



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGIA

“Efecto del Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2) sobre la capacidad proliferativa y migratoria de la línea tumoral MDA-MB-231, proveniente de cáncer de mama.”

TESIS

Que para obtener el título de:

LICIENCIADO EN BIOMEDICINA

Presenta:

José Antonio Hernández Ortiz

Director de tesis:

DC Eduardo Monjaraz Guzmán

Puebla, Pue. Junio de 2016

Índice

ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
Características generales del cáncer	5
ANTECEDENTES.....	7
Estadísticas sobre el cáncer a nivel mundial.....	8
Cáncer en México	11
Cáncer de mama.....	12
Factores de riesgo para el cáncer de mama	16
Estructura de la mama	17
Tipos de cáncer en la mama	18
Cáncer metastásico.....	18
Transición Epitelio-Mesénquima (TEM).....	20
Tipos de Transición Epitelio-Mesénquima.....	20
Marcadores moleculares de la TEM.....	21
Factores inductores de la TEM.....	23
Factores de transcripción asociados a la TEM.....	23
Snail	24
Twist.....	25
Zeb	26
Factores de crecimiento	27
Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGFs).....	27
Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2).....	31
FGFRs.....	33
FGFR1.....	35
Vías de señalización	35
Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)	40
Regulación de VEGF.....	41
Factor Inducible de Hipoxia-1 (HIF-1)	42

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
HIPÓTESIS	46
OBJETIVOS	48
General.....	49
Específicos	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	50
Línea celular MDA-MB-231	51
Cultivo celular.....	51
Método de tinción celular.....	52
Ensayo de migración	53
Ensayo de cierre de herida.....	53
Ensayo en cámara Transwell	53
Ensayo de proliferación	54
Ensayo de expresión génica	54
Extracción de ARN	54
Cuantificación de ARN	55
RT-PCR.....	55
Electroforesis.....	58
Densitometría	59
Análisis de datos	59
RESULTADOS	60
DISCUSIÓN	76
CONCLUSIONES.....	81
BIBLIOGRAFÍA	83

Abreviaturas

ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNT	Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos
bHLH-PAS	Dominio hélice-bucle-hélice básico-Per-ARNT-Sim
bp	Pares de bases de nucleótidos
BRCA1	Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1
BRCA2	Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 2
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CDH1	Gen de E-cadherina 1
CENAPRECE	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
CONAPO	Consejo Nacional de Población
CRKL	Proteína similar a CRK
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
FGF2	Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico
FGFR1	Receptor 1 a FGF
FGFRS1	Sustrato 1 de FGFR
FGFRS2	Sustrato 2 de FGFR
FSP-1	Proteína Específica de Fibroblastos 1
GAB1	Proteína de unión asociada a GRB2 1
GC	Guanina-Citosina
GR	Glu/Arg (Glutamina/Arginina)

GRB2	Proteína 2 de Unión al Receptor de Factores de Crecimiento
GSK3β	Glucógeno sintasa cinasa 3 β
HER2	Receptor 2 de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
HIF-1α	Subunidad 1 α del Factor Inducible de Hipoxia
HRE	Elemento responsivo a hipoxia
HSPG	Proteoglicanos de heparán sulfato
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
Ig	Inmunoglobulina
IL-6	Interleucina 6
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MDA-MB-231	M.D. Anderson-metastatic breast-231
MMP	Metaloproteinasa de matriz extracelular
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
ng	Nanogramos
NLS	Secuencias de Localización Nuclear
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
p53	Proteína supresora de tumores
PBS	Buffer fosfato salino
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKC	Proteincinasa C

PLCy	Fosfolipasa Cy
pM	Picomolar
PM	Marcador de peso molecular
RSK2	Proteína S6 cinasa ribosomal p90
RTEF1	Factor Potenciador Relacionadas a la Transcripción 1
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa
S100A13	Proteína S100 de unión de calcio A13
SFB	Suero fetal bovino
SH2	Dominio homólogo a Src2
SMA-α	Actina de músculo liso α
SOS	Son of Sevenless
Sp1	Proteína específica 1
Src	Proteína tirosincinasa protooncogénica
SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia
STATs	Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción
TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante- β
Tyr	Tirosina
UA	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
VEGF-A	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial A
VHL	Proteína von Hippel–Lindau
Zeb	Proteína de dedos de zinc de unión a E-box
μL	Microlitros

Resumen

Actualmente el cáncer de mama constituye un gran problema de salud a nivel mundial siendo el más frecuente entre la población femenina. En México representa la segunda causa de mortalidad en las mujeres de 20 años y más. A pesar de que no se dispone de datos 100% confiables a nivel nacional sobre la prevalencia e incidencia de esta enfermedad, las estimaciones publicadas señalan que cada año se detectan entre 18 mil y 20 mil nuevos casos y un alto porcentaje llega a etapas avanzadas. Sin embargo, la falta de acceso a la detección temprana también sugiere que existe un gran cúmulo de casos no detectados.

El proceso de metástasis es uno de los aspectos más críticos ya que favorece un pronóstico poco favorable. Un alto porcentaje de la mortalidad asociada al cáncer de mama es debida a la diseminación de células tumorales hacia sitios distantes del organismo, proceso en el cual la Transición Epitelio-Mesénquima juega un papel muy importante. Se ha descrito que es a través de este mecanismo mediante el cual las células tumorales adquieren las características que les permiten proliferar, invadir y realizar metástasis hacia otros tejidos.

Una amplia gama de moléculas de señalización están implicadas en la regulación de este proceso tal es el caso del Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2) el cual actúa a través de la unión a sus receptores de tipo tirosincinasa, principalmente FGFR1. Este factor de crecimiento es producido por diversos tipos celulares incluyendo las células tumorales donde se ha visto que promueve la proliferación, migración e invasión celular así como el proceso de angiogénesis.

Sin embargo, su papel resulta controversial dependiendo de la etapa durante la progresión tumoral así como el tipo de cáncer por lo que este trabajo de investigación tiene como propósito esclarecer el papel de este factor de crecimiento en el mantenimiento del fenotipo maligno de la línea tumoral MDA-MB-231 proveniente de cáncer de mama altamente invasivo. Los resultados obtenidos muestran que FGF2 juega un papel importante en la regulación de la capacidad migratoria, induciendo un incremento significativo de manera dosis-dependiente y que es debida a la participación de los factores de transcripción *Snail2* y *Zeb1* mostrando un aumento en la expresión a nivel de ARNm inducido por el

tratamiento con 600 pM FGF2 el cual es dependiente de la duración del estímulo. A su vez, el conteo celular muestra que el FGF2 exógeno exacerba la capacidad proliferativa en un 21.4%. Por otro lado, la evidencia mostrada sugiere la participación de FGF2 en el establecimiento de un microambiente favorable para el desarrollo tumoral, mediante la producción de factores angiogénicos como lo es el VEGF-A mostrando niveles elevados en el ARNm que lo codifica entre las primeras 6 del tratamiento. Dicho incremento es independiente de la regulación de HIF-1 y correlaciona con el aumento en los niveles de expresión de IL-6, pudiendo actuar como una molécula intermediaria en la señalización de FGF2.

De esta manera, los resultados mostrados en este trabajo de investigación demuestran que FGF2 participa de manera importante en el mantenimiento del fenotipo mesenquimal de la línea celular MDA-MB-231.

Introducción

Características generales del cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cáncer es un término genérico empleado para designar a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Otros términos también utilizados son los de “tumores malignos” y “neoplasias malignas”. Existen más de 100 tipos de cáncer, los cuales se denominan dependiendo de la parte del cuerpo donde inicia su desarrollo (OMS, 2015).

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células malignas, las cuales se extienden más allá de sus límites normales y pueden invadir sitios adyacentes o diseminarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis (OMS, 2015).

Durante el desarrollo del cáncer, las células denominadas “normales” se ven transformadas progresivamente en células malignas mediante la acumulación de diversos cambios a nivel genético y la adquisición de características específicas que han sido designadas como “*marcadores del cáncer*”. Cuatro de estas señales de identidad: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, evasión de la apoptosis y potencial de replicación ilimitado contribuyen a la proliferación descontrolada de células malignas. Las células también adquieren la capacidad de invadir el tejido adyacente, normalmente metastatizar a órganos distantes, así como una sostenida angiogénesis para acceder a los nutrientes y el oxígeno y así promover el crecimiento del tumor. Además, se han propuesto características adicionales como la evasión de la vigilancia inmune, un mejorado metabolismo anabólico, inestabilidad genómica, entre otras (figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2000; Wesche y cols., 2011).



