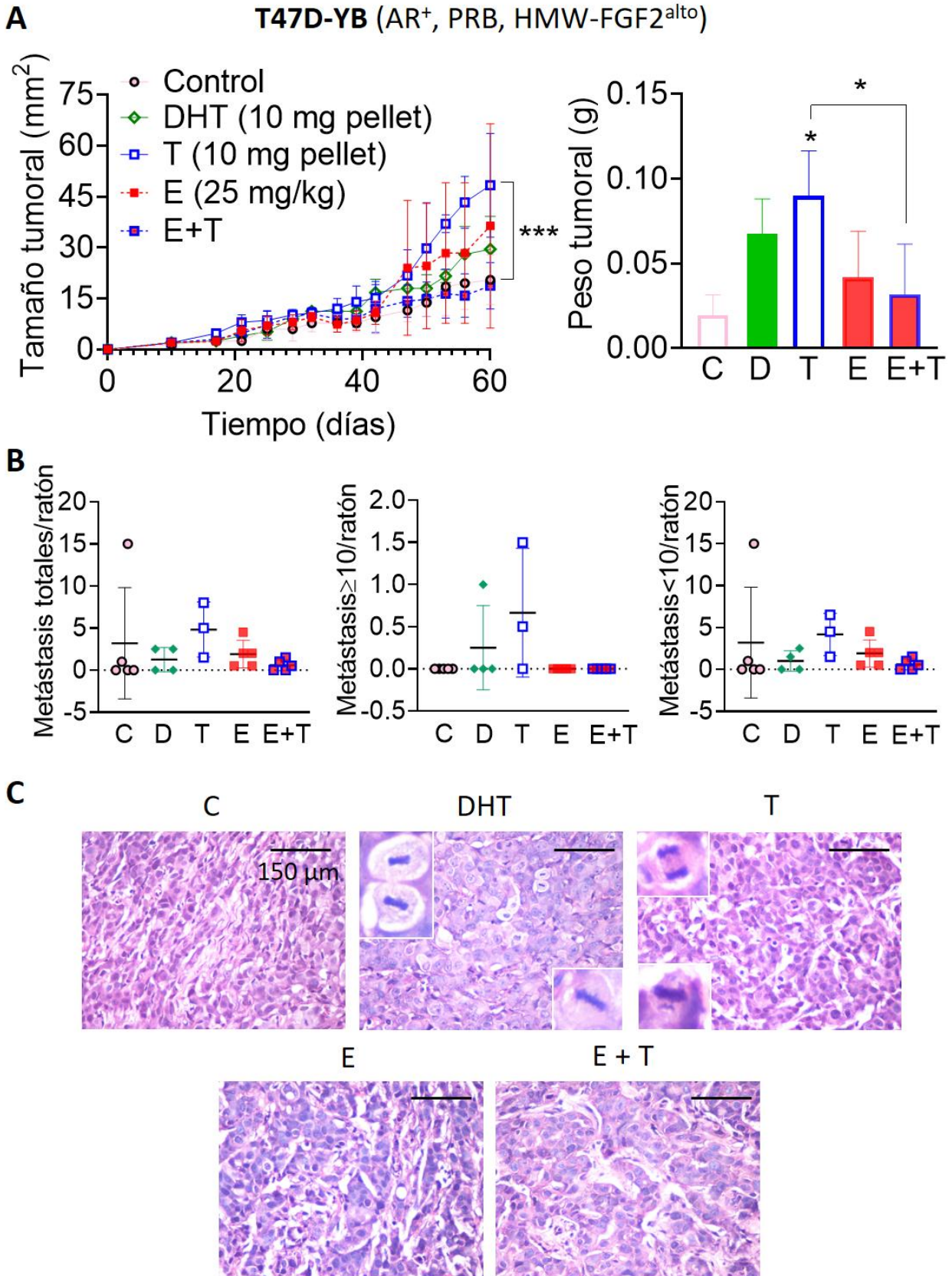


Figura r-30 A-C. Efecto de testosterona, dihidrotestosterona y enzalutamida solas o combinadas, sobre el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica en T47D-YB. (A) Curvas de crecimiento y peso tumoral final en T47D-YB (AR⁺, PRB, HMW-FGF2^{alto}) tratados con vehículo (C), testosterona (T, pellet 10 mg), dihidrotestosterona (DHT, pellet 10 mg), enzalutamida (E, 25 mg/kg) o enzalutamida y testosterona (E+T). (B) Número total de metástasis por ratón y focos metastásicos ≥ 10 o < 10 células por ratón en los distintos grupos de tratamiento. (C) Cortes tumorales teñidos con hematoxilina y eosina representativos de cada grupo (C, DHT, T, E+T y E). Los recuadros (insets) muestran aumentos donde se señalan figuras mitóticas. Los datos se expresan como media $\pm$ SD; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: Regresión lineal para las curvas de crecimiento y ANOVA de una vía seguido de test de comparaciones múltiples para el peso tumoral y las metástasis. Escala: 150 μ m.

De esta sección podemos concluir que la testosterona actúa como un inhibidor del crecimiento tumoral en modelos luminales de CM AR⁺PRB-H o AR⁺PR⁻, pero sólo en presencia de E2. En ausencia de E2, la testosterona indujo proliferación tumoral, comportamiento que pudo ser revertido mediante el antagonista enzalutamida. Estos resultados sugieren que el contexto hormonal determina el impacto de la testosterona y plantean la posibilidad de utilizar al AR como blanco terapéutico en determinados subgrupos de tumores luminales que presentan resistencia endocrina.

Parte IV: Muestras humanas

Los resultados presentados en los capítulos anteriores indican que las variantes resistentes, T47D-YB y T47D-HMW presentan desregulados varios componentes de la vía de Wnt al mismo tiempo que expresan altos niveles de AR y de FGF2. Asimismo, estas líneas celulares expresan bajos niveles de PR total y una mayor proporción de PRB sobre PRA. A su vez demostramos que existe una interacción entre las vías de AR y Wnt y que esta interacción se manifiesta mediante la unión de β -catenina en sitios TCF/LEF presentes en el promotor de AR.

Por lo tanto, en esta sección, evaluamos la expresión a nivel de proteína de AR, FGF2, WNT4 y WNT6 en muestras provenientes de pacientes con CM con el fin de establecer si existe alguna asociación entre las variables estudiadas y la expresión de PR e isoformas de PR o con parámetros clínico-patológicos.

En nuestro laboratorio colaboramos con el Hospital de Pacheco *Magdalena V. de Martínez*, del cual recibimos periódicamente muestras de tumores de pacientes con CM. Estas muestras fueron clasificadas previamente de acuerdo con el perfil de expresión de isoformas de PR y contamos con el seguimiento y los datos clínico-patológicos de las pacientes.

A partir de los datos de expresión de ER, PR y HER2 por IHQ, obtenidos de la historia clínica de las pacientes y del perfil de expresión de isoformas de PR, se tomaron los tumores ER⁺ HER2⁻ para establecer cuatro subgrupos principales: (i) tumores con expresión positiva de PR sin considerar las isoformas (ER⁺PR⁺); (ii) tumores PR negativos (ER⁺PR⁻); (iii) tumores PR⁺ con mayor expresión de PRA que PRB (PRA-H) y (iv) tumores PR⁺ con mayor expresión de PRB que PRA (PRB-H).

Caracterización clínica y molecular de la cohorte

En la **Tabla r-1** se presentan las características clínico-patológicas de la cohorte utilizada, compuesta exclusivamente por pacientes con CM ER⁺ y HER2⁻ (100%). El grupo mayoritario corresponde a mujeres mayores de 60 años, seguido por los rangos de 51-60 años, 40-50 años y menos del 5% menores de 40 años, lo que refleja la prevalencia típica de la enfermedad en edades avanzadas y postmenopáusicas.

En cuanto al subtipo histológico, predomina el CI-NST, seguido por el lobulillar invasivo, con baja frecuencia de otros subtipos. La mayoría de los tumores se encuentra en estadios I-IIA y IIB-III, mientras que el estadio IV representa menos del 10%. El grado histológico está representado mayoritariamente por tumores de grado moderado y alto, 2 y 3, respectivamente.

Como era de esperar, la mayoría de los tumores ER⁺ expresaron también PR (76.9%). En cuanto a la expresión de isoformas de PR, entre los tumores PR⁺, prevalecieron los tumores PRA-H, seguidos de los PRB-H y equimolares.

	Frecuencia	%
Edad		
≤40	7/219	3.2
41-50	30/219	13.7
51-60	55/219	25.1
>60	127/219	58.0
Subtipo histológico		
CI-NST	164/221	74.2
CLI	34/221	15.4
CDLI	12/221	5.4
SE	11/221	5.0
Estadio tumoral		
I-IIA	62/133	46.6
IIB-III	59/133	44.4
IV	12/133	9.0
Grado histológico		
1	9/171	5.3
2	74/171	43.3
3	88/171	51.4
PR⁺	173/225	76.9
PRA-H	89/225	39.6
PRB-H	52/225	23.1
EQUI	14/225	6.2
ND	18/225	8.0
ER⁺	225/225	100
ER⁺PR⁺	173/225	76.9
ER⁺PR⁻	52/225	23.1

Tabla r-1. Características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes con cáncer de mama. CI-NST: carcinoma invasivo de ningún tipo especial (*No Special Type*); CLI: carcinoma lobulillar invasivo; CDLI: carcinoma ductolobulillar invasivo; SE: subtipo especial. PRA-H: tumores con alta relación PRA/PRB ($\geq 1,2$); PRB-H: tumores con baja relación PRA/PRB ($\leq 0,83$); EQUI: tumores con niveles equivalentes de las isoformas A y B del PR (ratio entre 0,83 y 1,2); ER: receptor de estrógeno alfa. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

O.E.5: En una cohorte de pacientes ER⁺ clasificados según la expresión de PR (PR⁺, PR⁻, PRA-H o PRB-H),

- a) Evaluar los niveles de expresión de FGF2, AR, WNT4 y WNT6 por subgrupo.
- b) Correlacionar la expresión de AR y FGF2 con parámetros clínico-patológicos
- c) Evaluar la expresión conjunta de AR y FGF2 por subgrupo.

Expresión de AR en relación con parámetros clínico-patológicos

En ensayos previos del laboratorio demostramos mediante IHQ que el subtipo ER⁺PR⁻ expresa AR con mayor frecuencia y en mayores niveles que los tumores ER⁺PR⁺ (ver **Antecedentes**) (Garcia et al, 2020). En este trabajo, ampliamos la cohorte utilizada previamente en la Tesis doctoral de *Figueroa* y la tesis de maestría de *García*, para continuar estudiando las variaciones en la expresión del marcador AR incorporando también muestras con distintas proporciones de isoformas de PR (Garcia et al, 2020).

En primer lugar, evaluamos la distribución de las muestras categorizadas según la expresión de AR respecto de distintos parámetros clínico-patológicos. En la **Figura r-31 A** se muestran imágenes representativas de una marcación baja (<10%) y alta ($\geq 10\%$) de AR nuclear en el parénquima tumoral. El punto de corte se estableció en base a la bibliografía (Bronte et al, 2018). Observamos que la mayoría de las muestras expresaron AR $\geq 10\%$ y que no hubo diferencias significativas en la distribución de las muestras según edad, subtipo histológico, estadio tumoral, grado histológico y presencia de ganglios axilares respecto de la expresión alta o baja de AR (**Tabla r-2**). Sin embargo, podemos destacar que todas las muestras de pacientes menores de 40 años expresaron altos niveles de AR y que entre las pacientes mayores de 60 años, el 79% (93/118) expresaron AR $\geq 10\%$ comparado con un 21% (25/118) que expresaron AR<10%. En relación con los subtipos histológicos, en los tumores con AR $\geq 10\%$ observamos tendencias hacia una mayor proporción de las muestras correspondientes al carcinoma invasivo de ningún tipo especial (CI-NST) y una menor proporción al carcinoma lobulillar invasivo (CLI) con respecto a las muestras que expresan AR<10%. Las variables estadio tumoral, grado histológico y ganglios axilares positivos no varía entre ambos subgrupos.

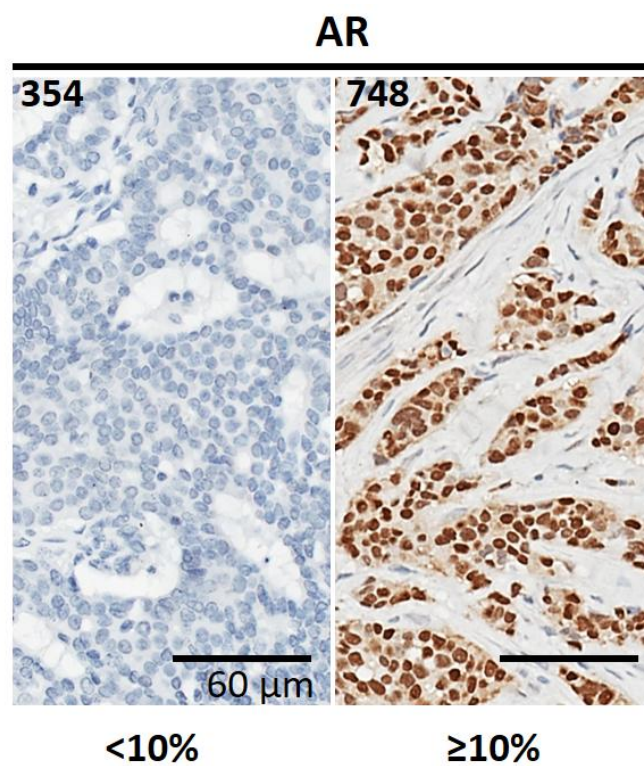


Figura r-31: Imágenes representativas de baja (<10%, muestra 354, AR 0%) y alta ($\geq 10\%$, muestra 748, AR 100%) expresión nuclear de AR por IHQ en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama. Escala: 60 μm .

		AR $\geq$ 10% (%)	AR < 10% (%)	χ^2 (p valor)
Edad	≤ 40	7/7 (100)	0/7 (0.0)	0.17
	41-50	19/29 (65.5)	10/29 (34.5)	
	51-60	37/52 (71.2)	15/52 (28.8)	
	>60	93/118 (78.8)	25/118 (21.2)	
Subtipo histológico	CI-NST	124/155 (80.0)	31/155 (20.0)	0.17
	CLI	20/32 (62.5)	12/32 (37.5)	
	CDLI	9/12 (75.0)	3/12 (25.0)	
	SE	6/9 (66.7)	3/9 (33.3)	
Estadio tumoral	I-IIA	43/56 (76.8)	13/56 (23.2)	0.99
	IIB-III	44/57 (77.2)	13/57 (22.8)	
	IV	9/12 (75.0)	3/12 (25.0)	
Grado histológico	1	8/9 (88.9)	1/9 (11.1)	0.68
	2	57/68 (83.8)	11/68 (16.2)	
	3	66/83 (79.5)	17/83 (20.5)	
Ganglios axilares	Positivo	67/89 (75.3)	22/89 (24.7)	0.89
	Negativo	52/70 (74.3)	18/70 (25.7)	

Tabla r-2: Frecuencia de expresión nuclear de AR ($\geq 10\%$ vs. $< 10\%$, evaluado por IHQ) según parámetros clínico-patológicos en muestras tumorales humanas. Las frecuencias se presentan como casos/total para edad, subtipo histológico, estadio tumoral, grado histológico, y estado de ganglios axilares. Análisis estadístico: Chi-cuadrado (χ^2).

Expresión de Ki-67 y AR nuclear

En base a la expresión del marcador de proliferación celular Ki-67 proveniente de las historias clínicas, estratificamos las muestras según la expresión nuclear de AR. En la **Figura r-32** se observa que los tumores con expresión elevada de AR ($AR \geq 10\%$) presentan una mayor expresión de Ki-67 en comparación con aquellos con baja expresión de AR ($AR < 10\%$), tanto en el análisis global como en el subgrupo de pacientes con ganglios negativos donde esta diferencia se acentúa (**Figura r-32 A**). Además, si utilizamos un punto de corte de 20% para Ki-67 que corresponde al utilizado en las guías para

diferenciar bajo y alto índice proliferativo, se observa una tendencia similar a la observada con la variable continua tanto en el análisis global como en el subgrupo ganglios negativos (**Figura r-32 B**). Estos resultados indican que una elevada expresión de AR está asociada a una mayor tasa proliferativa.

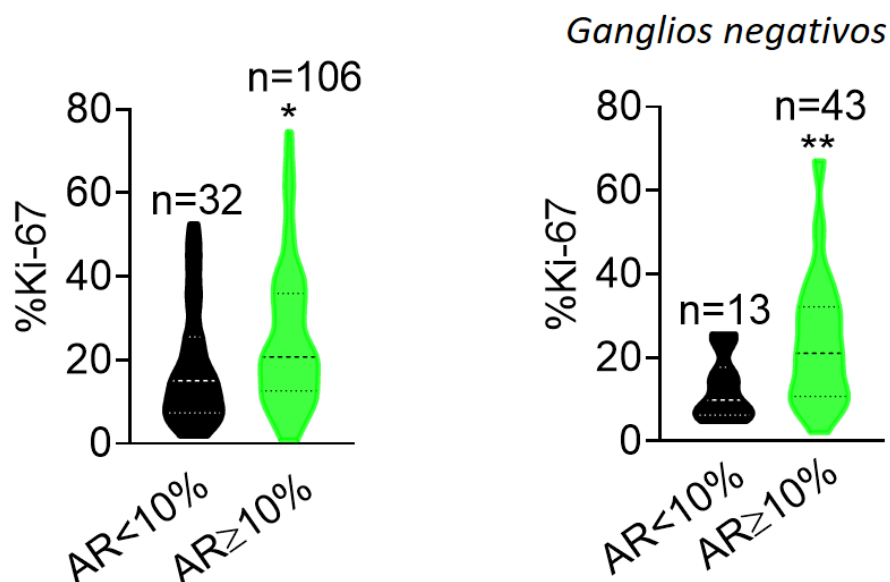
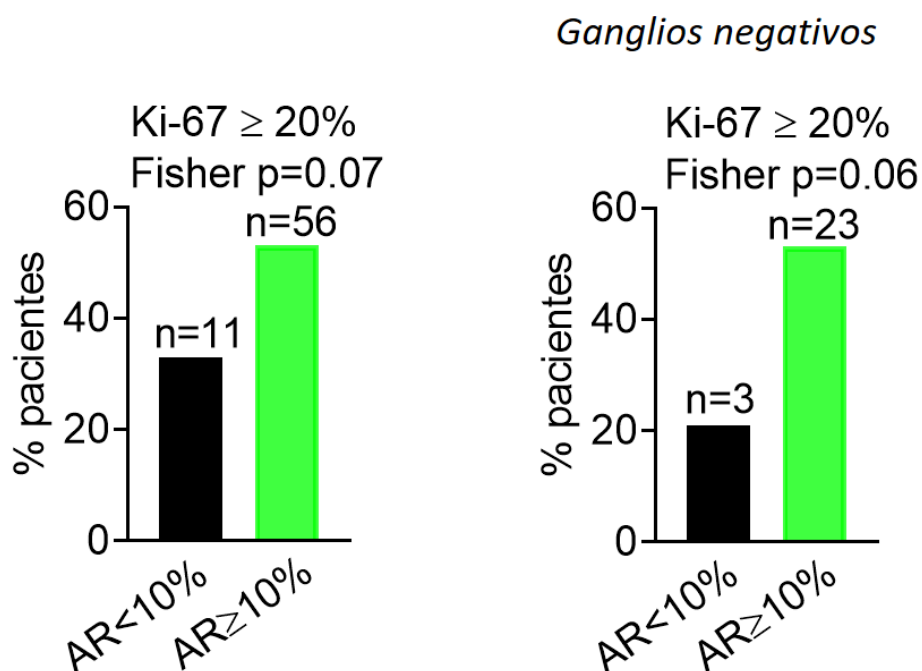
A**B**

Figura r-32 A-B. Relación entre la expresión de AR y la proliferación tumoral (Ki-67) en muestras de pacientes con cáncer de mama. (A) Porcentaje de expresión de Ki-67 en muestras con baja (AR<10%) y alta (AR≥10%) expresión de AR, considerando toda la cohorte (izquierda) o los casos con ganglios axilares

negativos (derecha). **(B)** Porcentaje de pacientes con proliferación elevada ($Ki-67 \geq 20\%$) según la expresión de AR, en toda la cohorte (izquierda) y en el subgrupo con ganglios negativos (derecha). En los violin plots, las líneas punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Análisis estadístico: Mann Whitney **(A)** y Fisher **(B)**.

Expresión de AR en pacientes categorizados según expresión de PR e isoformas de PR

Para continuar estudiando las variaciones en la expresión del marcador AR, incorporando también muestras con distintas proporciones de isoformas de PR.