Figura 1. Marcadores del cáncer. Diversas investigaciones sobre el cáncer han sugerido que estas características son comunes durante el desarrollo de prácticamente todos los tipos de tumores malignos (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

Antecedentes

Estadísticas sobre el cáncer a nivel mundial

En 2012 (año más reciente del que se cuenta con información disponible), la incidencia de cáncer a nivel mundial se elevó a 14 millones de casos nuevos por año, una cifra que se espera que aumente a 22 millones al año en las próximas dos décadas. Durante el mismo período, se prevé que las muertes por cáncer aumenten de 8.2 millones al año a un estimado de 13 millones por año (IARC, 2014; CDC, 2015).

Los tipos de cáncer mayormente diagnosticados a nivel mundial en 2012 fueron: cáncer pulmonar (13% de todos los cánceres diagnosticados; 1.8 millones de personas), cáncer mamario (12% de todos los cánceres diagnosticados; 1.7 millones de personas), cáncer colorrectal (10% de todos los cánceres diagnosticados; 1.4 millones de personas), cáncer prostático (8% de todos los cánceres diagnosticados; 1.1 millones de personas), cáncer gástrico (7% de todos los cánceres diagnosticados; 952 mil personas), cáncer hepático (6% de todos los cánceres diagnosticados; 782 mil personas), cáncer cervicouterino (4% de todos los cánceres diagnosticados; 528 mil personas) (figura 2) (IARC, 2014; CDC, 2015).

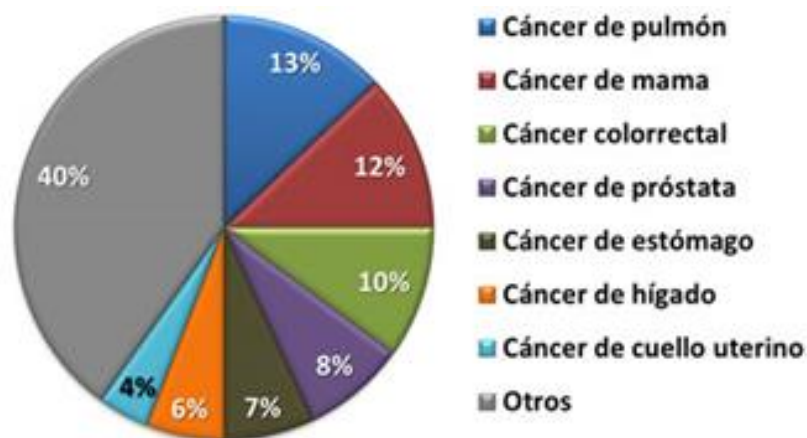


Figura 2. Los cánceres más comunes en el mundo en 2012 para ambos sexos. El cáncer de pulmón encabeza la lista con el 13% (1.8 millones de casos) seguido del cáncer de mama con el 12% (1.7 millones de casos). Juntos representan la cuarta parte del total de incidencia de todos los tipos de cáncer durante ese período (GLOBOCAN 2012).

De los diferentes tipos de cáncer, los que presentaron una mayor tasa de mortalidad a nivel mundial en 2012 fueron: cáncer de pulmón (19% de todas las muertes por cáncer; 1.6 millones de personas), cáncer de hígado (9% de todas las muertes por cáncer; 745 mil personas), cáncer de estómago (9% de todas las muertes por cáncer; 723 mil personas), cáncer colorrectal (9% de todas las muertes por cáncer; 694 mil personas), cáncer de mama (6% de todas las muertes por cáncer; 522 mil personas), cáncer de esófago (5% de todas las muertes por cáncer; 400 5 personas) y cáncer de páncreas (4% de todas las muertes por cáncer; 330 mil personas). Estos datos se resumen en la figura 3 (IARC, 2014; CDC, 2015).

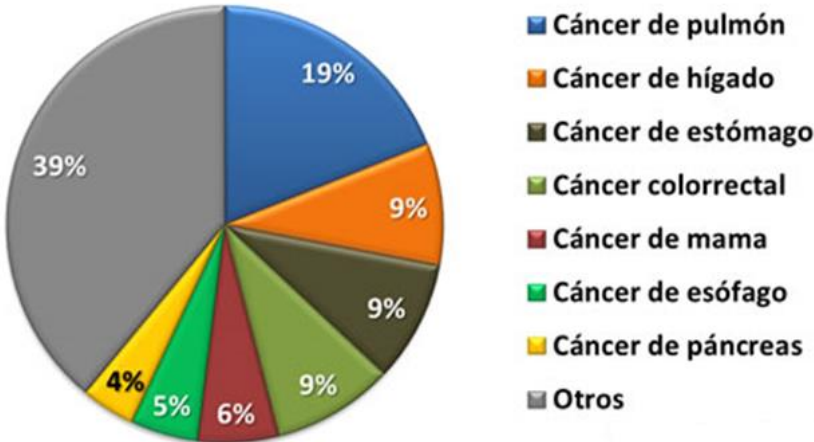


Figura 3. Causas más comunes de muerte por cáncer en el mundo en 2012. Los datos muestran los valores correspondientes para ambos sexos (GLOBOCAN 2012).

Sin embargo, los índices de morbilidad y mortalidad de los diversos tipos de cáncer varían según el sexo, la edad, la raza, la ubicación geográfica e incluso las condiciones socioeconómicas entre otros muchos más factores que pueden determinar el desarrollo de esta enfermedad en la población.

Como consecuencia del crecimiento y envejecimiento de la población, los países en desarrollo se ven afectados por el creciente número de cánceres. Un alto porcentaje de los nuevos casos anuales de cáncer en el mundo se producen en los países de bajos y medianos ingresos de África, Asia, América Central y Sudamérica, con un total de 8 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012 (57% del total global). Estas regiones representan alrededor del 65% de las

muertes por cáncer en el mundo (figura 4), una situación que se agrava por la falta de detección precoz y el acceso al tratamiento (IARC, 2014; CDC, 2015).

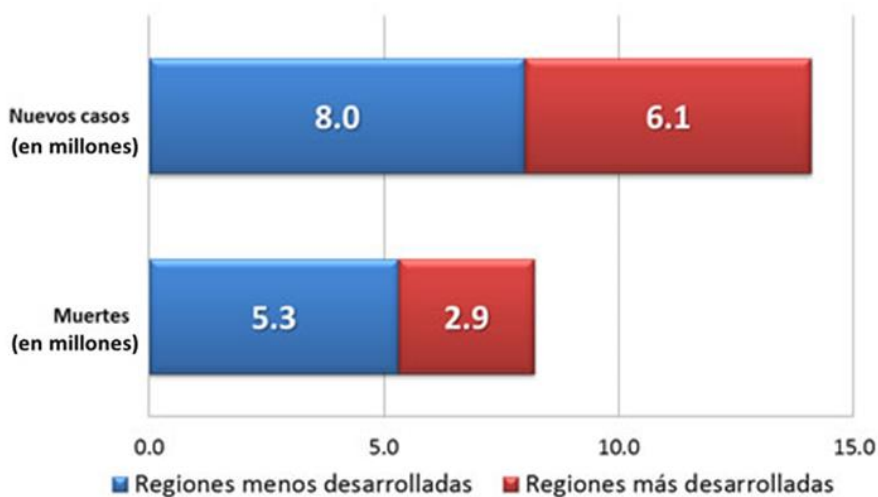


Figura 4. Número de casos y muertes por cáncer en el mundo en 2012 según el nivel de desarrollo (en millones). Durante 2012, la incidencia de cáncer a nivel mundial alcanzó un valor de 14 millones de casos nuevos por año de los cuales el 57% (8 millones) corresponde a las regiones de bajos y medianos ingresos de África, Asia, América Central y Sudamérica. A su vez, durante el mismo período, se registraron 8.2 millones de muertes de las cuales el 65% (5.3 millones) ocurrieron en las mismas regiones (GLOBOCAN 2012).

Cáncer en México

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es un padecimiento de alta incidencia y se ubica como la tercera causa de muerte sólo después de la diabetes y de las enfermedades hipertensivas. Se estima que cada año se detectan 128 mil nuevos casos (Secretaría de Salud (SSA), Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS), 2013).

De acuerdo con las cifras de mortalidad registradas por el INEGI, en 2013 el 12.8% del total de defunciones se debió a algún tumor y de estas, el 93.4% fueron por tumores malignos. En total, fallecieron 78 mil 582 personas a causa de alguno de los 100 tipos de cáncer que se conocen (INEGI, 2015).

En los hombres de más de 20 años el principal tipo de cáncer se presenta en los órganos digestivos (24%), seguido de tumores en genitales (12.2%), siendo el de próstata el más frecuente. Por otro lado, en las mujeres de más de 20 años de edad el cáncer más frecuente es el de mama, que corresponde al 30% de todos los casos. En segundo lugar se ubica el cáncer de órganos genitales (16.7 %), principalmente el cervicouterino (INEGI, 2015).

Del total de tumores malignos en la población de 20 años y más, los de órganos digestivos son la primera causa de mortalidad entre esta población en 2013, con 32.52 casos por cada 100 mil habitantes; los tumores de órganos respiratorios e intratorácicos ocupan el segundo sitio (10.58 defunciones por cada 100 mil habitantes); en tercer lugar se ubican los tumores del sistema reproductor masculino con 8.44 defunciones por cada 100 mil habitantes. Considerando este último dato y que entre las mujeres el cáncer de mama aparece como segunda causa de mortalidad con 14 defunciones por cada 100 mil, se confirma que las muertes por tumores malignos muestran un comportamiento diferenciado por sexo. Esta información se presenta de forma detallada en la tabla de la figura 5 (INEGI, 2015).

Principales tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos digestivos	32.52	33.98	31.20
Órganos respiratorios e intratorácicos	10.58	14.71	6.83
Sistema reproductor masculino	8.44	17.75	NA
Mama ¹	7.59	0.14	14.36
Órganos genitales femeninos	6.78	NA	12.93
Órganos hematopoyéticos ²	5.68	6.28	5.14
Vías urinarias ²	4.12	5.51	2.85
Células germinales (testículo u ovario) ¹	3.48	1.30	5.46

Figura 5. Tasa de mortalidad de los principales tumores malignos en la población de 20 años y más por cada 100 mil habitantes para cada sexo en 2013. ¹Para los hombres, el cáncer de mama y tumor de testículo no son una de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación. ²Para las mujeres, el cáncer en órganos hematopoyéticos y de vías urinarias no son de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación. **NA** No aplicable. (INEGI (2015). Estadísticas de Mortalidad . Cubos dinámicos; y CONAPO (2015). Proyecciones de la Población 2010-2050. Proceso INEGI.)

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor frecuencia en las mujeres a nivel mundial. La OMS reporta que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad. La incidencia es muy variable en todo el mundo, pero es en los países de bajos ingresos donde ocurre la mayoría de los decesos, ya que generalmente el diagnóstico se realiza en fases avanzadas de la enfermedad, debido a la falta de acceso a servicios de salud y a la poca sensibilización para la detección precoz (figura 7) (OMS, 2015).

En México, el cáncer de mama es el más frecuente en la población femenina. De 2007 a 2014 la incidencia de este tipo de cáncer ha aumentado de manera importante (figura 6) y el comportamiento sigue el patrón internacional en el sentido de que es una enfermedad que se incrementa con la edad y los casos nuevos se presentan primordialmente en mujeres mayores de 40 años, durante la menopausia o posmenopausia (figura 7) (INEGI, 2015).



Figura 6. Incidencia de tumor maligno de mama por cada 100 mil mujeres de 20 años y más. Serie anual de 2007 a 2014. Durante 2013, el cáncer de mama fue la principal causa de morbilidad hospitalaria entre los tumores malignos para la población mexicana de 20 años y más (18.7 %); tres de cada diez mujeres fueron hospitalizadas por dicha causa. Esta tendencia se mantuvo a la alza, siendo 2014 el año en el que se presentó la incidencia más alta, con 28.75 casos nuevos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más (Para 2007 a 2009: SSA, CENAPRECE (2014). Anuarios de Morbilidad 1984-2014; y CONAPO (2008). Proyecciones de la Población de México 2005-2050. Procesó INEGI. Para 2010 a 2014: SSA, CENAPRECE (2014). Anuarios de Morbilidad 1984-2014; y CONAPO (2014). Proyecciones de la Población 2010-2050. Procesó INEGI (Modificado)).

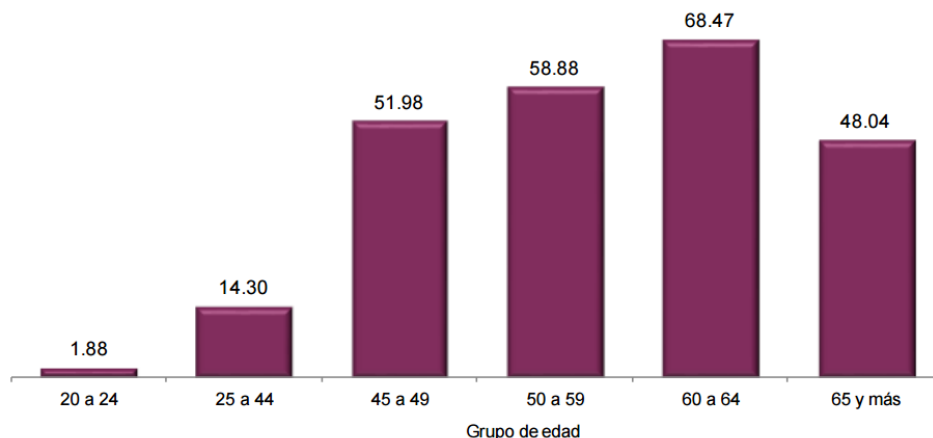


Figura 7. Incidencia de tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más, por grupo de edad en 2014. (Por 100 mil mujeres de cada grupo de edad). Durante 2014, se observó un aumento en los casos nuevos de tumores malignos de mama hasta antes de los 64 años conforme se incrementa la edad de la mujer, siendo en el grupo de 60 a 64 años donde se concentra el mayor número de casos nuevos (68 por cada 100 mil mujeres de ese grupo de edad). Asimismo, destaca el incremento que se da a partir de los 45 años, ya que la incidencia pasa de 14.30 (por cada 100 mil mujeres de 25 a 44 años) a 51.98 (en las del grupo de 45 a 49 años) (SSA, CENAPRECE (2014). Anuarios de Morbilidad 1984-2014; y CONAPO (2014). Proyecciones de la Población 2010-2050. Procesó INEGI. Nota: se excluyen los casos con edad no especificada).

Cabe señalar que la incidencia no es homogénea a lo largo de todo el territorio nacional. En 2013 los estados con el mayor número de casos nuevos registrados fueron Campeche (117.15 casos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más), Colima (94.24 de cada 100 mil), Aguascalientes (63.33 de cada 100 mil) y Veracruz (62.36 de cada 100 mil). Por el contrario, Guerrero, Nayarit y Ciudad de México, con 8.77, 9.15 y 10.76 casos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más, respectivamente, fueron los de menor incidencia (figura 8) (INEGI, 2015).

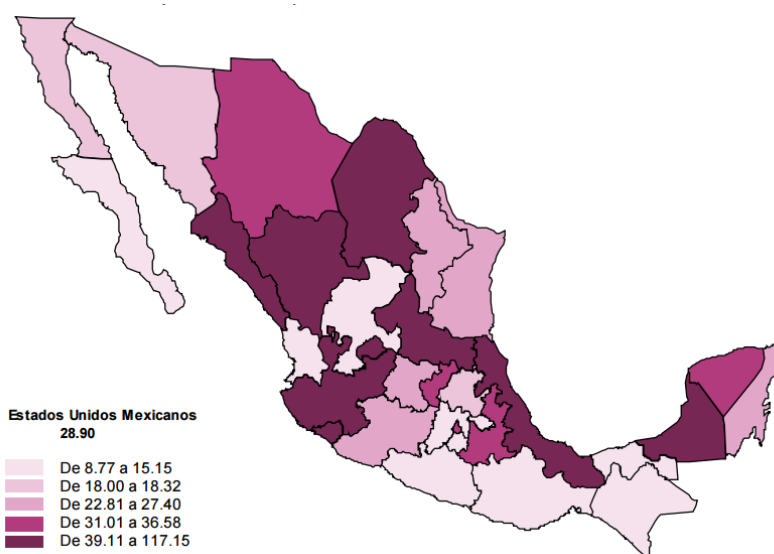


Figura 8. Incidencia de tumor maligno de mama por cada 100 mil mujeres de 20 años y más, por entidad federativa en 2013. Existe una gran variación con valores que van desde 8.77 por cada 100 mil en el caso de Guerrero hasta los 117.15 casos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más en el caso de Campeche. Sin embargo, la falta de acceso a la detección temprana también sugiere que existe un gran número de casos no detectados. SSA, CENAPRECE (2014). Anuarios de Morbilidad 1984-2013; y CONAPO (2014). Proyecciones de la Población 2010-2050.

Por otro lado, aunque la tasa de mortalidad por cáncer de mama se ha mantenido relativamente estable durante los últimos años, actualmente representa la segunda causa de mortalidad en las mujeres de 20 años y más.