La cuantificación de las inmunomarcaciones para AR, determinando la expresión nuclear de células tumorales viables positivas (0-100%) (Garcia et al, 2020), reveló una tendencia hacia una mayor expresión nuclear de AR en el subgrupo ER^+PR^- respecto de ER^+PR^+ (**Figura r-33 A**). Asimismo, al analizar la expresión de AR en función de la isoforma de PR predominante, se observó que los tumores PRB-H presentan mayores niveles de AR en comparación con los tumores PRA-H. Los tumores ER^+PR^- , también mostraron mayores niveles de AR, indicando que la falta de PR y/o la alta expresión de isoforma B del PR estarían asociadas a una mayor expresión de AR (**Figura r-33 B**).

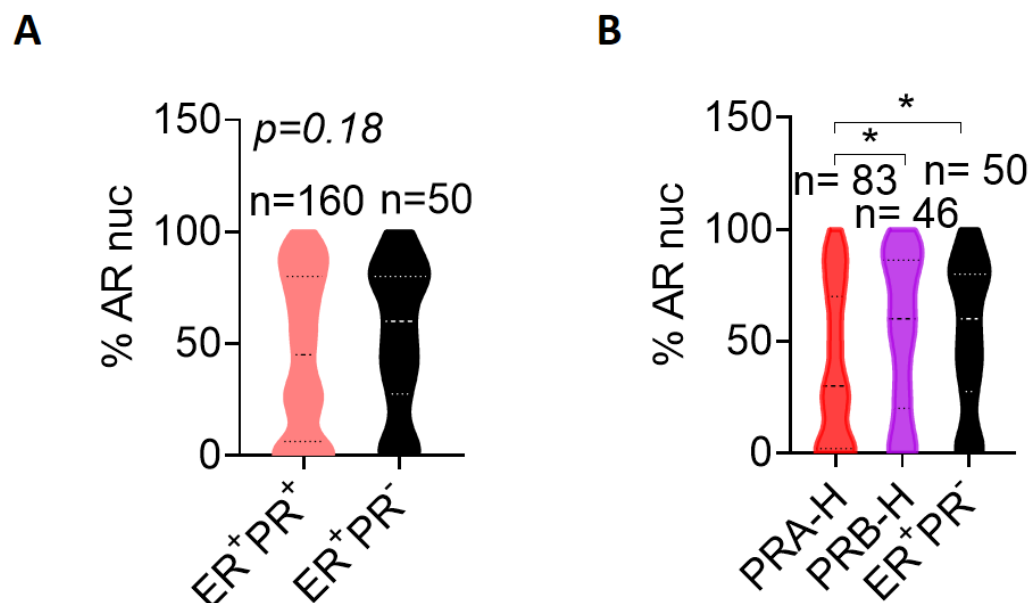


Figura r-33 A-B. Cuantificación del porcentaje de expresión de AR por IHQ en los distintos subtipos tumorales ER^+PR^+ , ER^+PR^- **(A)** o PRA-H, PRB-H, ER^+PR^- **(B)**. En los violin plots, las líneas punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente; * $p < 0,05$. Análisis estadístico: Mann Whitney.

A partir de los resultados anteriores y como, además de los tacos en parafina, contábamos también con extractos nucleares de algunas de las muestras de CM, seleccionamos algunas muestras correspondientes a los subtipos ER⁺PR⁺, ER⁺PR⁻, PRA-H y PRB-H y evaluamos por *Wb* la expresión nuclear de AR.

Según se detalla en la **Figura r-34 A-B**, el subgrupo ER⁺PR⁻ presentó mayores niveles de AR nuclear en comparación con el grupo ER⁺PR⁺ y con las muestras PRA-H, reafirmando los resultados obtenidos por IHQ (**Figura r-33 A-B**). Por otra parte, al evaluar la expresión de AR dentro del subgrupo ER⁺PR⁺, observamos que las muestras PRB-H presentaron una tendencia hacia una mayor expresión de AR nuclear respecto a las PRA-H (**Figura r-34 B**).

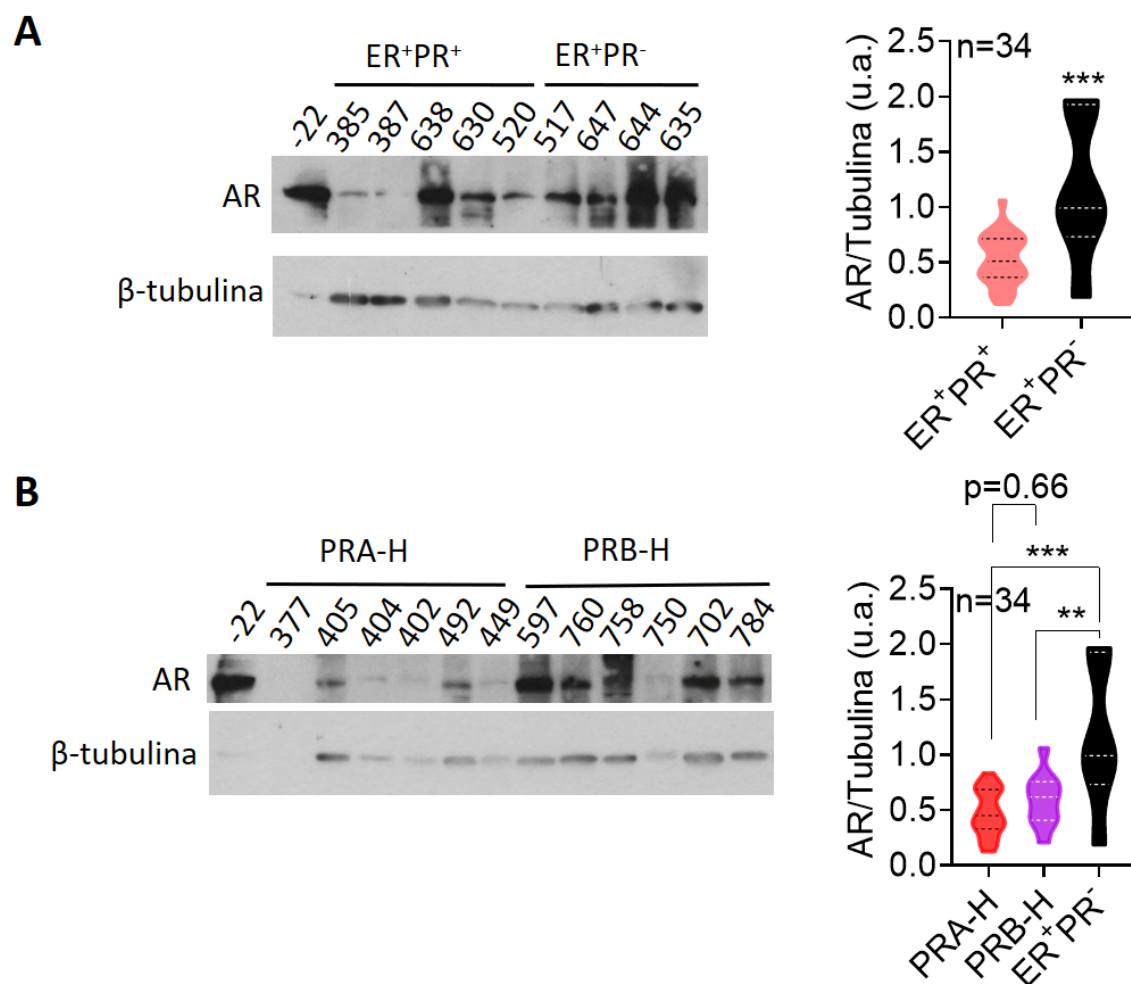


Figura r-34 A-B. Expresión de AR por *Wb* y su correspondiente cuantificación en extractos nucleares de carcinomas mamarios luminales de pacientes clasificados según su expresión de PR (**A**) o según la expresión de isoformas de PR (PRA-H y PRB-H) (**B**). Se utilizó un extracto nuclear de T47D-HMW como

control positivo y β -Tubulina como control de carga. En los violin plots, las líneas punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: Mann Whitney. T47D-HMW: línea T47D que sobreexpresa la isoforma de alto peso molecular de FGF2 (22 kDa).

Expresión de FGF2 en relación con parámetros clínico-patológicos

En base a nuestros resultados experimentales, a continuación, evaluamos la expresión nuclear de FGF2 en una subcohorte incluida dentro de la cohorte descrita anteriormente. Nos focalizamos en la cuantificación de la marca nuclear en el epitelio tumoral ya que es la que correspondería a las HMW-FGF2. Para ello se realizó un score de marcación, considerando el porcentaje de células positivas (0-100%) y la intensidad de la marca (1 a 3) (Sahores et al, 2018). En la **Figura r-35** se muestran imágenes representativas que ejemplifican un score bajo ($score < 5$) y alto ($score \geq 5$) para FGF2 nuclear. De acuerdo con el tumor, la marca en el epitelio se localizó en el compartimento citosólico y/o nuclear y con distinta intensidad de marcación. Asimismo, se observó que algunos tumores también expresaban FGF2 en el núcleo de los fibroblastos estromales.

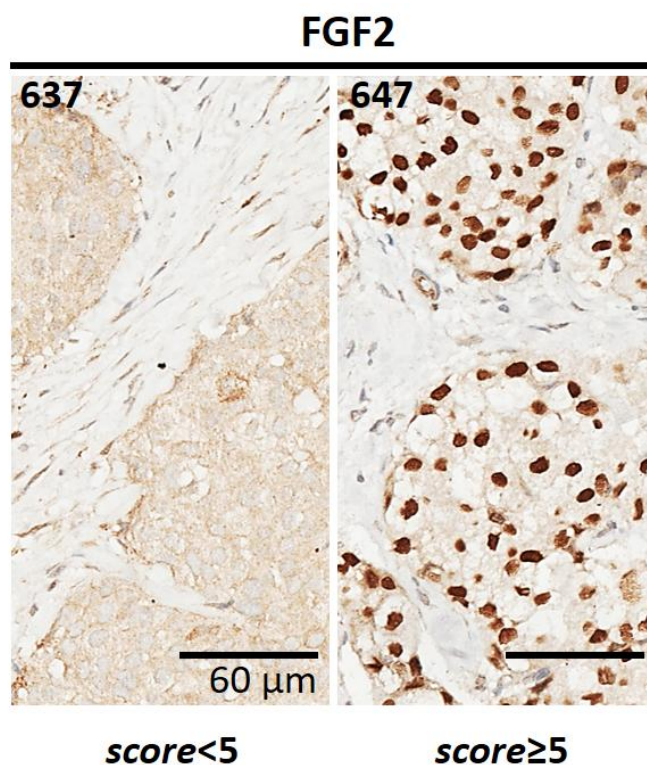


Figura r-35. Imágenes representativas de baja ($score < 5$, muestra 637; $score$ 1) y alta (> 5 , muestra 647; $score$ 285) expresión nuclear de FGF2 por IHQ en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama. Escala: 60 μ m.

Evaluamos la distribución de las muestras categorizadas según la expresión de FGF2 nuclear respecto de distintos parámetros clínico-patológicos (**Tabla r-3**). No observamos diferencias significativas entre edad, subtipo histológico, estadio tumoral, grado histológico o invasión de los ganglios axilares. Las frecuencias fueron comparables entre grupos etarios para el score alto y bajo de FGF2 nuclear. Cabe destacar que de las 8 pacientes con estadio IV, es decir, con metástasis a distancia al momento del diagnóstico, el 75% (6/8) expresó altos niveles de FGF2 nuclear.

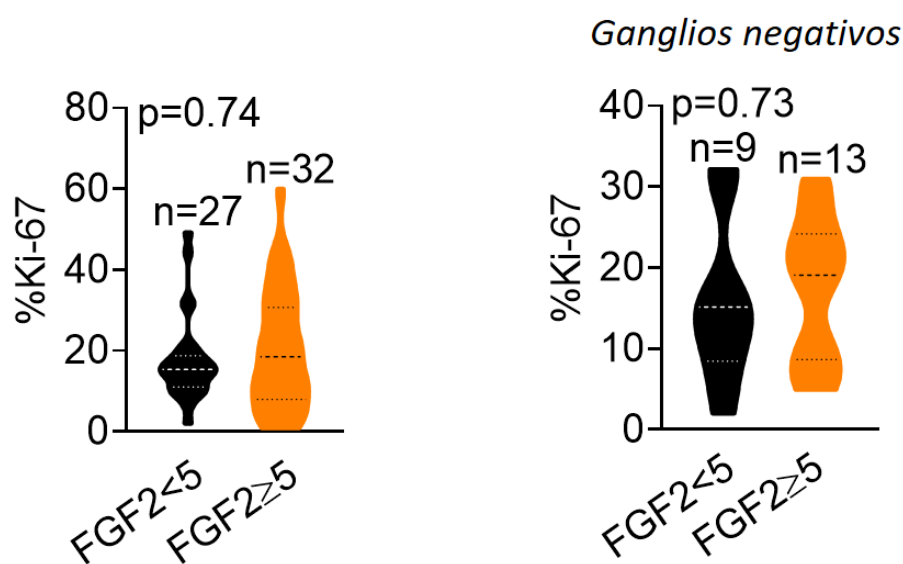
		Score FGF2 $\geq$ 5 (%)	Score FGF2 < 5 (%)	χ^2 (p valor)
Edad	≤ 40	1/1 (100)	0/1 (0.0)	0.81
	41-50	9/17 (52.9)	8/17 (47.1)	
	51-60	15/30 (50.0)	15/30 (50.0)	
	>60	24/46 (52.2)	22/46 (47.8)	
Subtipo histológico	CI-NST	32/67 (47.8)	35/67 (52.2)	0.20
	CLI	12/17 (70.6)	5/17 (29.4)	
	CDLI	2/7 (28.6)	5/7 (71.4)	
	SE	2/3 (66.7)	1/3 (33.3)	
Estadio tumoral	I-IIA	21/41 (51.2)	20/41 (48.8)	0.29
	IIB-III	16/36 (44.4)	20/36 (55.6)	
	IV	6/8 (75.0)	2/8 (25.0)	
Grado histológico	1	4/7 (57.1)	3/7 (42.9)	0.59
	2	18/34 (52.9)	16/34 (47.1)	
	3	17/40 (42.5)	23/40 (57.5)	
Ganglios axilares	Positivo	26/46 (56.5)	20/46 (43.5)	0.49
	Negativo	14/29 (48.3)	15/29 (51.7)	

Tabla r-3: Frecuencia de expresión nuclear de FGF2 (score ≥ 5 vs. < 5 , evaluado por IHQ) según parámetros clínico-patológicos en muestras tumorales humanas. Las frecuencias se presentan como casos/total para edad, subtipo histológico, estadio tumoral, grado tumoral y estado de ganglios axilares. Análisis estadístico: χ^2 .

Expresión de Ki-67 y FGF2 nuclear

En la **Figura r-36 A** se observa la expresión de Ki-67 en función de la expresión de FGF2 nuclear. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de Ki-67 al comparar los grupos con baja ($\text{FGF2} < 5$) y alta ($\text{FGF2} \geq 5$) expresión de FGF2, tanto en el conjunto global como en el subgrupo con ganglios axilares negativos. No obstante, al estratificar las muestras según una alta ($\geq 20\%$) o baja ($< 20\%$) expresión de Ki-67 se observa una tendencia hacia un mayor porcentaje de pacientes con proliferación elevada en el grupo con alta expresión nuclear de FGF2 ($\text{FGF2} \geq 5$), tanto en la cohorte total como en el subgrupo con ganglios negativos, sugiriendo una posible asociación entre mayor expresión de FGF2 y proliferación celular, que podría confirmarse con una mayor cantidad de muestras (**Figura r-36 B**).

A



B

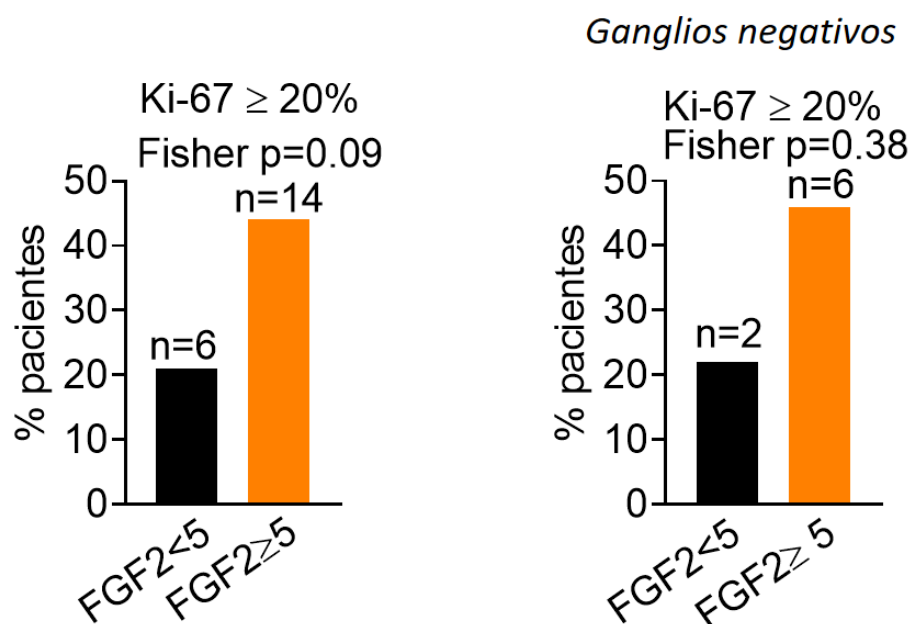


Figura r-36 A-B. Relación entre la expresión de FGF2 y la proliferación tumoral (Ki-67) en muestras de pacientes con cáncer de mama. **(A)** Porcentaje de expresión de Ki-67 en muestras con baja (score FGF2<5) y alta (score FGF2≥5) expresión de FGF2, considerando toda la cohorte (izquierda) o los casos con ganglios axilares negativos (derecha). **(B)** Porcentaje de pacientes con proliferación elevada (Ki-67≥20%) según el score de FGF2, en toda la cohorte (izquierda) y en el subgrupo con ganglios negativos (derecha). En los violin plots, las líneas punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente. Análisis estadístico: Mann-Whitney **(A)** y Fisher **(B)**.

Expresión de FGF2 en pacientes categorizados según expresión de PR e isoformas de PR

En ensayos previos del laboratorio demostramos que, dentro del grupo con grado histológico 1 ó 2, las pacientes con tumores PRB-H expresaban mayores niveles de FGF2 que las pacientes PRA-H (Sahores et al, 2018). Por lo tanto, aquí ampliamos la cohorte original y evaluamos también la expresión en el subgrupo ER⁺PR⁻ tanto por IHQ como por Wb.

El análisis por IHQ reveló una tendencia hacia un incremento en la expresión nuclear de FGF2 en el grupo ER⁺PR⁺ en comparación al grupo ER⁺PR⁻ (**Figura r-37 A**) y esta diferencia fue significativa si analizamos sólo los tumores de grado histológico bajo (**Figura r-37 B**).

Al analizar la expresión de FGF2 en función de la isoforma de PR predominante, se observó que los tumores PRB-H presentaban niveles más elevados de FGF2 en comparación con los tumores ER⁺PR⁻, y una tendencia respecto de los PRA-H (p=0.11) (**Figura r-37 C**). De manera similar, esta diferencia entre PRB-H y PRA-H es significativa si sólo se incluyen en el análisis las muestras de grado histológico bajo (**Figura r-37 D**).