Por entidad federativa, Coahuila ocupa el primer lugar con la tasa más alta de mortalidad por cáncer de mama en mujeres mayores de 20 años, con 20.92 por cada 100 mil y supera ligeramente al Distrito Federal con 19.91 por cada 100 mil, y a Nuevo León con 19.56 fallecimientos por cada 100 mil mujeres. Por otra parte,

las entidades con las tasas más bajas son Oaxaca, Guerrero y Campeche (7.65, 8.75 y 8.83 muertes por cada 100 mil mujeres de 20 años y más, respectivamente) (figura 9) (INEGI 2015).

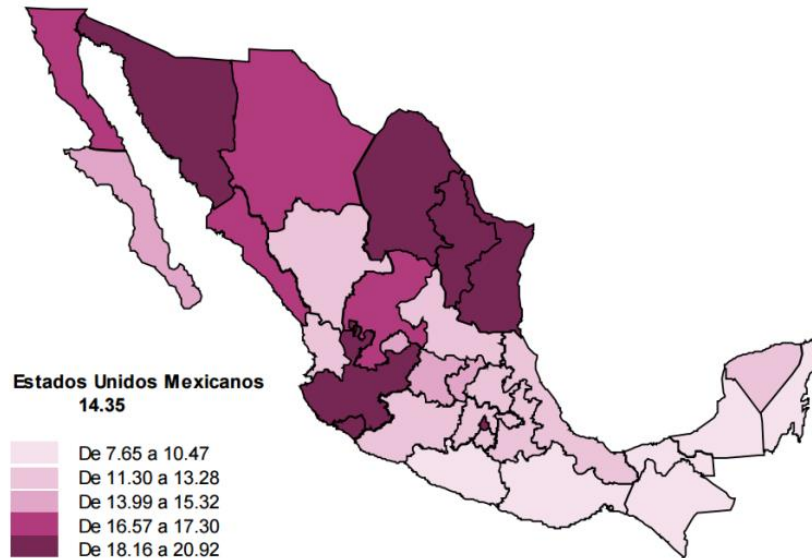


Figura 9. Tasa de mortalidad de cáncer de mama por cada 100 mil mujeres de 20 años y más por entidad federativa en 2013. Con excepción del Distrito Federal, la región norte del país es donde se concentran las tasas más altas de mortalidad observada (INEGI (2013). Estadísticas de Mortalidad. Base de Datos; y CONAPO (2014). Proyecciones de la Población 2010-2050).

No obstante, el cáncer de mama también puede presentarse entre los varones a cualquier edad, aunque generalmente se detecta en aquellos de 60 a 70 años. La supervivencia es similar que en las mujeres con este mismo cáncer (NCI, 2014). En México, aunque en los varones apenas representa 0.7% de los ingresos hospitalarios por tumores malignos, desmiente la creencia de que esta enfermedad sea exclusiva de las mujeres (INEGI, 2015).

Factores de riesgo para el cáncer de mama

Diversos estudios han identificado numerosos factores de riesgo para el cáncer de mama en las mujeres; sin embargo, en la mayoría de las mujeres afectadas no siempre es posible identificar factores de riesgo específicos (OMS, 2015).

Entre los principales factores de riesgo asociados al cáncer de mama se encuentran los factores reproductivos como son: menstruación temprana, menopausia tardía, nuliparidad o haber tenido el primer embarazo después de los 30 años. Tener una mayor edad, antecedentes personales de ciertas enfermedades de seno, antecedentes de radioterapia en el tórax, así como antecedentes familiares de cáncer de mama multiplican el riesgo. La presencia de ciertas alteraciones genéticas hereditarias sobre todo en los genes BRCA1, BRCA2 y p53, se asocian a un riesgo muy elevado de ese tipo de cáncer; sin embargo, esas mutaciones explican solo una pequeña parte de la carga total de cáncer mamario. Las hormonas exógenas como el uso de anticonceptivos orales, uso prolongado de terapia hormonal combinada, antecedentes de haber tomado dietilestilbestrol, también conllevan un mayor riesgo de cáncer de mama. Finalmente, diversos factores de riesgo modificables como son los factores conductuales y dietéticos anteriormente mencionados (consumo de alcohol, consumo de tabaco, sobrepeso y obesidad, y falta de actividad física, etc.) también contribuyen de manera importante en la incidencia, prevalencia y mortalidad del cáncer de mama (NCI, 2014; OMS, 2015).

Por otro lado, el cáncer de mama en hombres se asocia con exposición a radiaciones, obesidad, altas concentraciones de estrógeno en la sangre producto de la cirrosis o el síndrome de Klinefelter (trastorno genético caracterizado por la presencia de uno o más cromosomas X extra) y por antecedentes heredofamiliares de mutaciones en el gen BRCA2 (NCI, 2014).

Estructura de la mama

La mama está compuesta principalmente por lobulillos (glándulas encargadas de producir leche), conductos (tubos delgados que llevan la leche desde los lobulillos al pezón), y el estroma (tejido conectivo y adiposo, ganglios linfáticos y vasos sanguíneos que rodean a la mama) (figura 10) (NCI, 2014).

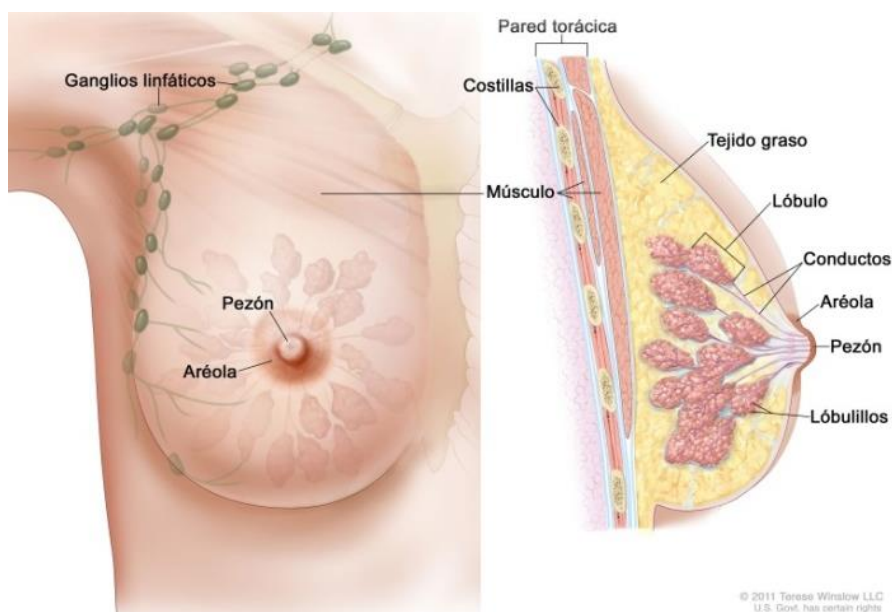


Figura 10. Anatomía de la mama femenina. Se muestran el pezón, la areola, los ganglios linfáticos, los lóbulos, los lobulillos, los conductos y otras partes de la mama (NCI, 2014).

De gran importancia resulta el sistema linfático de la mama ya que es una de las vías a través de la cual el cáncer de mama puede propagarse a otras partes del cuerpo. Si las células cancerosas se han propagado a los ganglios linfáticos, existe una probabilidad mayor de que las células también hayan alcanzado el torrente sanguíneo y se dispersen en el organismo (NCI, 2014).

La mayoría de los vasos linfáticos de la mama conducen a los ganglios linfáticos en las axilas (ganglios axilares). Algunos vasos linfáticos conducen a los ganglios linfáticos dentro del tórax (ganglios mamarios internos) y a aquellos en la parte superior o inferior de la clavícula (ganglios supraclaviculares e infraclaviculares respectivamente) (NCI, 2014).

Tipos de cáncer en la mama

Existen tres tipos principales de cáncer de mama: el carcinoma ductal, el carcinoma lobulillar y el mixto. El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal, que empieza en las células de los conductos; sin embargo, el cáncer de mama también puede empezar en las células de los lobulillos y en otros tejidos de la misma. A su vez, el carcinoma ductal *in situ* es aquel en el que proliferan células anormales en el revestimiento de los conductos, pero no se diseminan fuera del conducto. Por otro lado, el cáncer de mama que se extiende desde su sitio de origen (conductos o lobulillos) a los tejidos circundantes se conoce como cáncer de mama invasivo (NCI, 2014).

Cáncer metastásico

Una vez que el tumor logra invadir el tejido circundante puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Durante el proceso de metástasis, las células cancerosas se separan del sitio donde se formaron inicialmente (cáncer primario), se desplazan por medio del sistema vascular o linfático, y forman nuevos tumores (tumores metastásicos) en otras partes del cuerpo. Aunque la mayoría de los cánceres tienen la capacidad para diseminarse a muchas partes diferentes del cuerpo, en general se diseminan a un lugar con más frecuencia que a otros. Para el cáncer de mama, los lugares más comunes de metástasis son: el cerebro, el hígado, los huesos y los pulmones (NCI, 2014).

De esta manera el tumor metastásico tiene el mismo tipo de células que el tumor original o primario por lo que se le denomina con el mismo nombre. Así por ejemplo, el cáncer de seno que se disemina a los pulmones y forma un tumor metastásico se llama cáncer metastásico de seno y no cáncer de pulmón (NCI, 2014).

De manera general, el proceso de metástasis inicia con una invasión local en donde las células cancerosas invaden el tejido normal adyacente. Luego ocurre la

intravasación a través de las paredes de los ganglios linfáticos o los vasos sanguíneos cercanos. Las células cancerosas se mueven por el sistema linfático y por el torrente sanguíneo a otras partes del cuerpo hasta detenerse e invadir las paredes de los vasos sanguíneos pequeños, llamados capilares, donde logran emigrar a los tejidos del rededor (extravasación). Ahí, las células se multiplican y proliferan para formar tumores pequeños llamados micrometástasis. Las micrometástasis estimulan el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis) para establecer el suministro de sangre del cual obtendrán el oxígeno y los nutrientes necesarios para el crecimiento continuo del tumor (figura 11) (NCI, 2014; Nieto y Cano, 2012).

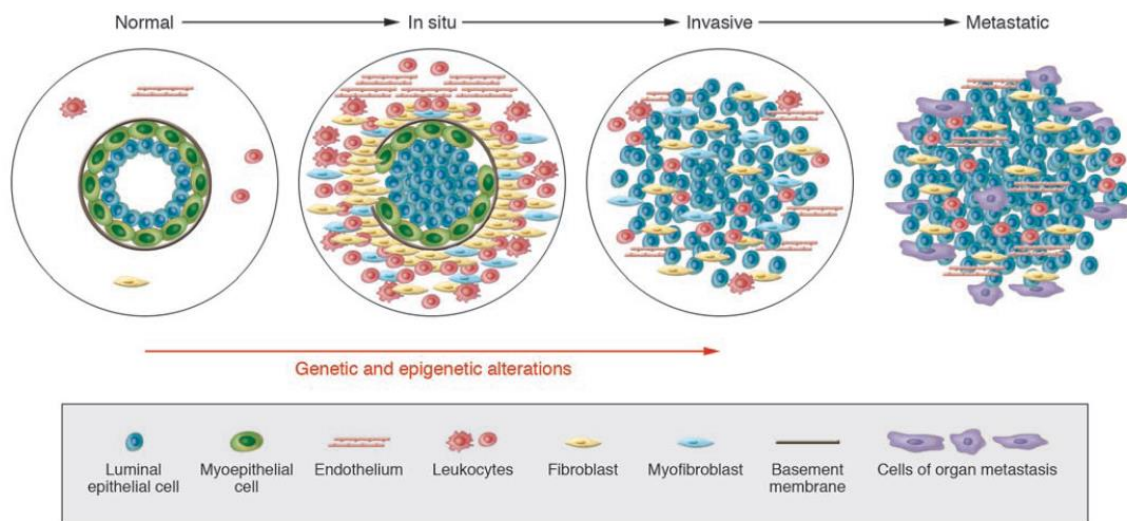


Figura 11. Modelo hipotético de la progresión de cáncer de mama. Vista esquemática normal, *in situ*, invasiva y metastásica de la progresión de carcinoma. Los ductos normales de la mama están formados por la membrana basal y una capa luminal de células epiteliales y mioepiteliales. Las células que componen el estroma incluyen leucocitos, fibroblastos, miofibroblastos y células endoteliales. En el carcinoma *in situ* las células mioepiteliales están genéticamente y fenotípicamente alteradas y el número decremente potencialmente debido a la degradación de la membrana basal. Al mismo tiempo, el número de fibroblastos estromales, miofibroblastos, linfocitos y células endoteliales aumenta. La pérdida de las células mioepiteliales y de la membrana basal resulta en un carcinoma invasivo, en el cual las células cancerígenas pueden invadir tejidos circundantes y migrar hacia órganos distantes, eventualmente desarrollando metástasis (Polyak, 2007).

Transición Epitelio-Mesénquima (TEM)

Para que las células cancerígenas puedan realizar metástasis deben someterse inicialmente a un proceso biológico conocido como Transición Epitelio-Mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) que comprende diversos eventos a través de los cuales las células epiteliales se someten a una serie de cambios bioquímicos que les permite asumir un fenotipo mesenquimal (Kalluri y cols., 2009; Acloque y cols., 2009).

Las células epiteliales son células adherentes que se disponen en forma de capas debido a que están estrechamente unidas entre sí por complejos de adhesión intercelular como son las uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones comunicantes en sus membranas laterales; además, presentan polaridad apicobasal. Las células mesenquimales por el contrario, son células no polarizadas que carecen de uniones intercelulares, lo que les permite moverse como células individuales. Sin embargo, los fenotipos epitelial y mesenquimal no son irreversibles y las células pueden transitar entre ambos estadios a través de los procesos de “*Transición Epitelio-Mesénquima*” y “*Transición Mesénquima-Epitelio*” (Acloque y cols., 2009; Nieto y Cano, 2012).

El trabajo pionero de Elizabeth Hay en 1982 describió por primera vez una “*Transformación Epitelio Mesénquima*”, empleando como modelo la formación de la línea primitiva en embriones de pollo. Posteriormente, este término fue reemplazado por el de “*Transición Epitelio-Mesénquima*” haciendo referencia a la reversibilidad del proceso y desde entonces, ha sido implicado en numerosos estados y patologías incluyendo la carcinogénesis (Kalluri y cols., 2009).

Tipos de Transición Epitelio-Mesénquima

La Transición Epitelio-Mesénquima es clasificada en tres diferentes subtipos de acuerdo a las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo. Así se tiene que la TEM asociada con la implantación, formación del embrión y desarrollo de órganos es

clasificada como de “tipo 1”. La TEM asociada a la reparación de heridas, regeneración de tejidos y fibrosis forma parte del “tipo 2” y está asociada también con el proceso inflamatorio. Finalmente, el “tipo 3” de la TEM ocurre en las células neoplásicas (Kalluri y cols, 2009; Nieto y Cano, 2012).

Se ha propuesto la activación de la Transición Epitelio-Mesénquima como el mecanismo crítico para la adquisición de un fenotipo maligno por parte de las células epiteliales (Acloque y cols., 2009) e implica la pérdida de las interacciones celulares y de la polaridad apicobasal y a la vez la adquisición de marcadores mesenquimales y un comportamiento migratorio e invasivo así como la resistencia a la apoptosis (Nieto y Cano, 2012; García y cols., 2010).

Marcadores moleculares de la TEM

Diversos procesos moleculares están asociados a la Transición Epitelio-Mesénquima y han servido como marcadores para identificar cómo se lleva a cabo este proceso. Aunque los tres subtipos en los que se puede presentar la TEM representan procesos biológicos distintos, presentan una serie de elementos genéticos y bioquímicos en común. Entre ellos destacan: la activación de factores de transcripción, expresión de proteínas de superficie específicas, la expresión y reorganización de las proteínas del citoesqueleto, la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular y cambios en la expresión de microARNs específicos (figura 12) (Kalluri y Weinberg, 2009; Zeisberg y Neilson, 2009).

Diversos estudios en modelos animales y en cultivos celulares han demostrado que las células cancerígenas pueden adquirir un fenotipo mesenquimal y expresar algunos de estos marcadores característicos (Kalluri y Weinberg, 2009).

Entre los marcadores clásicos de la TEM presentes en la membrana se encuentra la pérdida de las uniones célula-célula, particularmente las uniones adherentes que se derivan de las interacciones entre las moléculas de E-cadherina de células epiteliales vecinas (Taylor y cols, 2010).

En muchos estudios se ha establecido una estrecha relación entre la pérdida de la expresión de E-cadherina y el desarrollo de la Transición Epitelio-Mesénquima durante el desarrollo embrionario, la fibrosis y en la mayoría de cánceres epiteliales (Kalluri y Weinberg, 2009; Nguyen y cols, 2013). Se sabe también que las líneas celulares que carecen de E-cadherina muestran una incrementada capacidad tumorigénica y metastásica (Zeisberg y Neilson, 2009).