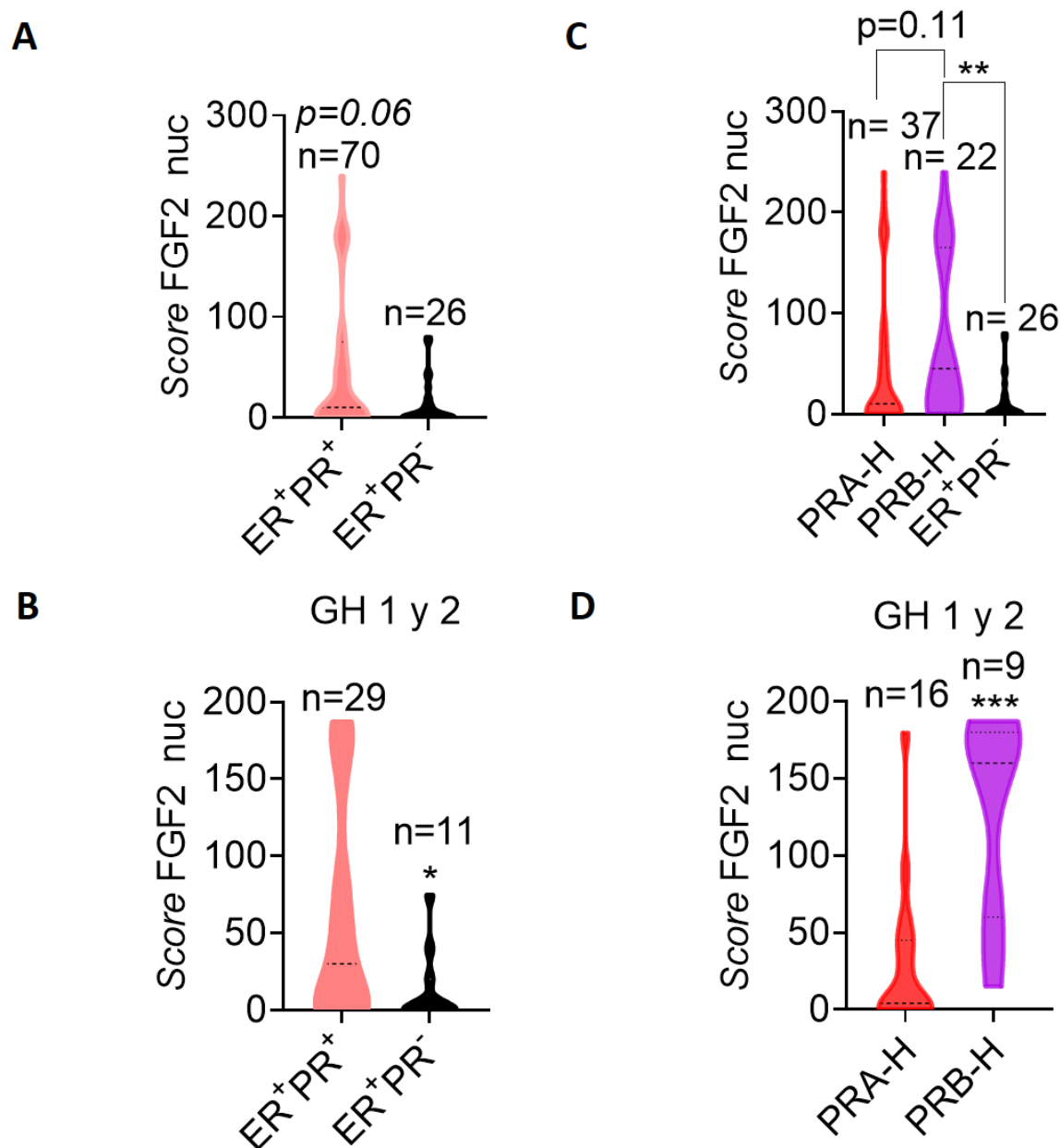


Figura r-37 A-D. Expresión nuclear de FGF2 según subtipos luminales de cáncer de mama. Cuantificación del porcentaje de expresión nuclear de FGF2 por IHQ en tumores ER^+PR^+ , ER^+PR^- (A-B) o tumores $PRA-H$, $PRB-H$ comparados con ER^+PR^- (C-D), considerando toda la cohorte luminal (A y C) o sólo las muestras con grado histológico 1 y 2 (B y D; GH 1 y 2). En los violin plots, las líneas punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Análisis estadístico: Mann-Whitney.

En línea con lo realizado para el AR, también evaluamos la expresión de FGF2, tanto LMW-FGF2, HMW-FGF2 como FGF2 total, en extractos nucleares por *Wb* (**Figura r-38**). Se cuantificaron las bandas y se compararon los niveles de expresión en ER⁺PR⁺ respecto de ER⁺PR⁻, encontrando niveles de expresión similares entre ambos grupos (**Figura r-38 A**).

Focalizando en el grupo ER⁺PR⁺, se detectaron menores niveles en la expresión de FGF2 total y LMW-FGF2 en el subgrupo PRB-H respecto al grupo PRA-H. Esta diferencia no se observó para HMW-FGF2 (**Figura r-38 B**).

Cabe destacar que el ensayo de *Wb* nos permitió distinguir la expresión de isoformas de FGF2, pero no podemos determinar si esa expresión proviene del compartimento epitelial o estromal. Por lo tanto, las diferencias encontradas entre los subgrupos por *Wb* para FGF2 podrían deberse a que el FGF2 también se expresa en el estroma tumoral. Como se observó en la **Figura r-35** algunas muestras tumorales mostraron incluso una marca positiva en el núcleo del compartimento estromal.

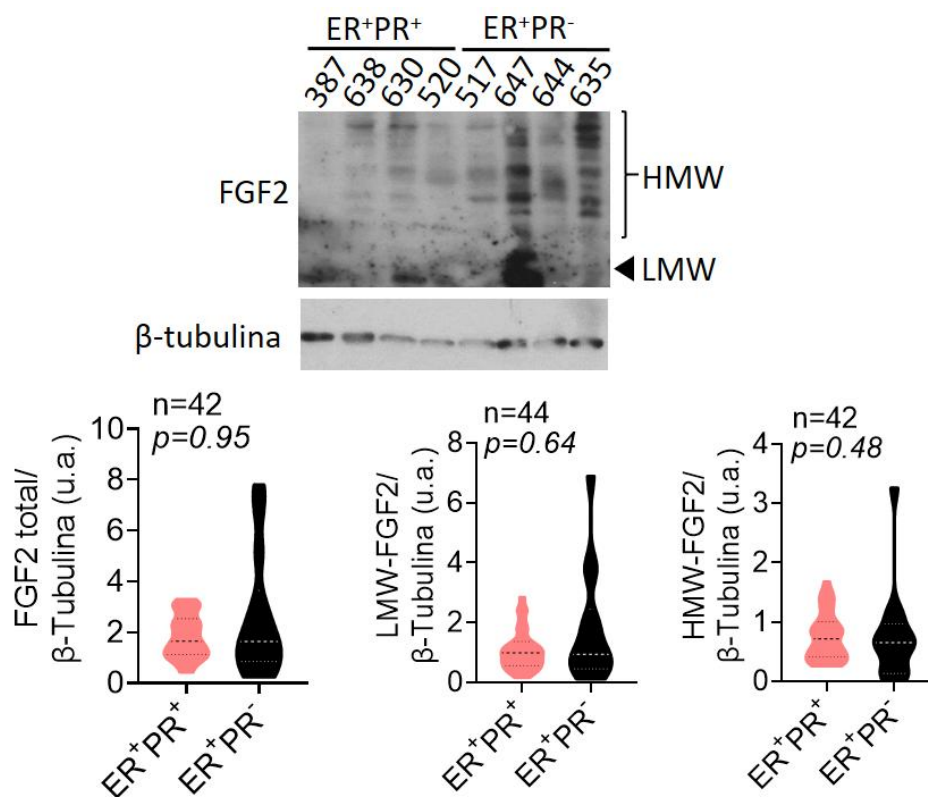
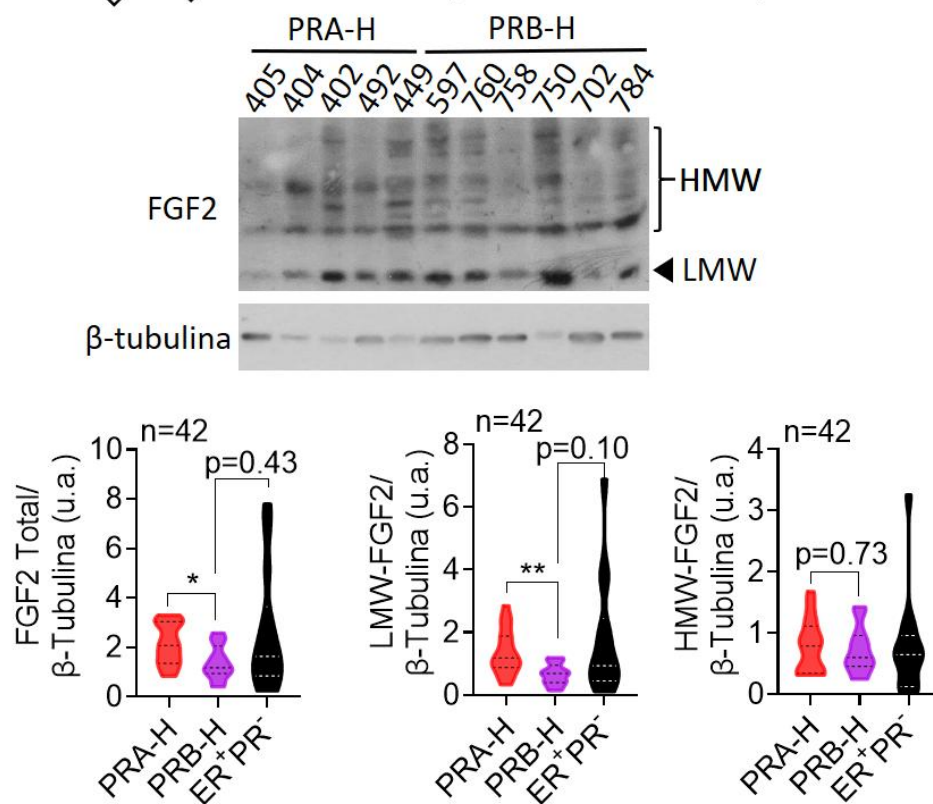
A**B**

Figura r-38 A-B. Expresión nuclear de FGF2 por Wb en carcinomas mamarios luminales. Wb de FGF2 en extractos nucleares de tumores luminales de pacientes clasificados según su expresión de PR (ER⁺PR⁺ vs ER⁺PR⁻, **A**) o según expresión de isoformas de PR (PRA-H y PRB-H, comparados con ER⁺PR⁻, **B**); con sus cuantificaciones relativas de FGF2 total, LMW-FGF2 y HMW-FGF2 normalizadas a β -tubulina. En los violin plots, las líneas continuas y punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Análisis estadístico: Mann-Whitney. LMW-FGF2: isoforma de bajo peso molecular de FGF2 (18 kDa); HMW-FGF2: isoforma de alto peso molecular de FGF2 (22 kDa).

Asociación AR-FGF2 por Wb e IHQ

Como prueba de concepto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la expresión concomitante de AR y FGF2 nucleares en los distintos subgrupos a partir de las cuantificaciones realizadas por Wb e IHQ mencionadas en los párrafos anteriores.

En la **Figura r-39 A** se ilustra en un set de muestras ER⁺ la expresión de AR y FGF2 por Wb. A partir de la cuantificación de las bandas correspondientes en muestras evaluables simultáneamente tanto para AR como para FGF2, se realizó la correlación de *Spearman*. Se observó que, en la cohorte ER⁺ analizada, existe una correlación positiva entre la expresión nuclear de AR y FGF2 total (**Figura r-39 B**).

Por otro lado, correlacionamos los datos de los marcadores AR y FGF2 nucleares obtenidos por IHQ. En ensayos previos (ver **Antecedentes**; Tesis Figueroa) con una cohorte más pequeña habíamos observado una tendencia no significativa en el subgrupo ER⁺PR⁻ a una mayor expresión de AR en tumores con altos niveles de FGF2 nuclear. Por lo tanto, en este trabajo, ampliamos nuestra cohorte luminal evaluando tanto los subtipos ER⁺PR⁺ y ER⁺PR⁻ como también los PRA-H y PRB-H.

La cuantificación realizada por IHQ mostró que la proporción de AR nuclear no difiere de manera significativa entre tumores ER⁺PR⁺ estratificados según el score nuclear de FGF2 bajo o alto, mientras que en los tumores ER⁺PR⁻ se observa una mayor expresión nuclear de AR en los casos con FGF2 nuclear alto (**Figura r-39 C**). En los análisis por subgrupos de isoformas de PR, no se encontraron diferencias en PRA-H, mientras que en el grupo PRB-H se detecta un aumento del AR nuclear en los casos con score elevado de FGF2 (**Figura r-39 D**).

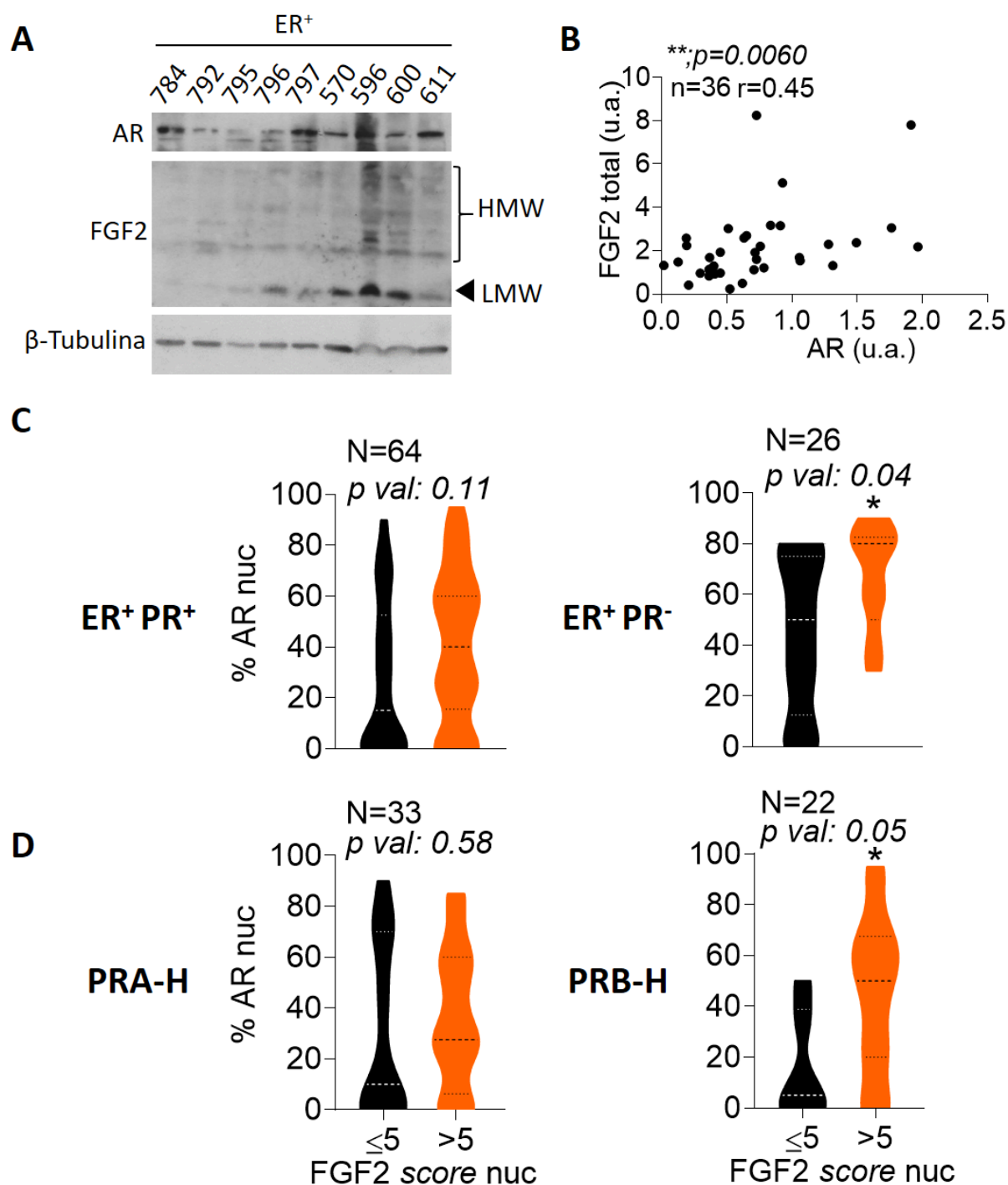


Figura r-39 A-D. Relación entre FGF2 nuclear y AR en carcinomas mamarios luminales. (A) Wb de AR y FGF2 en extractos nucleares de tumores ER⁺, con β-tubulina como control de carga. (B) Correlación entre los niveles nucleares totales de FGF2 y AR determinados por Wb (n = 36). (C) Porcentaje de AR nuclear por IHQ en tumores ER⁺PR⁺ (N=64) y ER⁺PR⁻ (N=26) agrupados según score nuclear de FGF2 bajo (≤5) o alto (>5). (D) Porcentaje de AR nuclear en los subgrupos PRA-H (N = 33) y PRB-H (N = 22) estratificados de

*igual modo según el score nuclear de FGF2. En los violin plots, las líneas punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Análisis estadístico: correlación de Spearman (B) y Mann-Whitney (C–D). LMW-FGF2: isoforma de bajo peso molecular de FGF2 (18 kDa); HMW-FGF2: isoforma de alto peso molecular de FGF2 (22 kDa).*

En resumen, la estratificación según la inmunomarcación evidenció una mayor expresión de AR en tumores PR⁻ y PRB-H con niveles elevados de FGF2 nuclear ($score \geq 5$) (**Figura r-39 C-D**). Estos datos indican un co-enriquecimiento preferencial de AR y FGF2 nucleares en tumores luminales con pérdida de PR o predominio de PRB, lo que respalda su implicancia como marcadores moleculares en subtipos de CM clínicamente más agresivos.

Expresión de los marcadores WNT4 y WNT6 en pacientes con CM

WNT4

Nuestras evidencias experimentales indican la desregulación de la vía de Wnt en las variantes resistentes endocrinas con mayor expresión de AR y HMW-FGF2. En particular, demostramos el aumento en la expresión de WNT4 o WNT6 en las T47D-YB y T47D-HMW, respectivamente. Por lo tanto, analizamos la expresión de estos ligandos en pacientes con CM luminal.

Evaluamos la expresión de WNT4 por IHQ en los distintos subgrupos. En la (**Figura r-40 A**) se observan imágenes representativas de la inmunomarcación para WNT4 que se localizó en el citosol/membrana del epitelio tumoral. La cuantificación del porcentaje de expresión de WNT4 reveló una tendencia hacia una mayor expresión de WNT4 en el subgrupo ER⁺PR⁻ en relación con ER⁺PR⁺ (**Figura r-40 B**) y no se observaron diferencias significativas en el subgrupo PRB-H respecto de PRA-H (**Figura r-40 C**).

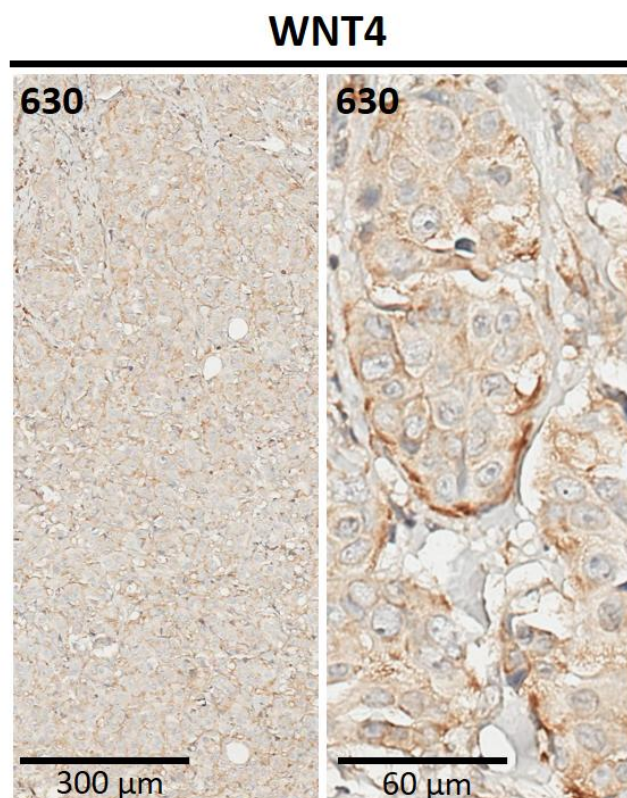
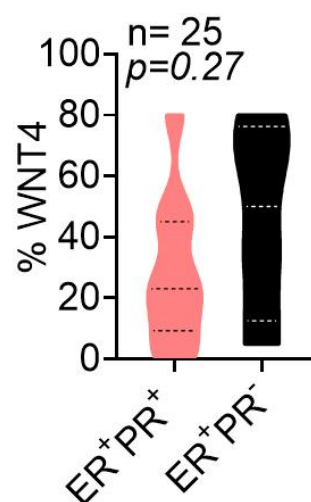
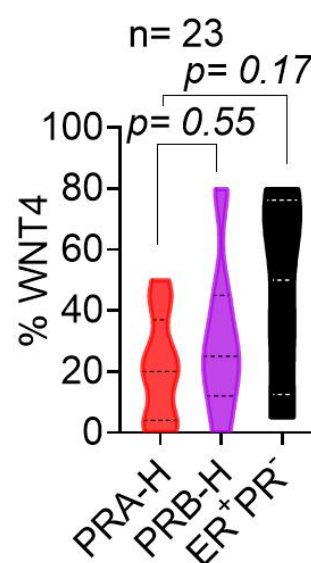
A**B****C**

Figura r-40 A-C. Expresión de WNT4 por IHQ en carcinomas mamarios luminales. (A) Imágenes representativas de la inmunomarcación para WNT4 (muestra 630; 19 %). (B) Porcentaje de células positivas para WNT4 en tumores ER⁺PR⁺ y ER⁺PR⁻. (C) Porcentaje de células positivas para WNT4 según la isoforma predominante de PR (PRA-H, PRB-H) y en tumores ER⁺PR⁻. Los datos se expresan como porcentaje de células positivas en relación al total de células tumorales por campo de 400X. En los violin plots, las líneas punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente. Análisis estadístico: Mann-Whitney. Escala: 300 y 60 μm.

Al analizar la expresión de WNT4 por Wb en extractos tumorales citosólicos se obtuvieron tendencias similares a las obtenidas por IHQ y estas diferencias se acentuaron al comparar los subgrupos ER⁺PR⁻ respecto del PRA-H (**Figura r-41 A-B**).