De hecho, durante el proceso de TEM ocurre un proceso denominado "*cambio de cadherina*" (*cadherin switching*, en inglés), que hace referencia a la capacidad de inhibir la expresión y actividad de E-cadherina para dar paso a la de N-cadherina la cual es expresada en tejido neural, células mesenquimales, fibroblastos y en células cancerígenas (Kalluri y Weinberg, 2009; Zeisberg y Neilson, 2009). Algunos estudios demuestran la correlación entre la expresión de N-cadherina con el aumento de la invasión tumoral y la poca supervivencia ante el diagnóstico de cáncer (Taylor y cols, 2010).

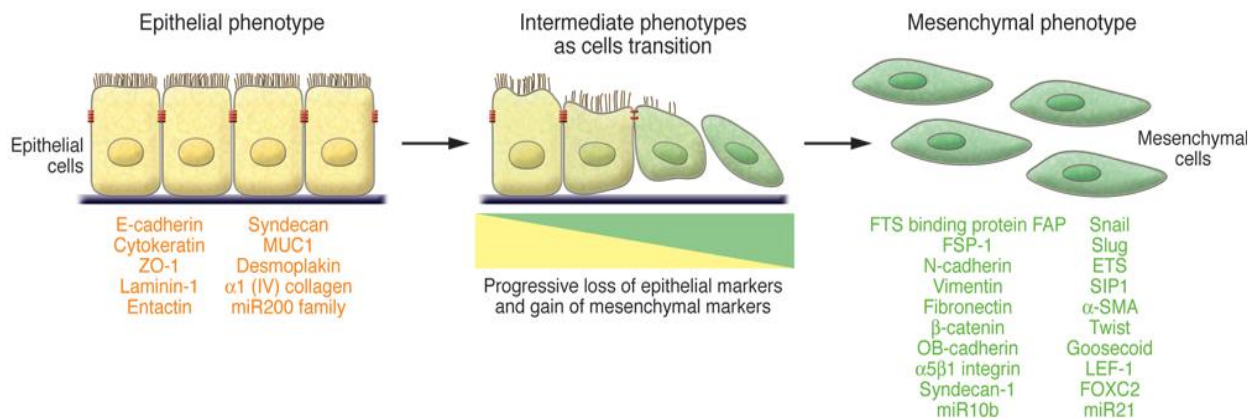


Figura 12. TEM. Marcadores fenotípicos epiteliales y mesenquimales. El proceso de TEM involucra una transición de células epiteliales polarizadas hacia células móviles mesenquimales. Los marcadores epiteliales y mesenquimales comúnmente empleados para el estudio de la TEM son listados. La colocalización de ambos conjuntos de distintos marcadores define un fenotipo intermedio, indicando células que han atravesado parcialmente el proceso de TEM. ZO-1, zona occludens 1; MUC1, mucina 1, asociada a la superficie celular; miR200, microRNA 200; SIP1, survival of motor neuron protein interacting protein 1 (proteína de interacción de proteínas de supervivencia de neuronas motoras 1; FOXP2, forkhead box C2 (Kalluri y Weinberg, 2009).

Factores inductores de la TEM

En muchos carcinomas, las señales inductoras del proceso de Transición Epitelio-Mesénquima provienen del estroma asociado a la zona del tumor (Witsch y cols., 2010).

El número de factores conocidos por inducir y promover el proceso Transición Epitelio-Mesénquima cada vez va en aumento e incluye: factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, citocinas, factores de transcripción y algunas condiciones del medio extracelular como lo es la hipoxia (Zeisberg y Neilson, 2009; Nguyen y cols., 2013).

Factores de transcripción asociados a la TEM

Los factores de transcripción son proteínas que, en respuesta a señales citoplasmáticas, son capaces de regular la expresión génica en el núcleo. Uno de los principales marcadores del proceso de TEM es la activación de ciertos factores de transcripción denominados *Factores de Transcripción asociados a la Transición Epitelio-Mesénquima (EMT-TF's)*. Estos pertenecen a diferentes familias de genes y entre ellos se encuentran *Snail*, *Twist* y *Zeb*, principalmente. Una vez expresados y activados en células epiteliales, pueden actuar pleiotrópicamente para dirigir el proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (Kalluri y Weinberg, 2009; Neto y Cano, 2012).

Los factores de transcripción de las familias de *Snail* y *Zeb* son considerados generalmente como “*represores transcripcionales directos*” con base en su actividad que es dependiente de la estructura. Diversos estudios sugieren que estos tienen un papel muy importante en la represión de algunos genes epiteliales específicos durante la progresión tumoral como E-cadherina. La expresión del gen de E-cadherina, *CDH1*, es regulada por estos represores transcripcionales que se unen a secuencias específicas en el sitio promotor de *CDH1* que contienen un núcleo central 5'-CACCTG-3' y son denominadas *E-boxes* (García y cols., 2010).

Además, prácticamente todos los EMT-TF's se han asociado con la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis. Asimismo, se ha detectado la expresión de la mayoría de ellos en diversas líneas celulares tumorales invasivas tanto de ratón como humanas (Yang y Weinberg, 2008).

Snail

Los factores de transcripción de la familia *Snail* son un clásico ejemplo de un blanco de varias vías de señalización que regulan la Transición Epitelio-Mesénquima. De los tres miembros de esta familia de proteínas de dedos de zinc (*Snail1*, *Snail2* y *Snail3*), *Snail1* y *Snail2* (conocido también como *Slug*) participan en etapas críticas de la TEM. De hecho, todos los eventos conocidos que ocurren durante la TEM en el desarrollo embrionario, el cáncer y la fibrosis están asociados con la activación de estos factores de transcripción (Zeisberg y Neilson, 2009; Taylor y cols, 2010). *Snail1* es requerido en las primeras etapas, mientras que *Snail2* y otros factores como *Twist* actúan ayudando a mantener la progresión de la TEM (Nieto y Cano, 2012).

Desde el año 2000 se sabe que *Snail1* se une a la secuencia conservada *E-box* dentro de la región promotora de sus genes blanco como lo es E-cadherina, así como genes que codifican para los componentes de las uniones estrechas como Claudina-3, Claudina-4, Claudina-7 y ocludina, y es capaz de reprimir la transcripción de estos. Además, su actividad es regulada por el control de su localización intracelular. La fosforilación de *Snail* origina que sea liberado del núcleo hacia el citoplasma, inactivando su función como factor de transcripción. GSK3 β puede fosforilar a *Snail*, y así promover su liberación y degradación mediado por ubiquitinación. Por lo tanto la inactivación de GSK3 β favorece la estabilidad y la capacidad de *Snail* para promover la TEM (Yang y Weinberg, 2008; Zeisberg y Neilson, 2009).

Snail1 es de hecho el mejor represor de E-cadherina que se conoce, lo cual lleva a la ruptura de las uniones adherentes. Pero además regula otros varios aspectos

durante el desarrollo de la Transición Epitelio-Mesénquima como son el incremento en la expresión de marcadores mesenquimales y fibroblásticos como fibronectina y vimentina, el decremento en la expresión de varios marcadores epiteliales como claudinas, ocludinas y citoqueratinas, el incremento en la expresión de MMPs y la protección contra la muerte celular (Kalluri y Weinberg, 2009; Zeisberg y Neilson, 2009). Existe una relación positiva entre el incremento en los niveles de *Snail1* y el desarrollo de tumores con un alto grado de invasividad (Nguyen y cols, 2013).

En comparación con *Snail1*, *Snail2* no ha sido tan ampliamente estudiado pero se sabe que su efecto es menor en la represión de E-cadherina ya que su afinidad por las secuencias E-box en su sitio promotor es menor que *Snail1* (García y cols., 2010).

Snail2 está implicado en el proceso de metástasis de diversos tumores malignos como en el adenocarcinoma de mama, de ovario y de pulmón (Liu Jun y cols., 2010).

Twist

Twist es una proteína que es activa transcripcionalmente durante la diferenciación celular. Es sobreactivada durante las etapas tempranas de la morfogénesis, desarrollo de fibrosis y en el proceso de metástasis en el cáncer. Puede actuar independientemente de *Snail* para reprimir E-cadherina y para regular la exacerbación de fibronectina y N-cadherina (Zeisberg y cols., 2009). Sin embargo, la represión de E-cadherina la realiza de manera indirecta, es decir, sin unirse a su región promotora (Yang y Weinberg, 2008).

Mediante algunos ensayos empleando modelos animales, se ha demostrado que la expresión de *Twist* está asociada con cambios morfológicos en las células tumorales durante la progresión de la TEM y apoyan la propuesta de la

participación de este factor en el proceso de intravasación de células de carcinoma mamario (Nieto y Cano, 2012).

Twist fue identificado inicialmente por ser requerido para la formación del mesodermo en *Drosophila*. A su vez, en vertebrados, es expresado predominantemente en células de la creta neural. Estudios en modelos animales demuestran que una mutación de *Twist* origina fallas en el cierre del tubo neural y sugiere su participación en la migración y diferenciación celular. Por otro lado, estudios más recientes han demostrado que la expresión de *Twist* es capaz de inducir la TEM en células epiteliales de mama. Mediante un modelo animal de ratón, se demostró también que *Twist* resulta esencial para la metástasis de células de carcinoma mamario hacia el pulmón (Yang y Weinberg, 2008).

Zeb

La familia de factores de transcripción *Zeb* integra dos miembros: *Zeb1* (también conocido como TCF8 o δ EF1) y *Zeb2* (ZFXH1B o SIP1). Su estructura consiste en dos dominios de dedos de zinc laterales y un homeodominio central. (Yang y Weinberg, 2008; García y cols., 2010).

Tanto *Zeb1* como *Zeb2*, al igual que *Snail*, actúan de manera directa como represores de E-cadherina a través de la unión simultánea de ambos dominios de zinc a las secuencias E-box, sin embargo su efecto es menor a *Snail* y lo es también en la inducción de la TEM (Acloque y cols., 2009; García y cols., 2010).

Por otro lado, se ha demostrado que el silenciamiento de *Zeb1* tiene un mayor impacto en los niveles de expresión de E-cadherina que *Snail* (García y cols., 2010).

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento o GFs (por sus siglas en inglés, Growth Factors) son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que, a través de sus receptores, desempeñan un papel muy importante en la comunicación intercelular. Una de las funciones de los factores de crecimiento es estimular la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis. También intervienen en el mantenimiento de la supervivencia celular, estimulan la migración y diferenciación celular y la apoptosis (Witsch y cols, 2010).

Los factores de crecimiento y sus receptores han sido implicados en diversas etapas de la progresión del cáncer (Wesche y cols., 2011) y pueden ser secretados por las mismas células tumorales y por las células estromales que rodean al tumor simultáneamente (Said y Williams, 2009). Algunos como HGF, EGF, PDGF y TGF- β , entre otros, parecen ser los responsables de la activación de los diversos Factores de Transcripción inductores de la TEM en las células cancerígenas (Kalluri y Weinberg, 2009; Witsch y cols., 2010). Recientemente ha surgido información acerca de la participación de algunos miembros que integran la familia de Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGFs) en etapas críticas de la progresión tumoral.

Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGFs)

Desde inicios de 1939 se demostró que empleando extractos de embriones y cerebro se promovía el crecimiento de fibroblastos del periostio en modelos animales de pollo. Sin embargo fue hasta 1973 cuando se comenzó a estudiar la actividad mitogénica sobre cultivos de fibroblastos empleando extractos de pituitaria bovina a bajas concentraciones (en orden de ng/ml) hasta que en 1983 se aisló el primer miembro de la familia de FGFs al que se le denominó FGF básico (bFGF o FGF2) debido a la estructura básica de sus aminoácidos y a su alto punto isoeléctrico (PI = 9.6). Posteriormente se identificó el segundo miembro de esta familia con una actividad mitogénica similar, el cual fue aislado de cerebro

bovino y con un punto isoelectrico bajo (PI = 5.6), identificado como FGF ácido (aFGF o FGF1) (Ornitz e Itoh, 2015).

Muchos miembros de esta familia han sido aislados como factores de crecimiento para cultivos celulares y los genes que los codifican se han identificado mediante técnicas de PCR y/o análisis de bases de datos (Itoh y Ornitz, 2011).

Actualmente, la familia de FGFs está conformada por 22 miembros numerados como FGF1–FGF23. Cada uno de ellos es codificado por un gen propio (*Fgf1-Fgf23*) y están conformados por ~150-300 aminoácidos con un núcleo conservado de ~120 aminoácidos dispuestos en 12 láminas β plegadas antiparalelas (β 1– β 12) (figura 13) (Beenken y Mohammadi, 2009).

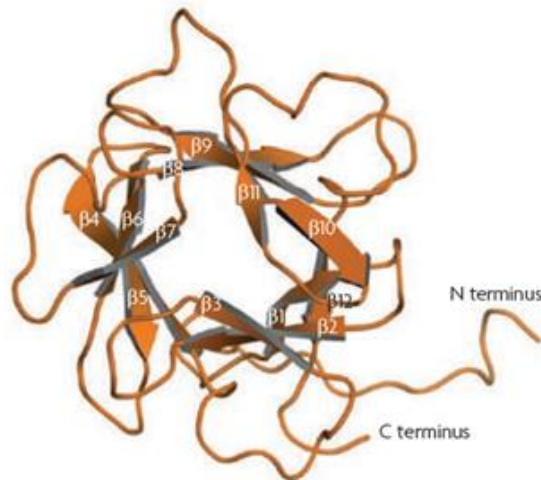


Figura 13. Estructura general de los miembros de la familia de Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGFs). Se muestra un FGF clásico con sus 12 láminas β plegadas antiparalelas y sus extremos amino y carboxilo terminal (Beenken y Mohammadi, 2009).

Los FGFs han sido agrupados en 6 subfamilias basadas en diferencias en la secuencia, homología y filogenia: FGF1 y FGF2; FGF3, FGF7, FGF10 y FGF22; FGF4, FGF5 y FGF6; FGF8, FGF17 y FGF18; FGF9, FGF16 y FGF20; FGF19, FGF21 y FGF23. Además, hay cuatro FGFs (FGF11–FGF14) que, aunque tienen homología de secuencia, no activan los receptores de FGFs por lo tanto no se consideran miembros de la familia FGF y han sido designados como “Factores Homólogos de FGFs (FHF)””. Por otro lado, FGF15 es el ortólogo en el ratón de

FGF19 humano y algunos autores hacen referencia de este como FGF15|19 aunque el gen *Fgf15* no ha sido identificado en humanos (Beenken y Mohammadi, 2009; Itoh N y Ornitz, 2011).

Los FGFs pueden también ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción como: canónicos (FGFs) o parácrinos, de tipo hormonal (hFGFs) o endócrinos e intracelulares (iFGFs) o intácrinos (figura 14) (Itoh N y Ornitz, 2011).

Los FGFs de tipo parácrino y endócrino comprenden proteínas de señalización de tipo secretorias que son expresadas en casi todos los tejidos y tienen un papel muy importante en las primeras etapas del desarrollo embrionario, durante la organogénesis y en la vida del adulto, donde funcionan como factores homeostáticos importantes para el mantenimiento y reparación tisular y el metabolismo (Ornitz e Itoh, 2015).

Los miembros de la familia de FGF de tipo parácrino comprenden las subfamilias FGF1 y 2; FGF4, 5 y 6; FGF3, 7, 10 y 22; FGF9, 16 y 19 y FGF8, 17 y 18. Estos actúan mediante la unión y activación de receptores de superficie de tipo tirosincinasa (FGFRs) empleando moléculas de heparán sulfato como cofactor y regulan diversos procesos durante el desarrollo embrionario como la diferenciación, la proliferación y la migración celular. La mayoría son secretados y poseen una secuencia señal escindible en la región N-terminal. Algunos estudios han reportado que FGF1, FGF2 y FGF3 pueden ser translocados al núcleo y actuar de manera intácrina (Itoh y Ornitz, 2011).

Los FGFs endócrinos (FGF15/19, 21 y 23) comprenden una subfamilia distinta que circulan en el suero. También son dependientes del funcionamiento de receptores FGFRs, sin embargo, su afinidad hacia estos y a moléculas de heparán sulfato es menor por lo que actúan a largas distancias como hormonas endócrinas. Estos FGFs requieren α -Klotho (KL), β -Klotho (KLB) y/o Klotho-LPH related protein (KLPH), proteínas transmembranales expresadas en los tejidos blanco que funcionan como correceptores para mediar su actividad biológica que comprende

la regulación de ácidos biliares, fosfatos, lípidos, y carbohidratos en el adulto (Beenken & Mohammadi, 2009; Itoh y Ornitz, 2011).

Por otro lado, los FGFs de tipo intracelular o FGFs (FGF11-FGF14), no son secretados y actúan intracelularmente de manera independiente de FGFRs es decir, no son capaces de activarlos. Este grupo de FGFs regula la excitabilidad eléctrica de los canales de sodio dependientes de voltaje de neuronas y posiblemente otros tipos celulares (Itoh y Ornitz, 2011).