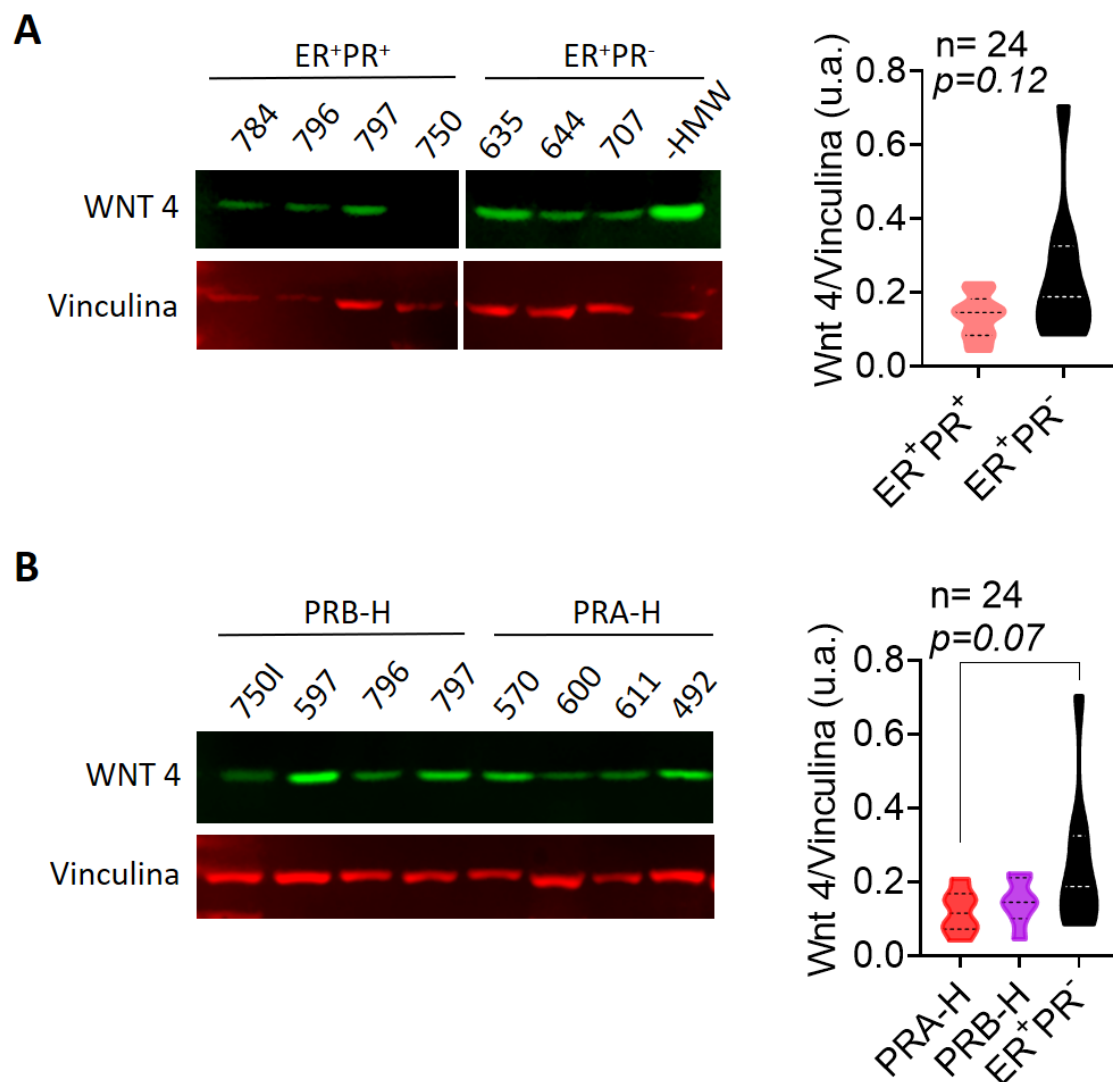


Figura r-41 A-B. Expresión de WNT4 por Wb en extractos citosólicos de carcinomas mamarios luminales. **(A)** Imágenes representativas de Wb que muestran la expresión de WNT4 en tumores clasificados según la expresión de PR (ER⁺PR⁺ y ER⁺PR⁻). **(B)** Expresión de WNT4 en tumores agrupados según la isoforma predominante de PR (PRB-H y PRA-H), comparados con tumores ER⁺PR⁻. A la derecha se observan las cuantificaciones relativizadas a la expresión de vinculina que se utilizó como control de carga. En los violin plots, las líneas continuas y punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente. Análisis estadístico: Mann-Whitney.

WNT6

Luego, evaluamos la expresión de WNT6 por IHQ en muestras de pacientes con tumores luminales. En la **Figura r-42 A** observamos imágenes representativas del marcador WNT6 por IHQ. En general, la expresión fue predominantemente epitelial y la marca fue citoplasmática, en casquete en el citoplasma o perinuclear, en ocasiones con expresión de membrana más intensa en el borde de los nidos en contacto con el estroma y en las interacciones celulares. La cuantificación de la marca en las muestras distribuidas por subgrupos indicó una tendencia a una mayor expresión de WNT6 en las muestras ER⁺PR⁻ y PRB-H respecto de los subgrupos ER⁺PR⁺ (**Figura r-42 B**) y PRA-H (**Figura r-42 B**) respectivamente. Es interesante destacar que las muestras PRB-H presentan niveles similares de WNT6 a las ER⁺PR⁻ (**Figura r-42 B**).

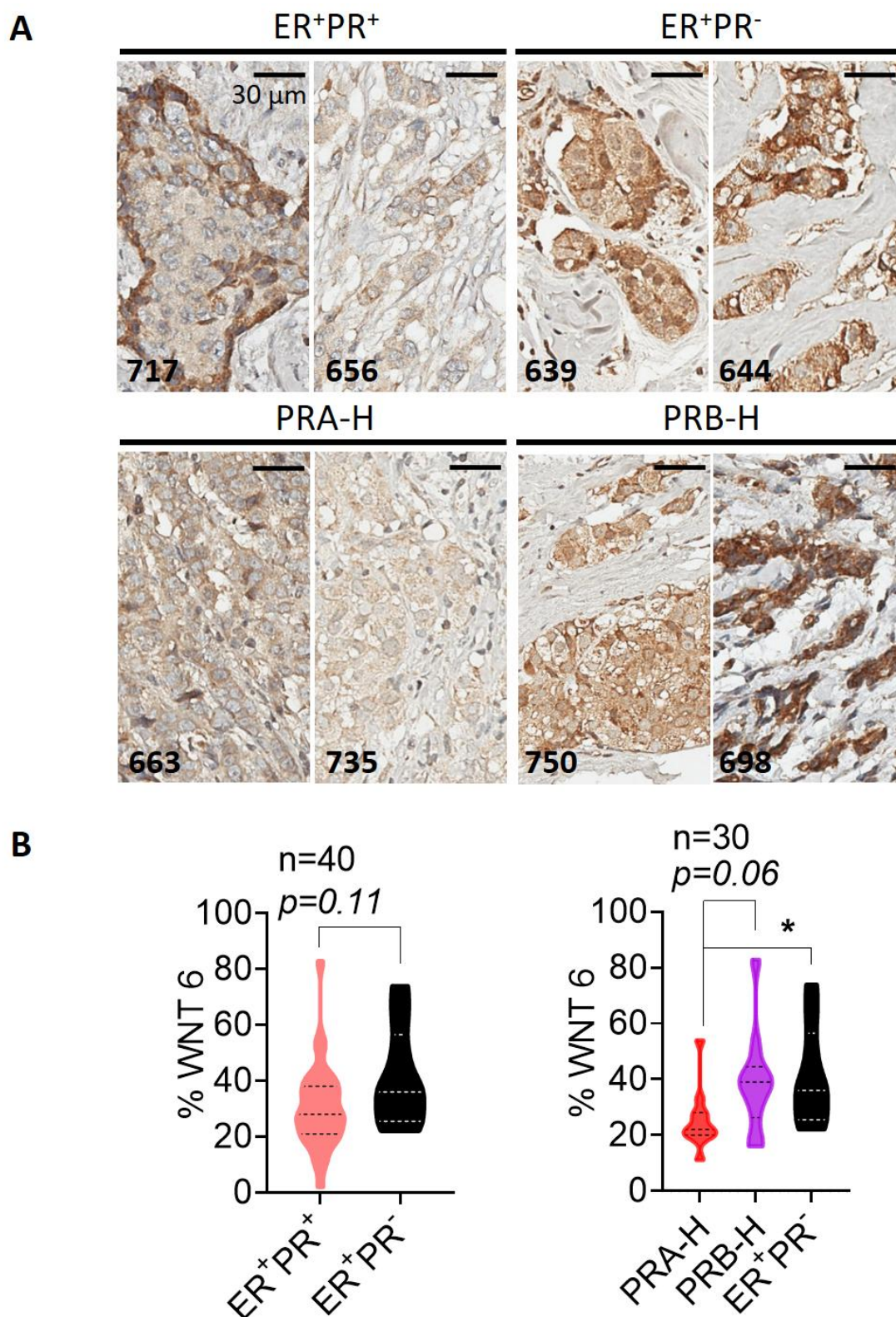


Figura r-42 A-B. Expresión de WNT6 por IHQ en carcinomas mamarios luminales. (A) Imágenes representativas de la inmunomarcación para WNT6 en tumores ER⁺PR⁺, ER⁺PR⁻, PRA-H y PRB-H. (B)

*Porcentaje de células positivas para WNT6 en tumores clasificados según la expresión de PR (ER⁺PR⁺ y ER⁺PR⁻, izquierda) o según la isoforma predominante de PR (PRA-H, PRB-H y ER⁺PR⁻, derecha). En los violin plots, las líneas continuas y punteadas indican la mediana y los cuartiles, respectivamente. *p < 0,05. Análisis estadístico: Mann-Whitney. Escala: 30 μ m.*

O.E.5d: En una cohorte de pacientes ER⁺ clasificados según la expresión de PR (PR⁺, PR⁻, PRA-H o PRB-H), investigar la sobrevida global en pacientes con altos o bajos niveles de AR o FGF2 nuclear por subgrupo.

Sobrevida global en nuestra cohorte de pacientes

Para profundizar en el impacto clínico de los biomarcadores estudiados, se realizó un análisis de supervivencia global (SG) en las mismas cohortes de pacientes con CM estudiadas anteriormente, y ampliando alguno de estos resultados utilizando datos de expresión génica extraídos de bases públicas como cBioportal.

Subgrupos ER⁺PR⁺, ER⁺PR⁻, PRA-H y PRB-H

En la cohorte total, no se observaron diferencias significativas en las curvas de SG entre los grupos ER⁺PR⁺ vs. ER⁺PR⁻ (**Figura r-43 A**) y PRA-H vs. PRB-H (**Figura r-43 B**). Al analizar exclusivamente las pacientes con ganglios axilares negativos al diagnóstico, identificamos una peor SG para el subtipo ER⁺PR⁻ respecto del ER⁺PR⁺ (**Figura r-43 C**), aunque debido al bajo número de pacientes en el subgrupo ER⁺PR⁻, es necesario aumentar el N para confirmar estos resultados. En el caso de las pacientes PRB-H, si bien las diferencias no fueron significativas con PRA-H, se acentuaron las tendencias hacia una peor SG para el subgrupo PRB-H (**Figura r-43 D**).

Esta acentuación de las diferencias en pacientes sin compromiso ganglionar sugiere que, en ausencia de diseminación locorregional, las características biológicas propias del tumor —como el perfil de receptores hormonales y la isoforma predominante de PR— pueden adquirir un peso relativo mayor en la evolución clínica.

De todos modos, de aquí en adelante los análisis de SG se realizaron, salvo excepciones, sobre la cohorte completa (incluyendo pacientes con diseminación ganglionar) ya que, al estratificar por expresión de biomarcadores, seleccionar una subcohorte de ganglios negativos derivó en muy pocas muestras, dando lugar a resultados estadísticamente inválidos o poco confiables.

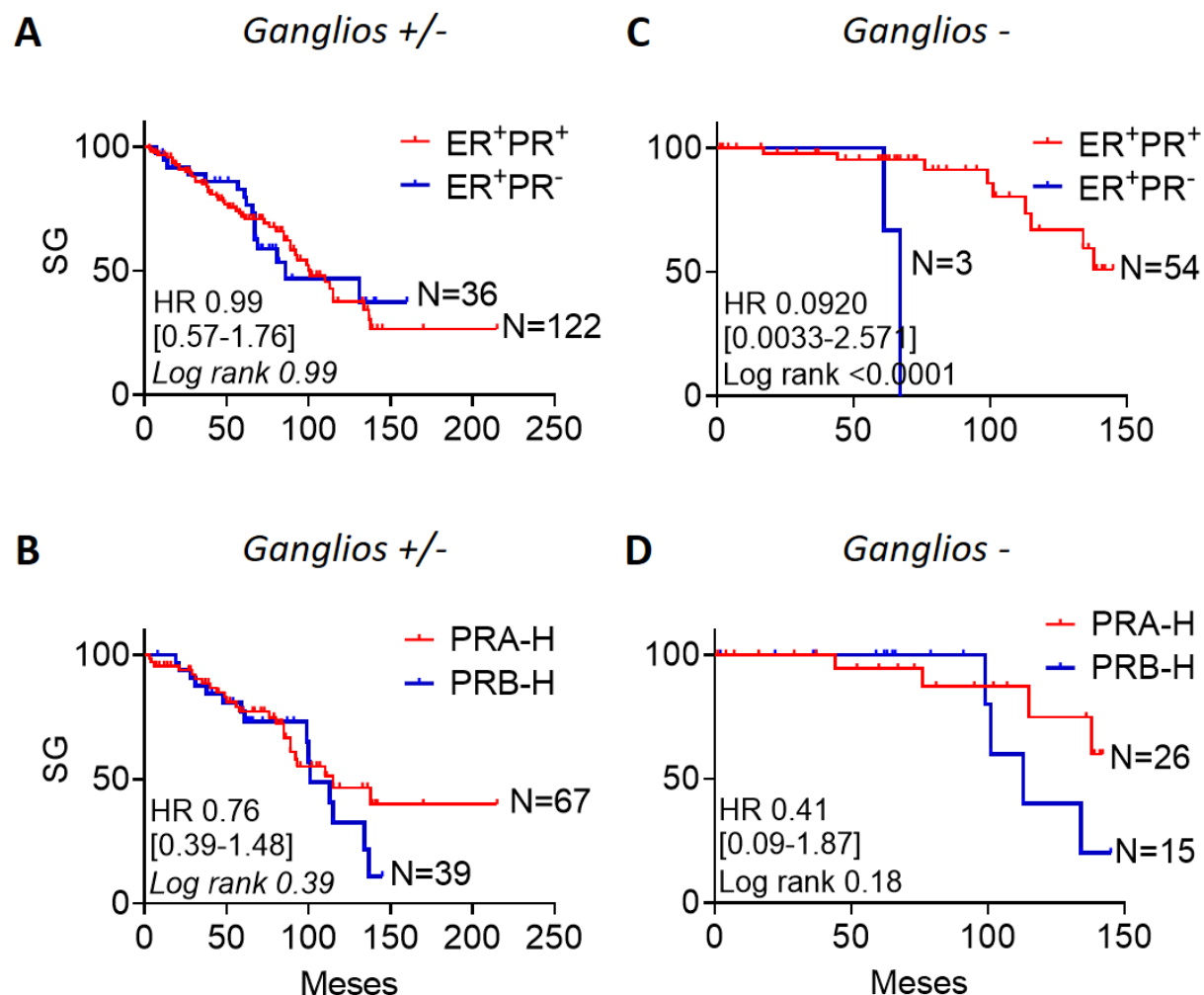


Figura r-43 A-D. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) en pacientes con carcinomas mamarios luminales. (A–B) SG en la cohorte completa (ganglios positivos y negativos) según la expresión de PR (ER⁺PR⁺ vs. ER⁺PR⁻, A) o según la isoforma predominante de PR (PRA-H vs. PRB-H, B). (C–D) SG en los pacientes sin diseminación locorregional (ganglios negativos) estratificada de igual modo (ER⁺PR⁺ vs. ER⁺PR⁻, C; PRA-H vs. PRB-H, D). En cada gráfico se indica el número de casos por grupo (N), el cociente de riesgo (HR), su intervalo de confianza (IC) y el valor de p del test de Log-rank. El eje X representa el tiempo de seguimiento en meses.

Estratificación por expresión de AR: subgrupos ER⁺PR⁺, ER⁺PR⁻, PRA-H y PRB-H

En primer lugar, comparamos la SG en la cohorte general estratificando las muestras con alto ($\geq 10\%$) y bajo ($< 10\%$) porcentaje de AR nuclear, tanto en la población total como en el subgrupo con ganglios negativos. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en ningún contexto (**Figura r-44 A**).

Luego, realizamos el mismo análisis, pero considerando los subgrupos ER⁺PR⁺, ER⁺PR⁻, PRA-H y PRB-H para evaluar el impacto de la expresión de AR en cada subtipo. Si bien no se observaron diferencias significativas en ninguno de los subgrupos evaluados, se observaron tendencias hacia una peor SG en los casos con bajo porcentaje de AR nuclear en el subtipo ER⁺PR⁻ (**Figura r-44 B**) y alta expresión de AR en el subgrupo PRB-H (**Figura r-44 C**).

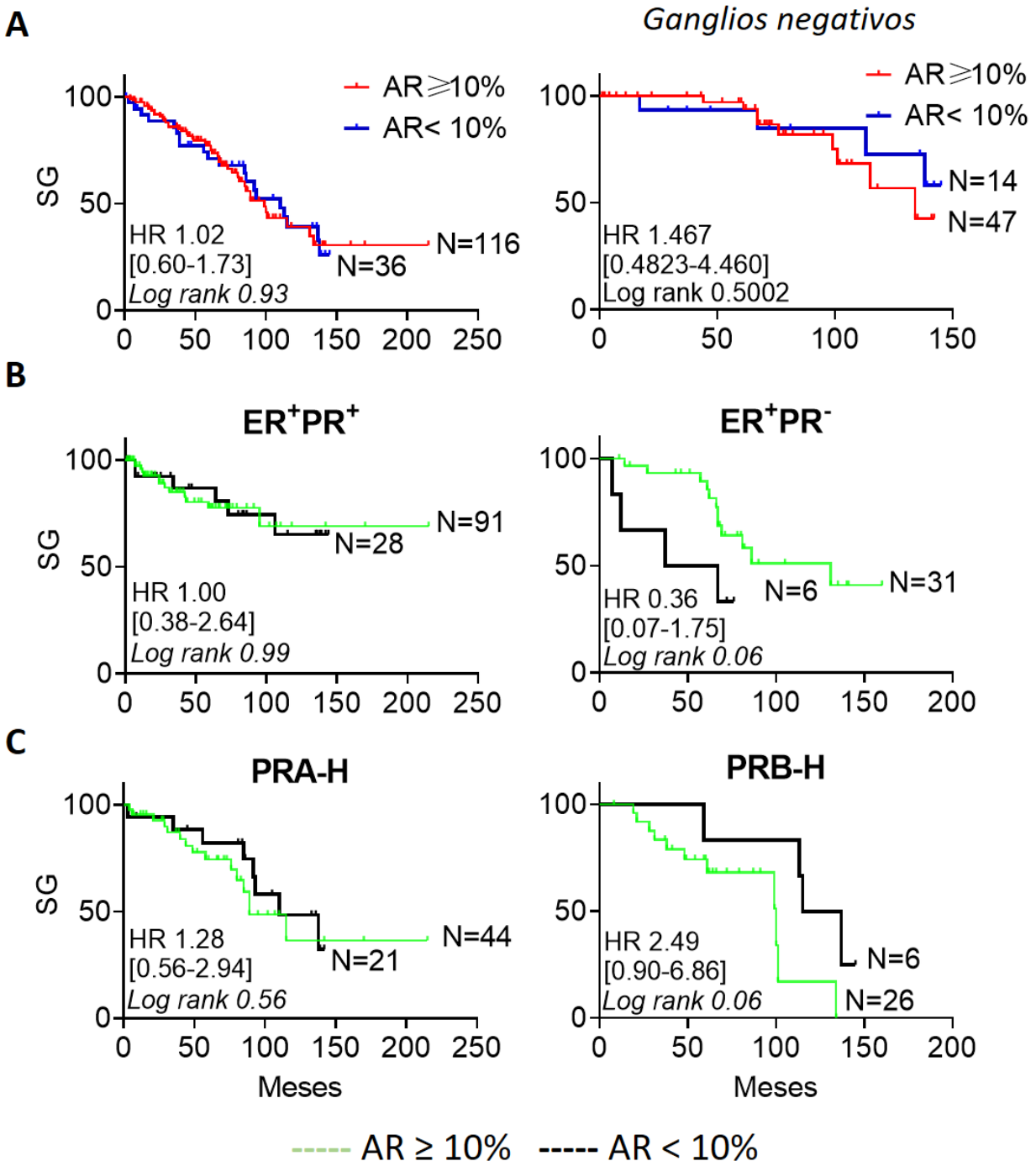


Figura r-44 A-C. *Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) en pacientes con cáncer de mama luminal, según la expresión nuclear de AR por IHQ. (A) SG en la cohorte total (izquierda) y en el subgrupo con ganglios negativos (derecha), comparando pacientes con AR $\geq 10\%$ y AR $< 10\%$. (B) SG en los subgrupos ER⁺PR⁺ (izquierda) y ER⁺PR⁻ (derecha) según el porcentaje de AR nuclear. (C) SG en los subgrupos PRA-H (izquierda) y PRB-H (derecha) de acuerdo con la expresión de AR. En cada gráfico se indica el número de casos por grupo (N), el cociente de riesgos (HR), su intervalo de confianza (IC) y el valor de p del test de Log-rank. El eje X representa el tiempo de seguimiento en meses.*

Teniendo en cuenta que en la bibliografía está reportado que en el subgrupo ER⁺PR⁻ la mayor expresión de AR se asocia con peor pronóstico (Wang et al, 2024), nos llamó la atención el resultado en el subgrupo ER⁺PR⁻ donde se apreció una tendencia a peor evolución en los casos con bajo porcentaje de AR nuclear (**Figura r-45**).

Por este motivo extendimos el análisis tomando datos de bases públicas tales como *cBioportal* (*METABRIC*), con el fin de contrastar los hallazgos obtenidos en nuestra cohorte. Los puntos de corte para definir alta y baja expresión de AR fueron determinados mediante el programa *Cutoff Finder* (Budczies et al, 2012). Para este estudio, se seleccionaron únicamente tumores con ganglios axilares negativos, permitiendo así una comparación más homogénea y relevante desde el punto de vista pronóstico.

Se evaluó la SG en los subgrupos ER⁺PR⁺ y ER⁺PR⁻, de acuerdo con niveles bajos y altos de expresión de AR definidos por valores de corte específicos para cada uno de los subgrupos. Los resultados obtenidos en la plataforma pública mostraron que tanto en ER⁺PR⁺ como ER⁺PR⁻, una mayor expresión de AR se asocia con peor SG, aunque esta diferencia fue más marcada en el subgrupo ER⁺PR⁻. Esta estrategia de validación con datos independientes permitió robustecer el análisis y profundizar la discusión sobre el rol del AR como marcador pronóstico en CM luminal sin compromiso ganglionar. Estos resultados sugieren que, en un futuro, deberíamos ampliar nuestra cohorte para generar resultados más sólidos en relación a la SG.

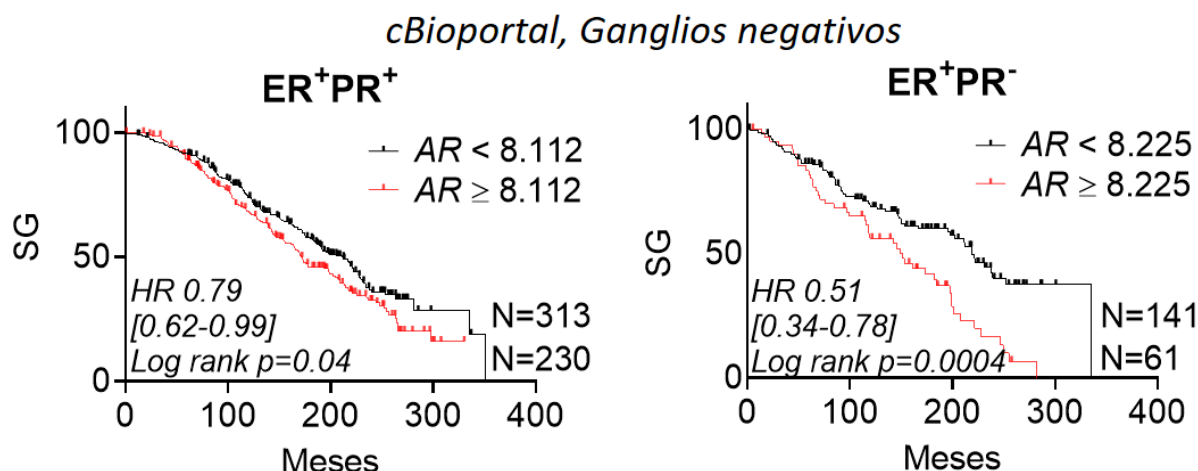


Figura r-45. Curvas de Kaplan-Meier de SG generadas a partir de datos de expresión génica (mRNA) de AR obtenidos de la base pública cBioPortal (cohorte METABRIC) para cáncer de mama con ganglios negativos. La SG se evaluó en los subgrupos ER⁺PR⁺ (izquierda) y ER⁺PR⁻ (derecha) estratificados según los valores de corte de expresión de AR indicados en cada panel. En cada gráfico se muestra el número de casos por grupo (N), la razón de riesgos (HR), su intervalo de confianza (IC) y el valor de p del test de Log-rank; el eje X representa el tiempo de seguimiento en meses.

Estratificación por expresión de FGF2: subgrupos ER⁺PR⁺, ER⁺PR⁻, PRA-H y PRB-H

De forma análoga, se siguieron los mismos pasos para evaluar el impacto de la expresión de FGF2 en la evolución clínica de nuestra cohorte, para lo cual se estratificó a las pacientes según niveles altos (*score* ≥5) o bajos (*score* <5) de este marcador en los distintos subgrupos. Las comparaciones en la SG de la cohorte en general, tanto en presencia como en ausencia de diseminación locoregional, no marcaron diferencias significativas (**Figura r-46 A**). Al separar en subgrupos, no se observaron diferencias significativas en la SG en los distintos subtipos. Sin embargo, cabe destacar, en los subtipos ER⁺PR⁺ y PRA-H las curvas sugirieron cierta tendencia hacia una mejor sobrevida en las pacientes con mayor expresión de FGF2 (**Figura r-46 B-C**).

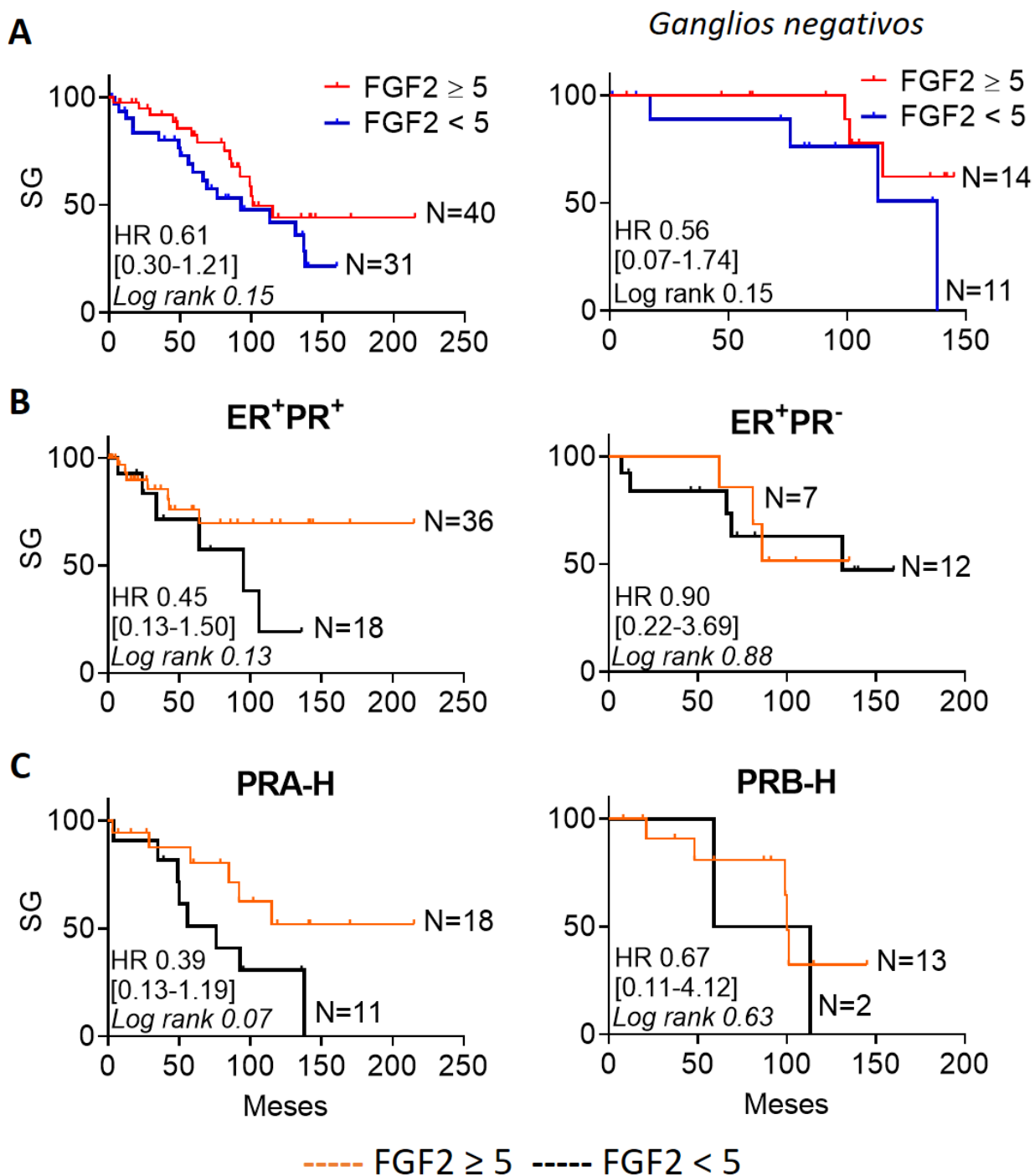


Figura r-46 A-C. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) en carcinomas luminales de mama de acuerdo con la expresión nuclear de FGF2 por IHQ. **(A)** SG en la cohorte total (izquierda) y en el subgrupo con ganglios negativos (derecha). **(B-C)** SG en los subgrupos ER⁺PR⁺ y ER⁺PR⁻ **(B)** y PRA-H y PRB-H **(C)** según la puntuación nuclear de FGF2. En cada gráfico se muestra el número de casos por grupo (N), el

cociente de riesgo (HR), su intervalo de confianza (IC) y el valor de p del test de Log-rank. El eje X indica el tiempo de seguimiento en meses.

Cabe destacar que también se realizaron los mismos análisis con datos de sobrevida libre de progresión sin observarse diferencias significativas entre los grupos.

En conjunto, los datos indican que los tumores ER⁺PR⁻ y PRB-H expresan mayores niveles de AR que los tumores ER⁺PR⁺ y PRA-H, respectivamente. La mayor expresión de AR está asociada con una mayor tasa proliferativa. En cuanto a la expresión nuclear de FGF2, no sería un marcador independiente de los subgrupos ER⁺PR⁻ y PRB-H; sin embargo, al combinar su expresión nuclear junto con AR, estos podrían servir como marcadores de ambos subgrupos. Los resultados de SG presentados en esta tesis no son suficientes para determinar si la expresión conjunta de AR y FGF2 nucleares puede estar asociado a mal pronóstico. Respecto a la expresión de WNT4 y WNT6 no obtuvimos resultados concluyentes para asociarlos con los diferentes subtipos tumorales analizados.

DISCUSIÓN

Parte I- Vía canónica de Wnt

Expresión y activación de la vía de Wnt en CM y resistencia endocrina

La activación aberrante de la vía de señalización Wnt se ha asociado con la tumorigénesis en múltiples tejidos, incluido el tejido mamario (Turashvili et al, 2006; Yin et al, 2018; Yu et al, 2016). El modelo generalmente aceptado sobre la alteración de esta vía durante la transformación mamaria sostiene que, a través de cambios epigenéticos, se incrementa la expresión de los agonistas de la vía canónica de Wnt, mientras que se reduce la expresión de los antagonistas (Koval & Katanaev, 2018). En concordancia, Lamb y col. reportaron niveles más elevados de AXIN2, FZD4 y LEF1 en líneas celulares de CM humano respecto de líneas mamarias normales, además de un incremento de genes asociados a la vía canónica de Wnt en poblaciones enriquecidas en células madre tumorales (Lamb et al, 2013). Asimismo, se ha descrito que la expresión de LRP6 se encuentra aumentada en CM, con mayor frecuencia en subtipos TNBC, y que su inhibición resulta suficiente para bloquear la proliferación celular (Liu et al, 2010).

En el contexto de la resistencia a la terapia endocrina, la evidencia disponible se centra en la interacción con el ER. En líneas celulares resistentes a tamoxifeno, diversos autores han demostrado que la activación de la vía Wnt podría participar como un factor intrínseco en la transición hacia la resistencia endocrina, y que la inhibición de esta señalización podría constituir una estrategia terapéutica eficaz para superar la resistencia al tamoxifeno (Fu et al, 2020; Won et al, 2016). Recientemente, un estudio identificó a *WNT11* como uno de los genes diferencialmente expresados y asociados a recurrencia en muestras de pacientes con CM ER⁺ (Jones et al, 2025).

En concordancia con lo reportado en la bibliografía en modelos de CM resistentes a tamoxifeno, nuestros resultados evidenciaron un aumento de ligandos y componentes tempranos de la vía de Wnt en los modelos resistentes a terapia con antiprogéstágenos en comparación con sus líneas parentales. Entre ellos, detectamos fosforilación del co-receptor LRP6 y aumento de DVL2. Cabe destacar que, en la mayoría de los casos detectamos una doble banda para DVL2, correspondiendo la de mayor peso molecular a la proteína fosforilada (Endo et al, 2005; Gonzalez-Sancho et al, 2004), indicando la activación de la vía.

Actividad de la vía de Wnt: β -catenina

La β -catenina desempeña un papel central en la regulación del desarrollo mamario y la tumorigénesis. En la membrana plasmática, coopera con las cadherinas para sostener la integridad del epitelio mamario, mientras que en el núcleo regula programas de expresión génica esenciales para la biología de las células madre mamarias durante el desarrollo de la glándula. Tanto la pérdida de β -catenina en las uniones célula-célula como su acumulación en el citosol o en el núcleo, puede ocurrir de manera independiente, y ambos eventos se asocian con una mayor predisposición al CM (Incassati et al, 2010).

En nuestro modelo, los ensayos de *Wb* realizados con extractos celulares y tumorales mostraron una tendencia hacia una mayor expresión de β -catenina en las líneas resistentes en comparación con las endocrino-sensibles. Este resultado se complementó con ensayos de IHQ, en los que se observó la acumulación de β -catenina en el compartimiento citosólico. Dado que esperábamos también un aumento en la fracción nuclear, evaluamos su expresión mediante *Wb* en extractos nucleares, lo que permitió confirmar tanto su localización como su expresión en las líneas resistentes a mifepristona. Estos datos sugieren que el protocolo de IHQ empleado no fue adecuado para revelar el antígeno en el núcleo.

En conjunto, la localización citosólica y nuclear de β -catenina, junto con el incremento de pLRP6 y DVL2 en las variantes resistentes respecto de las parentales, respalda la activación de la vía de Wnt en el contexto de resistencia a mifepristona.

Evidencias de activación de la vía de Wnt por LMW-FGF2

Las evidencias en células madre embrionarias y neurales demuestran que LMW-FGF2 activa la vía de Wnt principalmente mediante la inducción de la fosforilación de GSK-3 β a través de PI3K, lo que favorece la translocación nuclear de β -catenina y la activación de factores TCF/LEF (Ding et al, 2010; Shimizu et al, 2008). Además, en pez cebra se ha demostrado que las vías de Wnt y FGF2 actúan de manera coordinada para regular la proliferación de células progenitoras (Tang et al, 2019).

En la glándula mamaria normal, el FGF2 ejerce su acción principalmente a través de FGFR1/2 que activa MAPK que inducen la fosforilación de β -catenina, lo que inhibe su ubiquitinación y degradación proteasomal, aumentando su actividad transcripcional y promoviendo la proliferación celular. En este contexto, el FGF2 proviene fundamentalmente del estroma y actúa sobre sus receptores en el epitelio mamario, mientras que β -catenina contribuye a la estabilización de complejos de adhesión mediados por E-cadherina (Dalton, 2013; Fei et al, 2013).

En CM las evidencias son aún limitadas. *Pond* y col. demostraron en modelos murinos y líneas celulares de CM humano que la activación de FGFR1 induce la expresión de múltiples genes blanco de la vía de Wnt/ β -catenina (Pond et al, 2010). Hasta el momento, los estudios sobre la interrelación entre las vías de FGF y Wnt se han centrado principalmente en la actividad de FGF2-LMW a través de FGFR de membrana.

Nuestros resultados, tanto en la línea T47D-LMW como en T47D-HMW, muestran una mayor actividad de la vía de Wnt en comparación con la línea parental. Hasta donde sabemos, esta constituye la primera evidencia de activación de la vía de Wnt mediante isoformas HMW-FGF2. No obstante, debe considerarse que estas células liberan, aunque en niveles muy bajos, LMW-FGF2, lo que podría estar también contribuyendo a la activación de la vía de Wnt.

Parte II- Mecanismo

Crosstalk FGF2–AR–Wnt

Las evidencias que vinculan la vía de AR con la de Wnt provienen principalmente del cáncer de próstata (Cheshire et al, 2002; Li et al, 2025). Uno de los trabajos más emblemáticos demostró una interacción entre β -catenina y AR, en la cual β -catenina potencia la actividad de AR dependiente de ligando. Los autores propusieron que la pérdida de E-cadherina puede incrementar los niveles de β -catenina, lo que contribuiría directamente a la invasividad y a un fenotipo tumoral más agresivo al potenciar la actividad de AR durante la progresión del cáncer de próstata (Yang et al, 2002). Posteriormente, Yang y col. demostraron que el gen de AR está bajo el control transcripcional de LEF-1/TCF (Yang et al, 2006). En base a los sitios descritos en ese trabajo, realizamos ensayos de ChIP para evaluar si alguno de esos sitios en el promotor de AR estaba ocupado por un complejo proteico que incluyera TCF4 y β -catenina, comprobando que al menos dos de ellos permitían la unión de dichas proteínas.

En CM las únicas evidencias disponibles provienen de modelos experimentales triple negativos (Rahim & O'Regan, 2017). En células MDA-MB-453, Ni y col. (Ni et al, 2011) reportaron que el tratamiento con DHT induce el aumento de WNT7B y la activación e interacción nuclear de β -catenina con AR, demostrando una interrelación en sentido inverso, es decir, de AR hacia Wnt.

La interrelación entre las vías de AR y FGF cumple funciones tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Chung et al, 2016). En cáncer, y de manera similar a lo observado para la vía de Wnt, la mayor parte de las evidencias que vinculan AR con FGF provienen de estudios en cáncer de próstata

(Rosini et al, 2002; Zhu & Kyprianou, 2008). En líneas celulares de esta neoplasia, la activación de AR induce la expresión y liberación de FGF2, el cual a su vez, modula la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, favoreciendo la supervivencia celular (Rosini et al, 2002). Nuestros resultados indican que también existe una regulación en sentido inverso, en la que FGF2 induce la expresión de AR. Hasta el momento, aportamos evidencias que sugieren que esta regulación sería indirecta y mediada por la activación de la vía canónica de Wnt.

En este trabajo de tesis establecimos por primera vez una interrelación entre las vías de FGF2, AR y Wnt en CM luminal, aportando una interpretación mecanística para el aumento en la expresión de AR, el cual podría contribuir a la resistencia a la terapia con antiprogestágenos. Nuestros hallazgos posicionan a los inhibidores de las vías de Wnt y AR como potenciales blancos terapéuticos en CM luminal refractario a la terapia endocrina.

Propuesta terapéutica: inhibidores de la vía de Wnt y AR

Clínicamente, niveles elevados de FGF2 se han asociado con enfermedad avanzada y mal pronóstico en múltiples tipos de tumores (Ardizzone et al, 2023; Cuevas et al, 2013). Sin embargo, su papel en el CM sigue siendo controvertido, probablemente debido a la falta de distinción entre la expresión específica de isoformas y la localización subcelular (Faridi et al, 2002; Yiangou et al, 1997). El HMW-FGF2 nuclear se ha vinculado con resistencia terapéutica en contextos de endocrinoterapia, quimioterapia y radioterapia (Ader et al, 2002; Li et al, 2015; Sahores et al, 2018).

Desde el punto de vista terapéutico, la inhibición directa de FGF2/FGFR ha resultado desafiante debido a la toxicidad y a la falta de biomarcadores predictivos (Cerliani et al, 2011; Marin et al, 2024; Piasecka et al, 2016). Nuestro estudio identifica a AR y Wnt como efectores río abajo de FGF2, susceptibles de intervención farmacológica, que se activan de manera consistente en modelos experimentales con expresión nuclear de FGF2. El bloqueo de AR es una estrategia validada en cáncer de próstata (Westaby et al, 2022) y está ganando terreno en CM, particularmente en el subtipo triple negativo AR⁺, con evidencia emergente que respalda su relevancia en tumores luminales (Sridhar et al, 2025).

En estudios previos de nuestro laboratorio, mostramos que la enzalutamida suprimió la proliferación en células resistentes a antiprogestágenos, con alta expresión de AR, dominancia de PRB y sobreexpresión de FGF2. La inhibición de Wnt redujo aún más el crecimiento tumoral, logrando el efecto más potente con el bloqueo dual y disminuyendo la diseminación metastásica (Tesis *Dra. Figueroa*).

Hasta el momento, y a pesar de los efectos antitumorales demostrados en modelos preclínicos (Clevers & Nusse, 2012), no hay inhibidores específicos de la vía de Wnt aprobados por la *Food and Drug Administration* para el tratamiento del cáncer, probablemente debido a que la traslación clínica es compleja dada la extensa interconexión de Wnt con otras vías de señalización y a su papel esencial en la homeostasis de numerosos tejidos (Zhao et al, 2024). Existen ensayos clínicos fase I/II evaluando inhibidores de Wnt en CM (NCT01351103, NCT06856499), incluyendo formas resistentes, aunque la mayoría se centran en subtipos avanzados o TN, combinados con quimioterapia o inmunoterapia para superar resistencias. En CM TN, las estrategias para inhibir la vía de Wnt se fundan principalmente en las evidencias del rol promotor de β -catenina sobre células madre tumorales (Laskar et al, 2025). Dada la importancia clínica de resolver cómo el tratamiento estándar sinergiza de manera efectiva con la inhibición de la vía de Wnt, resulta imprescindible dilucidar el rol de esta vía, incluidos sus diversos componentes, en las diferentes modalidades terapéuticas (Zhao et al, 2024). Los resultados presentados en esta tesis proporcionan una explicación mecanística para el uso de terapias combinadas dirigidas a las vías de señalización de AR y Wnt en CM luminal resistente a la terapia endocrina.

El rol del FGFR según la isoforma de FGF2

En ensayos previos observamos que tanto T47D-LMW como T47D-HMW respondieron al tratamiento con el inhibidor de FGFR, PD173074. Además, en estas líneas la expresión proteica de FGFR1 y FGFR2 se encuentra disminuida (Tesis *Dra. Figueroa*). Se ha reportado que, una vez activados por la unión al ligando, los FGFR se internalizan y son dirigidos hacia su degradación (Figueroa et al, 2019). Más allá de la vía canónica, también se ha descrito la interacción nuclear de FGF2 con otras proteínas, como CK2 y RSK2, que desencadenan respuestas mitogénicas (Bonnet et al, 1996; Soulet et al, 2005). De particular interés, CK2 fosforila a PRB en Ser81, y PRB activo induce la expresión de genes blanco asociados principalmente a la proliferación celular (Hagan et al, 2011). Esto nos permite especular que el complejo FGF2-CK2 podría contribuir a la activación de PRB y a sus efectos transcripcionales posteriores.

Asimismo, se ha demostrado que los FGFR pueden localizarse en el núcleo celular y desempeñar funciones independientes de su actividad tirosina quinasa (Ornitz & Itoh, 2015). Sobre esta base, proponemos que, si bien tanto LMW-FGF2 como HMW-FGF2 son capaces de inducir la proliferación celular, lo harían mediante mecanismos distintos: LMW-FGF2 principalmente a través de FGFR de membrana que incluso podría ejercer acciones nucleares, mientras que HMW-FGF2 actuaría mediante un mecanismo de acción nuclear que podría incluir la interacción con FGFR localizados en el núcleo celular (Cerliani et al, 2011; Porebska et al, 2018).

No obstante, se requieren estudios adicionales para determinar si FGF2 y FGFR forman parte de un mismo complejo en el promotor de genes blanco y para dilucidar el mecanismo específico mediante el cual el FGF2 contribuye a la desregulación de la vía de Wnt.

Parte III- Modelos *in vivo*: vía de AR

Propuesta terapéutica con andrógenos o antiandrógenos: una estrategia condicionada por la presencia de E2

La mayoría de las líneas celulares y de los tumores mamarios humanos requieren la administración exógena de E2 para crecer *in vivo* (Scabia et al, 2022). Este es también el caso de las líneas T47D-YB, T47D-HMW y del PDX 707. *In vitro*, observamos que, en las dos primeras líneas, DHT inducía la proliferación celular; sin embargo, *in vivo* la testosterona redujo el crecimiento tumoral. Dado que esperábamos el efecto opuesto, consideramos la posibilidad de que, al menos en parte, este resultado pudiera deberse a la co-administración de E2. Los ensayos posteriores utilizando la línea T47D-YB en ausencia de E2 exógeno, mostraron un efecto estimulador de la testosterona, lo que sugiere que la acción del andrógeno depende fuertemente del contexto hormonal.

Nuestros resultados se suman a la controversia existente respecto del rol de AR en CM y el uso de agonistas (Hickey et al, 2021; Palmieri et al, 2024; You et al, 2022) o antagonistas androgénicos (D'Amato et al, 2016; De Amicis et al, 2010; Elias et al, 2023; Elias et al, 2024; Kono et al, 2017) como estrategias terapéuticas. A partir de nuestros datos, podría especularse que, en un entorno estrogénico, por ejemplo, en mujeres premenopáusicas, el tratamiento con andrógenos podría resultar beneficioso, mientras que en mujeres postmenopáusicas, donde los niveles de E2 disminuyen drásticamente, el uso de antiandrógenos podría ser potencialmente más eficaz.

Si bien los ensayos *in vivo* presentados en esta tesis aportan información valiosa, presentan ciertas limitaciones derivadas principalmente de restricciones de recursos y tiempo. Una de ellas es que los experimentos realizados en presencia de E2, no utilizaron una única dosis de testosterona, ya que inicialmente exploramos la dosis mínima capaz de generar efectos biológicos, empleando *pellets* entre 5 y 20 mg, un rango que coincide aproximadamente con lo reportado en la bibliografía (Ozten et al, 2019; Song et al, 2017). Posteriormente, seleccionamos la dosis intermedia de 10 mg/kg para continuar con los ensayos en T47D-YB en ausencia de E2 exógeno. Otra limitación es el uso de testosterona en lugar de DHT, dado que la primera puede convertirse en E2 por acción de la enzima aromatasa (Villablanca et al,

2013). Para evitar este inconveniente, algunos autores combinan testosterona con inhibidores de aromatasas (You et al, 2022). En nuestro caso, para confirmar que la vía principalmente activada por la testosterona era la de AR, realizamos un ensayo adicional con DHT y obtuvimos resultados comparables. Asimismo, combinamos el andrógeno con un antiandrógeno (enzalutamida), observándose la inhibición del efecto androgénico. En conjunto, estas evidencias indican que los efectos observados derivan de la activación de la vía del AR.

Parte IV- Muestras humanas

Muestras de pacientes: limitaciones y ventajas

El presente estudio presenta algunas limitaciones. Si bien se incluyeron 225 muestras ER⁺, un tamaño muestral adecuado para análisis exploratorios en estudios observacionales (McShane et al, 2005), al segmentar por subgrupos, estado ganglionar o combinaciones de marcadores, el número de casos se redujo considerablemente, lo que en algunos análisis limitó la capacidad de detectar asociaciones. La determinación de AR se realizó en la mayoría de las muestras; sin embargo, por restricciones de recursos, menos de la mitad de los casos fueron evaluados para FGF2 e incluso menos para WNT4 o WNT6, lo que también restringió la posibilidad de sacar conclusiones sólidas.

En relación con la SG, un posible sesgo deriva del hecho de que no se conoce la causa específica de muerte de las pacientes, por lo que no es posible asegurar que todos los fallecimientos se deban al CM. No obstante, este sesgo se distribuiría de manera similar entre los distintos grupos, por lo que no debería afectar de forma sustancial las conclusiones obtenidas. Asimismo, no se incluyeron datos de sobrevida libre de progresión debido a que, en numerosos casos, la información de seguimiento registrada en las historias clínicas era incompleta.

Una ventaja importante es que los datos provienen de pacientes de nuestra región, la cual suele estar subrepresentada en estudios internacionales. Por lo tanto, este aspecto debe considerarse al comparar nuestros resultados con los de cohortes provenientes de otras regiones. Además, contamos con el valor agregado de disponer del perfil de isoformas de PR (obtenido en el marco de otros proyectos del laboratorio) para la mayoría de las muestras incluidas en este estudio. Hasta donde sabemos, sólo dos grupos han clasificado las muestras mediante *Wb* según el perfil de isoformas de PR (Graham et al, 1995; Hopp et al, 2004), lo que le confiere a nuestra cohorte un carácter particularmente original y valioso.

AR y FGF2 como biomarcadores en subgrupos ER⁺PR⁻ y PRB-H

Los tumores luminales con pérdida de PR o predominio de PRB se asocian con peor pronóstico en comparación con los PR⁺ o predominio de PRA (Diana et al, 2022; Rojas et al, 2017). En esta tesis aportamos por primera vez evidencia de que, en los subgrupos ER⁺PR⁻ y ER⁺PRB-H, los pacientes podrían estratificarse según la coexpresión nuclear de AR y FGF2. También evaluamos la expresión de WNT4 y WNT6 en estos subgrupos y, si bien los resultados no fueron concluyentes, mostraron niveles elevados o tendencias a mayor expresión, especialmente en el subgrupo ER⁺PR⁻ respecto de PRA-H, en concordancia con lo observado para AR y FGF2. Estos hallazgos respaldan las evidencias experimentales presentadas en esta tesis y en trabajos previos del laboratorio (Tesis *Dra. Figueroa*) (Garcia et al, 2020).

Observamos una elevada expresión de AR en los subgrupos ER⁺PR⁻ y ER⁺PRB-H, independientemente de los niveles de FGF2 nuclear. Sin embargo, al analizar el FGF2 nuclear de manera independiente de la expresión de AR, los resultados no fueron concluyentes. Los mayores niveles de FGF2 nuclear detectados por IHQ en las muestras PRB-H respecto de las PRA-H no se reprodujeron en los ensayos de *Wb*, donde incluso se observaron niveles más bajos de LMW-FGF2 en los extractos nucleares PRB-H en comparación con PRA-H.

Estas discrepancias podrían atribuirse a la presencia de células estromales en los extractos utilizados para *Wb*. Dado que en varios tumores observamos expresión nuclear de FGF2 en el estroma (Akl et al, 2016), es posible que este componente haya influido en los resultados obtenidos. En futuros estudios será interesante cuantificar la proporción de estroma y caracterizar específicamente la expresión nuclear de FGF2 en dicho compartimento.

Sobrevida global

Asimismo, analizamos la SG en subgrupos estratificados según la expresión de AR o FGF2. No fue posible realizar estos análisis en las muestras que coexpresaban AR y FGF2 debido a la marcada reducción del número de casos, lo que impidió obtener conclusiones robustas. En línea con nuestra hipótesis, las muestras PRB-H con elevada expresión de AR mostraron una tendencia a una peor SG. En contraste, en las muestras PR⁻ observamos el efecto opuesto. Aprovechando la disponibilidad de datos públicos, realizamos un análisis a nivel de ARNm para este subgrupo, el cual confirmó lo reportado previamente por otros autores (Wang et al, 2024). En conjunto, estos resultados indican que será necesario calcular el tamaño muestral óptimo para obtener conclusiones definitivas. El resultado inesperado observado en el subgrupo ER⁺PR⁻ con alto AR podría deberse a características particulares de las pocas muestras incluidas: dos de las seis pacientes presentaron una SG entre siete y doce meses y, al momento de la

cirugía ambas tenían estadios avanzados (IIIC) y GH 3. Idealmente, con un mayor número de casos, sería posible restringir el análisis a tumores en estadios tempranos y/o con GH bajo o moderados.

Los análisis de SG para FGF2, limitados por el bajo número de muestras, tampoco fueron concluyentes. Además, no fue posible realizar un análisis en bases de datos públicas a nivel de ARNm, ya que estas no discriminan entre isoformas ni localización subcelular. Aun así, observamos una tendencia en los tumores PRA-H a una peor SG en pacientes con niveles bajos de FGF2 nuclear. Estos resultados resaltan la complejidad de la señalización nuclear de FGF2. Podríamos especular que su función nuclear difiere según el contexto: en tumores PRA-H, donde predomina la activación de PR y la inducción de vías proliferativas, frente a tumores PRB-H, caracterizados por niveles bajos de PR total y una activación mayormente ligando-independiente (Diep et al, 2024; Giulianelli et al, 2019; Sahores et al, 2018).

En conjunto, nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que los tumores PRB-H y ER⁺PR⁻ constituyen subgrupos biológicamente distintos dentro del CM luminal, caracterizados por una mayor expresión de AR y FGF2 nuclear junto con una desregulación de la vía de Wnt. Este perfil molecular podría conferir resistencia a terapias estándar y abrir la puerta al uso combinado de inhibidores de AR o Wnt como estrategias terapéuticas dirigidas.

CONCLUSIONES

En esta tesis se integraron experimentos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* con una exploración clínica para analizar la interrelación entre las vías de Wnt y AR en CM luminal, considerando distintos contextos de expresión de isoformas de PR y de FGF2.

Desde el punto de vista mecanístico, aportamos por primera vez evidencias de un *crosstalk* transcripcional entre las vías de AR y Wnt en modelos de CM luminal (PRB-H) resistente a la terapia con mifepristona. Nuestros hallazgos muestran que la actividad nuclear de FGF2, representada principalmente por las isoformas HMW-FGF2, desencadena modificaciones en la expresión y actividad de la vía canónica de Wnt, promoviendo la inducción de la expresión de AR y, en consecuencia, favoreciendo la progresión tumoral. Estos resultados, junto con evidencias experimentales previas sugieren que los tumores luminales refractarios a la terapia endocrina podrían ser susceptibles a estrategias terapéuticas dirigidas simultáneamente a las vías de AR y Wnt.

Asimismo, demostramos que la sobreexpresión de LMH-FGF2 o HMW-FGF2 induce resistencia a mifepristona y altera la expresión de componentes de la vía de Wnt. Sin embargo, sólo la isoforma HMW-FGF2 indujo un aumento de AR en el contexto PRB-H. Esto indica roles diferenciales de las isoformas de FGF2 según el contexto de expresión de PR.

Más importante aún, los estudios en muestras de pacientes revelan que, dentro del subtipo luminal B, los subgrupos ER⁺PR⁻ y PRB-H, que corresponden a los de peor pronóstico clínico, presentan niveles elevados de AR y FGF2 nuclear. No obstante, será necesario ampliar la cohorte para confirmar su valor como marcadores pronósticos.

En conjunto, este trabajo pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos de resistencia a la terapia endocrina y posiciona al FGF2 nuclear como un regulador clave de vías que impulsan la progresión tumoral. Por lo tanto, esta tesis contribuye al conocimiento de los procesos que contribuyen a la progresión del CM luminal y plantea, como perspectiva futura, el desarrollo de terapias combinadas dirigidas a AR y Wnt en tumores con expresión nuclear de FGF2.

APÉNDICE

ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR

Medios y soluciones

Medio de cultivo base: DMEM/F12 sin rojo fenol (*Sigma-Aldrich*), suplementado con bicarbonato de sodio 1,2 g/l y sulfato de gentamicina 50 mg/l (receta magistral). Se preparó según indicaciones del fabricante, con H₂O destilada estéril y posterior filtración (0,22 µm).

Suero fetal bovino (SFB; *Natocor*, Argentina): inactivado a 56 °C durante 30 min.

Medio de mantenimiento: DMEM/F12 con 10 % SFB e insulina 1 nM (*Denver*, Argentina).

SFB adsorbido en carbón-dextrano (SFBch): SFB tratado con carbón activado al 5 % (*Mallinckrodt*), centrifugado, filtrado (0,1 µm), fraccionado en tubos de 15 ml y almacenado a –20 °C.

Tripsina-EDTA: tripsina 0,25 % (*Gibco*) y EDTA 0,2 % (Laboratorios *Cicarelli*) en PBS 1X, esterilizada por filtración (0,1 µm); almacenada a –20 °C.

Medio de congelación: SFB al 90 % (*Natocor*) y DMSO al 10 % (*Sintorgan*).

Ensayos de proliferación celular

Las células se trataron con las drogas detalladas a continuación:

	Droga	Marca	Concentración
Antiandrógenos	flutamida	<i>Sigma-Aldrich</i>	0.01, 0.1, 1 y 10 µM
	enzalutamida	<i>MedChem Express</i>	1 y 10 µM
	AZD-3514	<i>AstraZeneca</i>	1 y 10 µM
Andrógeno	5α-Dihidrotestosterona (DHT)	<i>Sigma Aldrich</i>	0.01, 0.1, 1 y 10 µM
Inhibidores de la vía de Wnt	LGK-974	<i>MedChem Express</i>	0.5 y 1 µM
	ICG-001	<i>MedChem Express</i>	0.5 y 1 µM

Tabla ap-1: Agonistas, antagonistas e inhibidores utilizados en los ensayos *in vitro* de proliferación celular.

ENSAYOS DE Wb

Soluciones

Buffers de extracción de proteínas:

- *Buffer A*: Tris, EDTA y $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.
- *Buffer RIPA*: Tris pH 7,5, NaCl, vanadato de sodio, deoxicolato de sodio, SDS e Igepal CA-630, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa.

Cuantificación de proteínas:

- Proteínas totales cuantificadas con Pierce BCA *Protein Assay Kit*.

Soluciones para SDS-PAGE:

- Solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%.
- *Buffers* Tris-HCl 1,0 M pH 6,8 y 1,5 M pH 8,8.
- SDS al 10%.
- Persulfato de amonio (APS) al 10%.
- *Buffer* de corrida 10X (Tris, glicina, SDS).
- *Buffer* de transferencia: *buffer* de corrida 1X y metanol (20%).

Buffers de lavado y bloqueo:

- TBS 10X pH 7,4 y TBS-T (TBS con 0,1% Tween-20).
- Soluciones de bloqueo: leche descremada al 5% en TBS-T o BSA al 5% en PBS 1X.

Otros reactivos:

- *Cracking buffer* 4X: SDS, β -mercaptoetanol, glicerol, Tris-HCl y azul de bromo fenol.
- Marcador de peso molecular: *PageRuler pre-stained molecular ladder*.
- Membrana de nitrocelulosa: *Hybond-C*, 0,45 μm .
- Sustrato quimioluminiscente: luminol/ácido cúmarico y H_2O_2 en *buffer* Tris pH 8,8.

ENSAYOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA

Soluciones

- PBS 10X sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y NaCl (*Anedra*); utilizado diluido 1X.
- *Buffer* citrato 10 mM pH 6 para recaptura antigénica (Laboratorios *Cicarelli*).
- Inhibición de peroxidasa: H_2O_2 al 1 % (10 volúmenes, *Parafarm*) en etanol 70 %.

Fijadores y permeabilizantes: paraformaldehído al 4 % en PBS 1X (*Sigma-Aldrich*); etanol 70 % (Laboratorios *Cicarelli*); Tritón X-100 0,25 % en metanol o PBS (*Anedra*).

Bloqueo: IHQ, BSA 2,5 % en PBS 1X (*Sigma-Aldrich*); IF, SFB 10 % en PBS 1X.

Medios de montaje: IHQ, DPX (*Sigma-Aldrich*); IF, Vectashield (*Vector Labs*).

ANTICUERPOS PRIMARIOS

Anticuerpo	Marca y Catálogo	Especie	Técnica (Dilución)
AR	<i>Abcam</i> , ab74272	Conejo	Wb (1:1000)
AR	<i>Cell Signaling</i> , 5153S	Conejo	IHQ (1:100)
ER	<i>Santa Cruz</i> , sc-543	Conejo	Wb (1:500)
ER	<i>Abcam</i> , ab108398	Conejo	Wb (1:1000)
ERK	<i>Santa Cruz</i> , sc-94	Conejo	Wb (1:1000)
FGF2	<i>Santa Cruz</i> , 147 sc-79	Conejo	Wb (1:500), IF (1:100), IHQ (1:100)
GAPDH	<i>Cell Signaling</i> , #2118	Conejo	Wb (1:10000)
Ki-67	<i>Abcam</i> , #78[SP6]	Conejo	IHQ (1:1000)
PR	<i>Santa Cruz</i> , H-190 sc-7208	Conejo	Wb (1:500)
PR	<i>Cell Signaling</i> , 13736	Conejo	Wb (1:500)
PR	<i>Cell Signaling</i> , #8757	Ratón	Wb (1:500)
LRP6	<i>Cell Signaling</i> , #3395	Ratón	Wb (1:500)
pLRP6	<i>Cell Signaling</i> , Ser1490, #2568	Ratón	Wb (1:500)
WNT4	<i>Santa Cruz</i> , B-6 sc-376279	Conejo	Wb (1:500), IHQ (1:100)
WNT6	<i>Abcam</i> , ab50030	Ratón	Wb (1:500)
DVL2	<i>Cell Signaling</i> , #3224	Ratón	Wb (1:500)
DVL3	<i>Cell Signaling</i> , #3218	Ratón	Wb (1:500)
AXIN1	<i>Cell Signaling</i> , C76H11, #2087	Ratón	Wb (1:500)
NAKED2	<i>Cell Signaling</i> , #2073	Ratón	Wb (1:500)
GSK-3 β	<i>Cell Signaling</i> , #9332	Ratón	Wb (1:500), IHQ (1:200)
pGSK-3 β	<i>Cell Signaling</i> , #5558P	Ratón	IHQ (1:200)
TCF4	<i>Abcam</i> , ab-217668	Conejo	ChIP(1:250)
β -tubulina	<i>Sigma-Aldrich</i> , #T0198 clone D66	Ratón	Wb (1:10000)
β -actina	<i>Cell Signaling</i> , #4967	Ratón	Wb (1:500)

β -catenina	<i>Santa Cruz</i> , sc-133238	Conejo	Wb (1:500), ChIP (1:250)
Vinculina	<i>Cell Signaling</i> , #13901	Ratón	Wb (1:500)

Tabla ap-2: Anticuerpos primarios utilizados en Wb, IF, IHQ y ChIP. Los anticuerpos se diluyeron en TBS 1X para Wb y en PBS 1X para IF e IHQ.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Anticuerpo	Marca	Técnica (Dilución)
Anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa	<i>Vector Laboratories</i> (PI-2000)	Wb (1:2000)
Anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa	<i>Vector Laboratories</i> (PI-1000)	Wb (1:2000)
Anti-IgG de conejo conjugado a IRDye 800CW	LI-COR (<i>Goat anti-Rabbit</i> , 926-32211)	Wb ($\lambda \approx 800$ nm; 1:20 000)
Anti-IgG de ratón conjugado a IRDye 680RD	LI-COR (<i>Goat anti-Mouse</i> , 926-68070)	Wb ($\lambda \approx 680$ nm; 1:20 000)
Anti-IgG de conejo biotinilado	<i>Vector Laboratories</i> (BA-1000)	IHQ (1:400)
Anti-IgG de ratón biotinilado	<i>Vector Laboratories</i> (BA-9200)	IHQ (1:400)

Tabla ap-3: Anticuerpos secundarios utilizados en Wb, IF e IHQ. Los anticuerpos se diluyeron en TBS 1X para Wb y en PBS 1X para IHQ.

BIBLIOGRAFÍA

Abreu de Oliveira WA, El Laithy Y, Bruna A, Annibali D, Lluís F (2022) Wnt Signaling in the Breast: From Development to Disease. *Front Cell Dev Biol.* 10: 884467

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(42):6471-9

Akl MR, Nagpal P, Ayoub NM, Tai B, Prabhu SA, Capac CM, Gliksman M, Goy A, Suh KS (2016) Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. *Oncotarget.* 7(28):44735-44762

Ali S, Coombes RC (2000) Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 5(3):271-81

Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP (2017) The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 67: 93-99

Ardizzone A, Bova V, Casili G, Repici A, Lanza M, Giuffrida R, Colarossi C, Mare M, Cuzzocrea S, Esposito E, Paterniti I (2023) Role of Basic Fibroblast Growth Factor in Cancer: Biological Activity, Targeted Therapies, and Prognostic Value. *Cells.* 12(7):1002

Arpino G, Green SJ, Allred DC, Lew D, Martino S, Osborne CK, Elledge RM (2004) HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. *Clin Cancer Res.* 10(17): 5670-6

Atawia IM, Kushwaha PP, Verma S, Lin S, Shankar E, Abdel-Gawad O, Gupta S (2023) Inhibition of Wnt/beta-catenin pathway overcomes therapeutic resistance to abiraterone in castration-resistant prostate cancer. *Mol Carcinog.* 62(9): 1312-1324

Aupperlee MD, Smith KT, Kariagina A, Haslam SZ (2005) Progesterone Receptor Isoforms A and B: Temporal and Spatial Differences in Expression During Murine Mammary Gland Development. *Endocrinology.* 146(8):3577-88

Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, Scotti L, Jenab M, Turati F, Pasquali E, Pelucchi C, Galeone C, Bellocco R, Negri E, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C (2015) Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer.* 112(3): 580-93

Baran K, Skrzynska K, Czyrek AA, Wittek A, Krowarsch D, Szlachcic A, Zakrzewska M, Chudzian J (2025) Fibroblast Growth Factors in Lung Development and Regeneration: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Cells*. 14(16):1256

Belov AA, Mohammadi M (2013) Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5(6):a015958

Bianchini G, Gianni L (2014) The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol*. 15(2): e58-68

Bidard FC, Kaklamani VG, Neven P, Streich G, Montero AJ, Forget F, Mouret-Reynier MA, Sohn JH, Taylor D, Harnden KK, Khong H, Kocsis J, Dalenc F, Dillon PM, Babu S, Waters S, Deleu I, Garcia Saenz JA, Bria E, Cazzaniga M, Lu J, Aftimos P, Cortes J, Liu S, Tonini G, Laurent D, Habboubi N, Conlan MG, Bardia A (2022) Elacestrant (oral selective estrogen receptor degrader) Versus Standard Endocrine Therapy for Estrogen Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III EMERALD Trial. *J Clin Oncol*. 40(28): 3246-3256

Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, Coussens LM, Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Hedrick CC, Vonderheide RH, Pittet MJ, Jain RK, Zou W, Howcroft TK, Woodhouse EC, Weinberg RA, Krummel MF (2018) Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 24(5): 541-550

Bjornstrom L, Sjoberg M (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*. 19(4): 833-42

Bonnet H, Filhol O, Truchet I, Brethenou P, Cochet C, Amalric F, Bouche G (1996) Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin. *J Biol Chem*. 271(40): 24781-7

Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A (2024) Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 74(3): 229-263

Briskin C (2002) Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 7(1): 39-48

Brody JG, Rudel RA (2003) Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect*. 111(8): 1007-19

Bronte G, Rocca A, Ravaioli S, Puccetti M, Tumedei MM, Scarpi E, Andreis D, Maltoni R, Sarti S, Ceconetto L, Fedeli A, Pietri E, De Simone V, Asioli S, Amadori D, Bravaccini S (2018) Androgen receptor

in advanced breast cancer: is it useful to predict the efficacy of anti-estrogen therapy? *BMC Cancer*. 18(1): 348

Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C (2012) Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One*. 7(12): e51862

Burstein HJ, Lacchetti C, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KA, Giordano SH, Hudis CA, Solky AJ, Stearns V, Winer EP, Griggs JJ (2019) Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 37(5): 423-438

Campodonico F, Foppiani L, Campodonico V, Introini C (2024) Practical implications of androgen receptor inhibitors for prostate cancer treatment. *Explor Target Antitumor Ther*. 5(3): 543-550

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(10): 3720-31

Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 149(6): 1192-205

Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, Cittelly DM, Howe EN, D'Amato NC, Spoelstra NS, Edgerton SM, Jean A, Guerrero J, Gomez F, Medicherla S, Alfaro IE, McCullagh E, Jedlicka P, Torkko KC, Thor AD, Elias AD, Protter AA, Richer JK (2014) Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res*. 16(1): R7

Colditz GA, Bohlke K (2014) Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA Cancer J Clin*. 64(3): 186-94

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(11): e80761

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C (2001) Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 358(9291): 1389-99

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C (2012) Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 13(1): 1141-51

Conte C, Riant E, Toutain C, Pujol F, Arnal JF, Lenfant F, Prats AC (2008) FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1alpha. *PLoS One*. 3(8): e3078

Cortes J, Rugo HS, Cescon DW, Im SA, Yusof MM, Gallardo C, Lipatov O, Barrios CH, Perez-Garcia J, Iwata H, Masuda N, Torregroza Otero M, Gokmen E, Loi S, Guo Z, Zhou X, Karantza V, Pan W, Schmid P, Investigators K- (2022) Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 387(3): 217-226

Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC (2009) Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(33): 13820-5

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(4): 1400-10

Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Graf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S, Group M, Langerod A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Borresen-Dale AL, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C, Aparicio S (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 486(7403): 346-52

Chaudhury S, Aurbach EL, Sharma V, Blandino P, Jr., Turner CA, Watson SJ, Akil H (2014) FGF2 is a target and a trigger of epigenetic mechanisms associated with differences in emotionality: partnership with H3K9me3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(32): 11834-9

Chen Q, Yang B, Liu X, Zhang XD, Zhang L, Liu T (2022) Histone acetyltransferases CBP/p300 in tumorigenesis and CBP/p300 inhibitors as promising novel anticancer agents. *Theranostics*. 12(11): 4935-4948

Chen R, Yu Y, Dong X (2017) Progesterone receptor in the prostate: A potential suppressor for benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 166: 91-96

Chen Y, Guo Y, Ge X, Itoh H, Watanabe A, Fujiwara T, Kodama T, Aburatani H (2006) Elevated expression and potential roles of human Sp5, a member of Sp transcription factor family, in human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 340(3): 758-66

Chesire DR, Ewing CM, Gage WR, Isaacs WB (2002) In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis. *Oncogene*. 21(17): 2679-94

Chung WC, Linscott ML, Rodriguez KM, Stewart CE (2016) The Regulation and Function of Fibroblast Growth Factor 8 and Its Function during Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Development. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 5:7: 114

D'Amato NC, Gordon MA, Babbs B, Spoelstra NS, Carson Butterfield KT, Torkko KC, Phan VT, Barton VN, Rogers TJ, Sartorius CA, Elias A, Gertz J, Jacobsen BM, Richer JK (2016) Cooperative Dynamics of AR and ER Activity in Breast Cancer. *Mol Cancer Res*. 14(11): 1054-1067

Dai C, Ellisen LW (2023) Revisiting Androgen Receptor Signaling in Breast Cancer. *Oncologist*. 28(5):383-391

Dalton S (2013) Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 25(2):241-6

Dart DA, Waxman J, Aboagye EO, Bevan CL (2013) Visualising androgen receptor activity in male and female mice. *PLoS One*. 8(8): e71694

De Amicis F, Thirugnansampanthan J, Cui Y, Selever J, Beyer A, Parra I, Weigel NL, Herynk MH, Tsimelzon A, Lewis MT, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Ando S, Fuqua SA (2010) Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 121(1): 1-11

De Melo Gagliato D, A CB, Perez-Garcia JM, Llombart A, Cortes J (2020) CDK4/6 Inhibitors in Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: Current Practice and Knowledge. *Cancers (Basel)*. 12(9):2480

Dean M (2009) ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 14(1): 3-9

Diana A, Carlino F, Buono G, Antoniol G, Famiglietti V, De Angelis C, Carrano S, Piccolo A, De Vita F, Ciardiello F, Daniele B, Arpino G, Orditura M (2022) Prognostic Relevance of Progesterone Receptor Levels in Early Luminal-Like HER2 Negative Breast Cancer Subtypes: A Retrospective Analysis. *Front Oncol*. 12:813462

Diaz Bessone MI, Gattas MJ, Laporte T, Tanaka M, Simian M (2019) The Tumor Microenvironment as a Regulator of Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Front Endocrinol*. 8:10: 547

Diep CH, Spartz A, Truong TH, Dwyer AR, El-Ashry D, Lange CA (2024) Progesterone Receptor Signaling Promotes Cancer Associated Fibroblast Mediated Tumorigenicity in ER+ Breast Cancer. *Endocrinology*. 165(9):bqae092

Ding VM, Ling L, Natarajan S, Yap MG, Cool SM, Choo AB (2010) FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3beta signaling. *J Cell Physiol*. 225(2): 417-28

Elias AD, Spoelstra NS, Staley AW, Sams S, Crump LS, Vidal GA, Borges VF, Kabos P, Diamond JR, Shagisultanova E, Afghahi A, Mayordomo J, McSpadden T, Crawford G, D'Alessandro A, Zolman KL, van Bokhoven A, Zhuang Y, Gallagher RI, Wulfkuhle JD, Petricoin Iii EF, Gao D, Richer JK (2023) Phase II trial of fulvestrant plus enzalutamide in ER+/HER2- advanced breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 9(1): 41

Elias AD, Staley AW, Fornier M, Vidal GA, Alami V, Sams S, Spoelstra NS, Goodspeed A, Kabos P, Diamond JR, Shagisultanova E, Gallagher RI, Wulfkuhle JD, Petricoin EF, Zolman KL, McSpadden T, Jordan KR, Slansky JE, Borges VF, Gao D, Richer JK (2024) Clinical and immune responses to neoadjuvant fulvestrant with or without enzalutamide in ER+/Her2- breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 10: 88

Endo Y, Wolf V, Muraiso K, Kamijo K, Soon L, Uren A, Barshishat-Kupper M, Rubin JS (2005) Wnt-3a-dependent cell motility involves RhoA activation and is specifically regulated by dishevelled-2. *J Biol Chem*. 280(1): 777-86

Faridi A, Rudlowski C, Biesterfeld S, Schuh S, Rath W, Schroder W (2002) Long-term follow-up and prognostic significance of angiogenic basic fibroblast growth factor (bFGF) expression in patients with breast cancer. *Pathol Res Pract*. 198(1): 1-5

Fei Y, Gronowicz G, Hurley MM (2013) Fibroblast growth factor-2, bone homeostasis and fracture repair. *Curr Pharm Des*. 19(19): 3354-63

Feng J, Meng X (2022) Histone modification and histone modification-targeted anti-cancer drugs in breast cancer: Fundamentals and beyond. *Front Pharmacol*. 15:13: 946811

Figuerola V, Rodriguez MS, Lanari C, Lamb CA (2019) Nuclear action of FGF members in endocrine-related tissues and cancer: Interplay with steroid receptor pathways. *Steroids*. 152: 108492

Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im SA, Gelmon K, Harbeck N, Lipatov ON, Walshe JM, Moulder S, Gauthier E, Lu DR, Randolph S, Dieras V, Slamon DJ (2016) Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 375(20): 1925-1936

Fodde R, Brabletz T (2007) Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol*. 19(2): 150-8

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010) Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 363(20): 1938-48

Fu D, Huang J, Li K, Chen Y, He Y, Sun Y, Guo Y, Du L, Qu Q, Miao Y, Hu Z (2021) Dihydrotestosterone-induced hair regrowth inhibition by activating androgen receptor in C57BL6 mice simulates androgenetic alopecia. *Biomed Pharmacother*. 137: 111247

Fu Y, Wang Z, Luo C, Wang Y, Wang Y, Zhong X, Zheng H (2020) Downregulation of CXXC Finger Protein 4 Leads to a Tamoxifen-resistant Phenotype in Breast Cancer Cells Through Activation of the Wnt/beta-catenin Pathway. *Transl Oncol.* 13(2): 423-440

Galton DA (1950) Androgen therapy in 70 cases of advanced mammary carcinoma. *Br J Cancer.* 4(1): 20-58

Garcia-Martinez L, Zhang Y, Nakata Y, Chan HL, Morey L (2021) Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. *Nature communications.* 12: 1786

Garcia X, Elia A, Galizzi L, May M, Spengler E, Martinez Vazquez P, Burruchaga J, Gass H, Lanari C, Lamb CA (2020) Increased androgen receptor expression in estrogen receptor-positive/progesterone receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 180(1): 257-263

Gellersen B, Brosens JJ (2014) Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev.* 35(6): 851-905

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(6): R1036-50

Giovannelli P, Di Donato M, Galasso G, Di Zazzo E, Bilancio A, Migliaccio A (2018) The Androgen Receptor in Breast Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 28:9: 492

Giulianelli S, Lamb CA, Lanari C (2021) Progesterone receptors in normal breast development and breast cancer. *Essays Biochem.* 65(6):951-969

Giulianelli S, Molinolo A, Lanari C (2013) Targeting progesterone receptors in breast cancer. *Vitam Horm.* 93: 161-84

Giulianelli S, Riggio M, Guillardoy T, Perez Pinero C, Gorostiaga MA, Sequeira G, Pataccini G, Abascal MF, Toledo MF, Jacobsen BM, Guerreiro AC, Barros A, Novaro V, Monteiro FL, Amado F, Gass H, Abba M, Helguero LA, Lanari C (2019) FGF2 induces breast cancer growth through ligand-independent activation and recruitment of ERalpha and PRBDelta4 isoform to MYC regulatory sequences. *Int J Cancer.* 145(7):1874-1888

Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Flockhart DA, Desta Z, Perez EA, Ingle JN (2005) Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol.* 23(36): 9312-8

Goetz R, Mohammadi M (2013) Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(3): 166-80

Gonzalez-Sancho JM, Brennan KR, Castelo-Soccio LA, Brown AM (2004) Wnt proteins induce dishevelled phosphorylation via an LRP5/6- independent mechanism, irrespective of their ability to stabilize beta-catenin. *Mol Cell Biol.* 24(11): 4757-68

Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL (1995) Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 55(21): 5063-8

Groenewald W, Lund AH, Gay DM (2023) The Role of WNT Pathway Mutations in Cancer Development and an Overview of Therapeutic Options. *Cells.* 12(7):990

Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Perrot-Applanat M, Milgrom E (1994) Cytoplasmic-nuclear trafficking of progesterone receptor. In vivo study of the mechanism of action of antiprogestins. *BiochemPharmacol.* 47(1): 21-4

Hagan CR, Regan TM, Dressing GE, Lange CA (2011) ck2-dependent phosphorylation of progesterone receptors (PR) on Ser81 regulates PR-B isoform-specific target gene expression in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 31(12): 2439-52

Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET (2005) Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res.* 65(17): 7554-60

He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, Li B (2021) Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 6(1): 425

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 87(3): 905-31

Hickey TE, Selth LA, Chia KM, Laven-Law G, Milioli HH, Roden D, Jindal S, Hui M, Finlay-Schultz J, Ebrahimie E, Birrell SN, Stelloo S, Iggo R, Alexandrou S, Caldon CE, Abdel-Fatah TM, Ellis IO, Zwart W, Palmieri C, Sartorius CA, Swarbrick A, Lim E, Carroll JS, Tilley WD (2021) The androgen receptor is a tumor suppressor in estrogen receptor-positive breast cancer. *Nature Medicine.* 27: 310-320

Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, Fuqua SA (2004) Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res.* 10(8): 2751-60

Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, Campone M, Blackwell KL, Andre F, Winer EP, Janni W, Verma S, Conte P, Arteaga CL, Cameron DA, Petrakova K, Hart LL, Villanueva C, Chan A, Jakobsen E, Nusch A, Burdaeva O, Grischke EM, Alba E, Wist E, Marschner N, Favret AM, Yardley D, Bachelot T, Tseng LM, Blau S, Xuan F, Souami F, Miller M, Germa C, Hirawat S, O'Shaughnessy J (2016) Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 375(18): 1738-1748

Hou Y, Zhao Z, Li P, Cao Y, Zhang Y, Guo C, Nie X, Hou J (2024) Combination therapies with Wnt signaling inhibition: A better choice for prostate cancer treatment. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 1879(6): 189186

Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F (2009) Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature.* 461: 614-620

Incassati A, Chandramouli A, Eelkema R, Cowin P (2010) Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: β -catenin. *Breast Cancer Res.* 12(6): 213

Inskip PD, Robison LL, Stovall M, Smith SA, Hammond S, Mertens AC, Whitton JA, Diller L, Kenney L, Donaldson SS, Meadows AT, Neglia JP (2009) Radiation dose and breast cancer risk in the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol.* 27(24): 3901-7

Jacobsen BM, Horwitz KB (2012) Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol.* 357(1-2): 18-29

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(31): 27793-800

Jena MK, Khan FB, Ali SA, Abdullah A, Sharma AK, Yadav V, Kancharla S, Kolli P, Mandadapu G, Sahoo AK, Rath PK, Taneera J, Kumar S, Mohanty AK, Goh KW, Ming LC, Ardianto C (2023) Molecular complexity of mammary glands development: a review of lactogenic differentiation in epithelial cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 51(1): 491-508

Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, Brown M, Schiff R (2015) ESR1 mutations-a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 12(10): 573-83

Jimeno A, Gordon M, Chugh R, Messersmith W, Mendelson D, Dupont J, Stagg R, Kapoun AM, Xu L, Uttamsingh S, Brachmann RK, Smith DC (2017) A First-in-Human Phase I Study of the Anticancer Stem

Cell Agent Ipafricept (OMP-54F28), a Decoy Receptor for Wnt Ligands, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 23(24): 7490-7497

Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ (2017) Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Res.* 19(1): 118

Jones V, Yin HH, Yuan YC, Wang Y, Li SM, Aljaber D, Sanchez A, Quinones C, Schmolze D, Yuan Y, Mortimer J, Yee L, Kruper L, Jovanovic-Taliman T, Tomsic J, Sanchez N, Chavez T, O'Regan RM, Khan QJ, Davis M, Kalinsky K, Meisel J, Kittles R, Rodriguez-Rodriguez L, Seewaldt V (2025) Gene expression associated with endocrine therapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. *Sci Rep.* 15(1): 7220

Jung YS, Park JI (2020) Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond beta-catenin and the destruction complex. *Exp Mol Med.* 52(2): 183-191

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(5): 659-70

Kim J, Harper A, McCormack V, Sung H, Houssami N, Morgan E, Mutebi M, Garvey G, Soerjomataram I, Fidler-Benaoudia MM (2025) Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. *Nat Med.* 31(4): 1154-1162

Kimura K, Kanto T, Shimoda S, Harada K, Kimura M, Nishikawa K, Imamura J, Ogawa E, Saio M, Ikura Y, Okusaka T, Inoue K, Ishikawa T, Ieiri I, Kishimoto J, Todaka K, Kamisawa T (2022) Safety, tolerability, and anti-fibrotic efficacy of the CBP/beta-catenin inhibitor PRI-724 in patients with hepatitis C and B virus-induced liver cirrhosis: An investigator-initiated, open-label, non-randomised, multicentre, phase 1/2a study. *EBioMedicine.* 80: 104069

Kohn AD, Moon RT (2005) Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium.* 38(3-4): 439-446

Kono M, Fujii T, Lim B, Karuturi MS, Tripathy D, Ueno NT (2017) Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol.* 3(9): 1266-1273

Koval A, Katanaev VL (2018) Dramatic dysbalancing of the Wnt pathway in breast cancers. *Scientific reports.* 8: 7329

Kuchenbaecker KB, McGuffog L, Barrowdale D, Lee A, Soucy P, Dennis J, Domchek SM, Robson M, Spurdle AB, Ramus SJ, Mavaddat N, Terry MB, Neuhausen SL, Schmutzler RK, Simard J, Pharoah PDP, Offit K, Couch FJ, Chenevix-Trench G, Easton DF, Antoniou AC (2017) Evaluation of Polygenic Risk Scores for Breast and Ovarian Cancer Risk Prediction in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *J Natl Cancer Inst.* 109(7):djw302

Kumar R, Litwack G (2009) Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids*. 74(12): 877-83

Lallous N, Dalal K, Cherkasov A, Rennie PS (2013) Targeting alternative sites on the androgen receptor to treat castration-resistant prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 14(6): 12496-519

Lamb R, Ablett MP, Spence K, Landberg G, Sims AH, Clarke RB (2013) Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. *PloS One*. 8(7): e67811

Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(3): 178-96

Lanari C, Lamb C, Fabris V, Helguero L, Soldati R, Bottino M, Giulianelli S, Cerliani J, Wargon V, Molinolo A (2009) The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 16(2):333-50

Lanari C, Molinolo A (2002) Progesterone receptors--animal models and cell signalling in breast cancer. Diverse activation pathways for the progesterone receptor: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Res*. 4(6):240-3

Laskar TT, Laskar HM, Mazumder JA, Bhattacharjee R, Husain MI, Das B, Das P, Choudhury PD, Arora M, Borah S, Chakraborty D, Chakraborty P, Das A (2025) Decoding breast cancer: insights into molecular pathways & therapeutic approaches. *Discov Oncol*. 16(1): 2103

Lau T, Chan E, Callow M, Waaler J, Boggs J, Blake RA, Magnuson S, Sambrone A, Schutten M, Firestein R, Machon O, Korinek V, Choo E, Diaz D, Merchant M, Polakis P, Holsworth DD, Krauss S, Costa M (2013) A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth. *Cancer Res*. 73(10): 3132-44

Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, International Agency for Research on Cancer Handbook Working G (2016) Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 375(8): 794-8

Lavery DN, McEwan IJ (2005) Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J*. 391(Pt 3): 449-64

Le PN, McDermott JD, Jimeno A (2015) Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol Ther*. 146: 1-11

Lee E, Madar A, David G, Garabedian MJ, Dasgupta R, Logan SK (2013) Inhibition of androgen receptor and beta-catenin activity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(39): 15710-5

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 121(7): 2750-67

Li C, Cheng D, Li P (2025) Androgen receptor dynamics in prostate cancer: from disease progression to treatment resistance. *Front Oncol*. **15**: 1542811

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(1): 91

Liao S, Bodmer J, Pietras D, Azhar M, Doetschman T, Schultz Jel J (2009) Biological functions of the low and high molecular weight protein isoforms of fibroblast growth factor-2 in cardiovascular development and disease. *Dev Dyn*. 238(2): 249-64

Liu CC, Prior J, Piwnica-Worms D, Bu G (2010) LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(11): 5136-41

Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, Kasibhatla S, Schuller AG, Li AG, Cheng D, Li J, Tompkins C, Pferdekamper A, Steffy A, Cheng J, Kowal C, Phung V, Guo G, Wang Y, Graham MP, Flynn S, Brenner JC, Li C, Villarreal MC, Schultz PG, Wu X, McNamara P, Sellers WR, Petruzzelli L, Boral AL, Seidel HM, McLaughlin ME, Che J, Carey TE, Vanasse G, Harris JL (2013) Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(50): 20224-9

Liu S, Wicha MS (2010) Targeting breast cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 28(25): 4006-12

Louie MC, Sevigny MB (2017) Steroid hormone receptors as prognostic markers in breast cancer. *Am J Cancer Res*. 7(8): 1617-1636

Luo J, Wang D, Wan X, Xu Y, Lu Y, Kong Z, Li D, Gu W, Wang C, Li Y, Ji C, Gu S, Xu Y (2020) Crosstalk Between AR and Wnt Signaling Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer Growth. *Onco Targets Ther*. 13: 9257-9267

Macacu A, Autier P, Boniol M, Boyle P (2015) Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 154(2): 213-24

MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 17(1): 9-26

Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E (2007) A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 148(8): 3781-91

Marin A, Morales F, Walbaum B (2024) Fibroblast growth factor receptor signaling in estrogen receptor-positive breast cancer: mechanisms and role in endocrine resistance. *Front Oncol*. 14: 1406951

McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, Statistics Subcommittee of the NCI EWGoCD (2005) Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst*. 97(16): 1180-4

Merikhian P, Eisavand MR, Farahmand L (2021) Triple-negative breast cancer: understanding Wnt signaling in drug resistance. *Cancer Cell Int*. 21: 419

Michmerhuizen AR, Spratt DE, Pierce LJ, Speers CW (2020) Are we there yet? Understanding androgen receptor signaling in breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 6: 47

Miller TW, Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, Higham C, Garcia-Echeverria C, Shyr Y, Arteaga CL (2010) Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J Clin Invest*. 120(7): 2406-13

Mucaki EJ, Baranova K, Pham HQ, Rezaeian I, Angelov D, Ngom A, Rueda L, Rogan PK (2016) Predicting Outcomes of Hormone and Chemotherapy in the Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium (METABRIC) Study by Biochemically-inspired Machine Learning. *F1000Res*. 5: 2124

Murthy RK, Loi S, Okines A, Paplomata E, Hamilton E, Hurvitz SA, Lin NU, Borges V, Abramson V, Anders C, Bedard PL, Oliveira M, Jakobsen E, Bachelot T, Shachar SS, Muller V, Braga S, Duhoux FP, Greil R, Cameron D, Carey LA, Curigliano G, Gelmon K, Hortobagyi G, Krop I, Loibl S, Pegram M, Slamon D, Palanca-Wessels MC, Walker L, Feng W, Winer EP (2020) Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 382(7): 597-609

Musgrove EA, Sutherland RL (2009) Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*. 9: 631-643

Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, Imai Y, Rimm DL, Liu XS, Brown M (2011) Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell*. 20(1): 119-31

Nilsson S, Gustafsson JA (2011) Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther*. 89(1): 44-55

Nusse R, Clevers H (2017) Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 169(6): 985-999

Ornitz DM, Itoh N (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 4(3): 215-66

Osborne CK, Schiff R (2011) Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*. 62: 233-47

Oskarsson T, Batlle E, Massague J (2014) Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell*. 14(3): 306-21

Ozten N, Vega K, Liehr J, Huang X, Horton L, Cavalieri EL, Rogan EG, Bosland MC (2019) Role of Estrogen in Androgen-Induced Prostate Carcinogenesis in NBL Rats. *Horm Cancer*. 10(2-3): 77-88

Palmieri C, Linden H, Birrell SN, Wheelwright S, Lim E, Schwartzberg LS, Dwyer AR, Hickey TE, Rugo HS, Cobb P, O'Shaughnessy JA, Johnston S, Brufsky A, Tilley WD, Overmoyer B (2024) Activity and safety of enobosarm, a novel, oral, selective androgen receptor modulator, in androgen receptor-positive, oestrogen receptor-positive, and HER2-negative advanced breast cancer (Study G200802): a randomised, open-label, multicentre, multinational, parallel design, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 25(3): 317-325

Pankotai-Bodo G, Olah-Nemeth O, Sukosd F, Pankotai T (2024) Routine molecular applications and recent advances in breast cancer diagnostics. *J Biotechnol*. 380: 20-28

Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, Osipo C, Golde T, Osborne B, Miele L (2010) Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. 16(12): 3141-52

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 27(8): 1160-7

Pataccini G, Elia A, Sequeira G, Ambrosio L, Coianis M, Lamb CA, Rojas PA, Martinez Vazquez P, Burruchaga J, Spengler E, Vanzulli SI, Abba M, Lanari C (2025) Steroid hormone receptors, exome sequencing and treatment responsiveness of breast cancer patient-derived xenografts originated in a South American country. *Sci Rep*. 15(1): 2415

Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S, Bernard L, Viale G, Pelicci PG, Di Fiore PP (2010) Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell*. 140(1): 62-73

Pencheva N, Tavazoie SF (2013) Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nat Cell Biol.* 15: 546-554

Perry JM, He XC, Sugimura R, Grindley JC, Haug JS, Ding S, Li L (2011) Cooperation between both Wnt/beta-catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion. *Genes Dev.* 25(18): 1928-42

Piasecka D, Kitowska K, Czaplinska D, Mieczkowski K, Mieszkowska M, Turczyk L, Skladanowski AC, Zaczek AJ, Biernat W, Kordek R, Romanska HM, Sadej R (2016) Fibroblast growth factor signalling induces loss of progesterone receptor in breast cancer cells. *Oncotarget.* 7(52): 86011-86025

Pohl SG, Brook N, Agostino M, Arfuso F, Kumar AP, Dharmarajan A (2017) Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis.* 6(4): e310

Pond AC, Herschkowitz JI, Schwertfeger KL, Welm B, Zhang Y, York B, Cardiff RD, Hilsenbeck S, Perou CM, Creighton CJ, Lloyd RE, Rosen JM (2010) Fibroblast growth factor receptor signaling dramatically accelerates tumorigenesis and enhances oncoprotein translation in the mouse mammary tumor virus-Wnt-1 mouse model of breast cancer. *Cancer Res.* 70(12): 4868-79

Porebska N, Latko M, Kucinska M, Zakrzewska M, Otlewski J, Opalinski L (2018) Targeting Cellular Trafficking of Fibroblast Growth Factor Receptors as a Strategy for Selective Cancer Treatment. *J Clin Med.* 8(1):7

Qin K, Yu M, Fan J, Wang H, Zhao P, Zhao G, Zeng W, Chen C, Wang Y, Wang A, Schwartz Z, Hong J, Song L, Wagstaff W, Haydon RC, Luu HH, Ho SH, Strelzow J, Reid RR, He TC, Shi LL (2024) Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. *Genes Dis.* 11(1): 103-134

Rahim B, O'Regan R (2017) AR Signaling in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 9(3):21

Ravaioli S, Maltoni R, Pasculli B, Parrella P, Giudetti AM, Vergara D, Tumedei MM, Pirini F, Bravaccini S (2022) Androgen receptor in breast cancer: The "5W" questions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 13: 977331

Rexer BN, Arteaga CL (2012) Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications. *Crit Rev Oncog.* 17(1): 1-16

Riggs BL, Hartmann LC (2003) Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med.* 348(7): 618-29

Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N, Armstrong A, Wu W, Goessl C, Runswick S, Conte P (2017) Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 377(6): 523-533

Rodgers SJ, Mitchell CA, Ooms LM (2023) The mechanisms of class 1A PI3K and Wnt/beta-catenin coupled signaling in breast cancer. *Biochem Soc Trans*. 51(4): 1459-1472

Rodon J, Argiles G, Connolly RM, Vaishampayan U, de Jonge M, Garralda E, Giannakis M, Smith DC, Dobson JR, McLaughlin ME, Seroutou A, Ji Y, Morawiak J, Moody SE, Janku F (2021) Phase 1 study of single-agent WNT974, a first-in-class Porcupine inhibitor, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer*. 125(1): 28-37

Rojas PA, May M, Sequeira GR, Elia A, Alvarez M, Martinez P, Gonzalez P, Hewitt S, He X, Perou CM, Molinolo A, Gibbons L, Abba MC, Gass H, Lanari C (2017) Progesterone Receptor Isoform Ratio: A Breast Cancer Prognostic and Predictive Factor for Antiprogesterin Responsiveness. *J Natl Cancer Inst* 109 (7):djw317

Roncati L, Manenti A, Pusioli T, Piscioli F, Barbolini G, Maiorana A (2016) Testosterone Aromatization to Estradiol in Course of Ovarian Functioning Brenner Tumor Associated With Endometrial Carcinoma and Endometriosis (Roncati-Manenti Triad). *Int J Gynecol Cancer*. 26(8): 1461-4

Rosini P, Bonaccorsi L, Baldi E, Chiasserini C, Forti G, De Chiara G, Lucibello M, Mongiat M, Iozzo RV, Garaci E, Cozzolino F, Torcia MG (2002) Androgen receptor expression induces FGF2, FGF-binding protein production, and FGF2 release in prostate carcinoma cells: role of FGF2 in growth, survival, and androgen receptor down-modulation. *Prostate*. 53(4): 310-21

Saha S, Dey S, Nath S (2021) Steroid Hormone Receptors: Links With Cell Cycle Machinery and Breast Cancer Progression. *Front Oncol*. 11: 620214

Sahores A, Figueroa V, May M, Liguori M, Rubstein A, Fuentes C, Jacobsen BM, Elia A, Rojas P, Sequeira GR, Alvarez MM, Gonzalez P, Gass H, Hewitt S, Molinolo A, Lanari C, Lamb CA (2018) Increased High Molecular Weight FGF2 in Endocrine-Resistant Breast Cancer. *Horm Cancer*. 9(5):338–348.

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(5): e64049

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(3): 287-99

Sathyamoorthy N, Lange CA (2020) Progesterone and Breast Cancer: an NCI Workshop Report. *Horm Cancer*. 11(1):1-12

Scabia V, Ayyanan A, De Martino F, Agnoletto A, Battista L, Laszlo C, Treboux A, Zaman K, Stravodimou A, Jallut D, Fiche M, Bucher P, Ambrosini G, Sflomos G, Briskin C (2022) Estrogen receptor positive breast cancers have patient specific hormone sensitivities and rely on progesterone receptor. *Nat Commun.* 13(1): 3127

Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kummel S, Bergh J, Denkert C, Park YH, Hui R, Harbeck N, Takahashi M, Foukakis T, Fasching PA, Cardoso F, Untch M, Jia L, Karantza V, Zhao J, Aktan G, Dent R, O'Shaughnessy J, Investigators K- (2020) Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 382(9): 810-821

Shimizu T, Kagawa T, Inoue T, Nonaka A, Takada S, Aburatani H, Taga T (2008) Stabilized beta-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Biol.* 28(24): 7427-41

Simons M, Mlodzik M (2008) Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet.* 42: 517-540

Singhal H, Greene ME, Zarnke AL, Laine M, Al Abosy R, Chang YF, Dembo AG, Schoenfelt K, Vadhi R, Qiu X, Rao P, Santhamma B, Nair HB, Nickisch KJ, Long HW, Becker L, Brown M, Greene GL (2018) Progesterone receptor isoforms, agonists and antagonists differentially reprogram estrogen signaling. *Oncotarget.* 9(4): 4282-4300

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 344(11): 783-92

Slepicka PF, Somasundara AVH, Dos Santos CO (2021) The molecular basis of mammary gland development and epithelial differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* 114: 93-112

Song W, Soni V, Soni S, Khera M (2017) Testosterone inhibits the growth of prostate cancer xenografts in nude mice. *BMC Cancer.* 17(1): 635

Soulet F, Bailly K, Roga S, Lavigne AC, Amalric F, Bouche G (2005) Exogenously added fibroblast growth factor 2 (FGF-2) to NIH3T3 cells interacts with nuclear ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) in a cell cycle-dependent manner. *J Biol Chem.* 280(27): 25604-10

Sridhar N, Iwase T, Xie X, Lee J, Damodaran S, Ueno NT (2025) Paving the path ForwARd: Advances and challenges in androgen receptor targeting in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 138: 102958

Steinhart Z, Angers S (2018) Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development.* 145(11): dev146589.

Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Heeson S, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Cortes J, Group CS (2015) Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 372(8): 724-34

Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, Lazar AJ, Morris EA, Sahin A, Salgado R, Sapino A, Sasano H, Schnitt S, Sotiriou C, van Diest P, White VA, Lokuhetty D, Cree IA, Board WHOCOTE (2020) The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology.* 77(2): 181-185

Tang D, He Y, Li W, Li H (2019) Wnt/ β -catenin interacts with the FGF pathway to promote proliferation and regenerative cell proliferation in the zebrafish lateral line neuromast. *Experimental & molecular medicine.* 51: 1-16

Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, Wongvipat J, Smith-Jones PM, Yoo D, Kwon A, Wasielewska T, Welsbie D, Chen CD, Higano CS, Beer TM, Hung DT, Scher HI, Jung ME, Sawyers CL (2009) Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science.* 324(5928): 787-90

Trevino LS, Weigel NL (2013) Phosphorylation: a fundamental regulator of steroid receptor action. *Trends Endocrinol Metab.* 24(10): 515-24

Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolar Z (2006) Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology.* 73(5): 213-23

Turner N, Grose R (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 10(2): 116-29

Valenta T, Hausmann G, Basler K (2012) The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J.* 31(12): 2714-36

Villablanca AC, Tetali S, Altman R, Ng KF, Rutledge JC (2013) Testosterone-derived estradiol production by male endothelium is robust and dependent on p450 aromatase via estrogen receptor alpha. *Springerplus.* 2(1): 214

Waddell AR, Huang H, Liao D (2021) CBP/p300: Critical Co-Activators for Nuclear Steroid Hormone Receptors and Emerging Therapeutic Targets in Prostate and Breast Cancers. *Cancers (Basel).* 13 (12):2872.

Wan X, Liu J, Lu JF, Tzelepi V, Yang J, Starbuck MW, Diao L, Wang J, Efsthathiou E, Vazquez ES, Troncoso P, Maity SN, Navone NM (2012) Activation of β -catenin signaling in androgen receptor-negative prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 18(3): 726-36

Wang DD, Jiang LH, Zhang J, Chen X, Zhou HL, Zhong SL, Zhang HD (2024) Androgen receptor expression and clinical characteristics in breast cancer. *World J Surg Oncol*. 22(1): 243

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 antiprogestin 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(11): 2680-92

Watson PA, Arora VK, Sawyers CL (2015) Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 15(12): 701-11

Westaby D, Fenor de La Maza MLD, Paschalis A, Jimenez-Vacas JM, Welti J, de Bono J, Sharp A (2022) A New Old Target: Androgen Receptor Signaling and Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 62: 131-153

Willnow TE, Nykjaer A (2010) Cellular uptake of steroid carrier proteins--mechanisms and implications. *Mol Cell Endocrinol*. 316(1): 93-102

Won HS, Lee KM, Oh JE, Nam EM, Lee KE (2016) Inhibition of beta-Catenin to Overcome Endocrine Resistance in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cell Line. *PloS One*. 11(5): e0155983

Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B, Sun Z (2002) Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *J Biol Chem*. 277(13): 11336-44

Yang X, Chen MW, Terry S, Vacherot F, Bemis DL, Capodice J, Kitajewski J, de la Taille A, Benson MC, Guo Y, Buttyan R (2006) Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells. *Oncogene*. 25(24): 3436-44

Yasuda MT, Sakakibara H, Shimoi K (2017) Estrogen- and stress-induced DNA damage in breast cancer and chemoprevention with dietary flavonoid. *Genes Environ*. 39: 10

Yersal O, Barutca S (2014) Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 5(3): 412-24

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(1): 28-33

Yin P, Wang W, Zhang Z, Bai Y, Gao J, Zhao C (2018) Wnt signaling in human and mouse breast cancer: Focusing on Wnt ligands, receptors and antagonists. *Cancer Sci*. 109(11): 3368-3375

You CP, Tsoi H, Man EPS, Leung MH, Khoo US (2022) Modulating the Activity of Androgen Receptor for Treating Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 23(23):15342

Yu QC, Verheyen EM, Zeng YA (2016) Mammary Development and Breast Cancer: A Wnt Perspective. *Cancers* (Basel). 8(7):65

Yuan J, Yang L, Li Z, Zhang H, Wang Q, Huang J, Wang B, Mohan CD, Sethi G, Wang G (2023) The role of the tumor microenvironment in endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive breast cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 14: 1261283

Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 36(11): 1461-1473

Zhang Y, Ji Y, Liu S, Li J, Wu J, Jin Q, Liu X, Duan H, Feng Z, Liu Y, Zhang Y, Lyu Z, Song F, Song F, Yang L, Liu H, Huang Y (2025) Global burden of female breast cancer: new estimates in 2022, temporal trend and future projections up to 2050 based on the latest release from GLOBOCAN. *J Natl Cancer Cent.* 5(3): 287-296

Zhao X, Ma Y, Luo J, Xu K, Tian P, Lu C, Song J (2024) Blocking the WNT/ β -catenin pathway in cancer treatment: pharmacological targets and drug therapeutic potential. *Heliyon.* 10(16): e35989

Zhu ML, Kyprianou N (2008) Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 15(4): 841-9