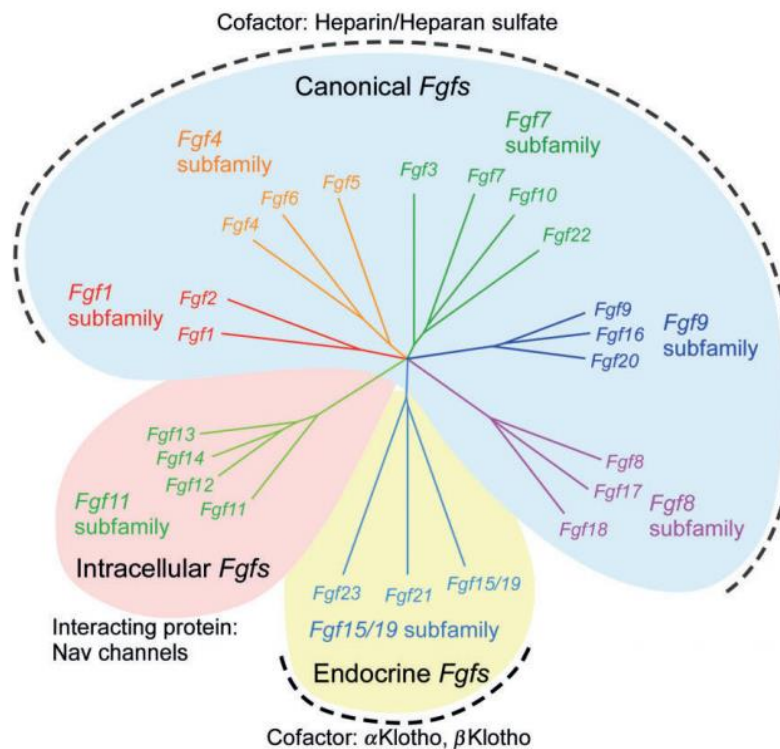


Fig 14. Relación filogenética entre las subfamilias de FGF. El análisis filogenético sugiere que los 22 genes *Fgf* pueden ser clasificados en siete familias conteniendo de dos a cuatro miembros en cada una de ellas. La longitud de las ramas es proporcional a la distancia evolutiva entre cada gen. Las subfamilias de genes *Fgf1*, *Fgf4*, *Fgf7*, *Fgf8*, y *Fgf9* codifican los FGFs de tipo canónico, los cuales se unen y activan FGFRs utilizando heparán sulfato como cofactor. Los miembros de la subfamilia *Fgf15/19* codifica FGFs de endócrinos, los cuales se unen y activan FGFRs utilizando la familia de proteínas Klotho como cofactor. Las subfamilias de genes *Fgf11*, *Fgf12*, *Fgf13* y *Fgf14* codifican FGFs de tipo intracelular, los cuales no son considerados proteínas de señalización y actúan como cofactores para los canales de sodio dependientes de voltaje y otras moléculas (Ornitz e Itoh, 2015).

Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2)

FGF2 es un péptido de cadena sencilla que presenta diversas isoformas, producto de sitios alternativos en el inicio de la traslación del ARNm que lo codifica. Se han descrito cinco isoformas en el humano (18, 22, 22.5, 24 y 34 kDa) las cuales tienen diferente localización subcelular y función sobre comportamiento celular (Sorensen y cols., 2006).

FGF2 ha sido aislado de tejidos derivados de mesodermo y neuroectodermo, los cuales muestran ser sensibles a éste factor tanto en "*in vitro*" como "*in vivo*", incluyendo células endoteliales y musculares lisas de vasos sanguíneos del sistema nervioso, retina, cuerpo lúteo, placenta, próstata, ureteros, vejiga, cervix, útero, hígado, intestinos delgado y grueso, riñón glándula suprarrenal, timo, hueso, bronquios, alveolos, sistema inmunológico (macrófagos y monocitos), sistema hematopoyético, etc. La mayoría de los órganos de los cuales se ha purificado, muestran en común un elevado potencial angiogénico y una alta vascularización, lo cual sugiere que las células del sistema vascular pueden ser la fuente más importante de FGF2, ya que además de expresar el gen para éste factor, producen su forma activa.

A diferencia de los demás miembros de la familia de FGFs de tipo parácrino, FGF2 (al igual que FGF1) no posee ninguna secuencia señal para su secreción, sin embargo, la isoforma de bajo peso molecular (FGF2 18 kDa) puede ser liberada al medio extracelular a través de un mecanismo de exocitosis independiente de la vía de retículo endoplásmico-Golgi el cual consiste en la translocación directa a través de la membrana celular y que se cree, involucra un complejo de proteínas chaperonas que incluye sinaptotagmina-1 y la proteína de unión a calcio S100A13. Por otro lado, las isoformas de FGF2 de alto peso molecular (hwm FGF, del inglés *Hight Molecular Weight Isoforms of FGF2*) no son secretadas y presentan repeticiones GR en el extremo N-terminal que actúan como secuencias NLS por lo que son enviadas al núcleo actuando de manera intrínica en la regulación de algunos procesos como el crecimiento celular. Pero además, las isoformas secretadas, pueden ser translocadas al citosol y al núcleo

luego de haberse unido a su receptor y actuar también intracelularmente (Sorensen y cols., 2006; Ornitz e Itoh, 2015).

Diversos estudios indican que el silenciamiento del gen de FGF2 (*Fgf2*) en ratones es viable pero origina un bajo tono vascular y un número reducido de neuronas en las capas profundas de la corteza cerebral. Además, los ratones con este gen silenciado presentan un deterioro en la capacidad de recuperación ante daños isquémicos cardiacos (Itoh y Ornitz, 2011). Mediante modelos animales se ha demostrado que FGF2 se encuentra sobreexpresado en el desarrollo de fibrosis (Strutz y cols., 2002).

Los niveles de expresión de FGF2 dependen del tipo celular o tejido y es estrictamente regulado a nivel transcripcional. Se encuentra normalmente a concentraciones plasmáticas de menos de 10 pg/ml y regula diversos procesos celulares incluyendo la proliferación, migración y diferenciación celular de una amplia gama de tipos celulares incluyendo las células cancerígenas. Además, mediante ensayos con modelos *in vivo*, se ha descrito su función angiogénica (Beenken y Mohammadi, 2009; Lau y cols., 2013).

Algunos estudios han demostrado que FGF-2 participa de manera importante en diversos mecanismos implicados en la Transición Epitelio-Mesénquima. Se ha observado que FGF2 puede inducir la actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 esenciales para la degradación de la membrana basal en tejidos, favoreciendo así la migración de las células epiteliales anormales hacia el intersticio. Por otro lado, FGF2 reduce los niveles de expresión E-cadherina y citoqueratina; además, favorece la expresión de marcadores mesenquimales tales como SMA- α y FSP-1 y la síntesis de fibronectina a través de sus sitios promotores (Strutz y cols., 2002).

En algunos modelos celulares de diferentes tipos de cáncer como son próstata, colon, mama, pulmón y vejiga se ha observado una sobreexpresión de FGF2 así como de su receptor FGFR1. Algunos tumores como neuroblastomas y gliomas también expresan FGF2 (Strutz y cols., 2010; Hung y cols, 2014).

En cultivos celulares de fibroblastos, se ha demostrado que FGF2 actúa como un factor transformante; además, la sobreexpresión y la estimulación autócrina de FGF2 correlacionan con una mayor motilidad e invasividad. En la línea celular de carcinoma adrenal SW13, así como en líneas celulares de cáncer de próstata, FGF2 induce la proliferación; sin embargo, existe evidencia que este factor puede tener efectos contrarios dependiendo del tipo celular (Korah RM y cols., 2000).

En el cáncer de mama, FGF2 posee un importante papel como factor angiogénico y está implicado en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad. Se ha asociado la expresión de este factor de crecimiento con un fenotipo más diferenciado por parte de las células cancerígenas. A medida que las células epiteliales de mama se van desdiferenciando, adquieren la capacidad de secretar FGF2, el cual causa la migración y proliferación de las células endoteliales vasculares. Sin embargo, se ha observado que a medida que las células tumorales se desdiferencian aún más, dejan de sintetizar FGF2. De hecho se ha asociado la pérdida de FGF2 intracelular con una mayor malignidad del cáncer de mama (Korah RM y cols., 2000)

FGFRs

Los receptores de FGF (FGFRs) tienen una estructura similar a muchos receptores tirosinasa (RTKs) (Beenken y Mohammadi, 2009). Tanto en humanos como en ratones se han identificado cuatro genes que codifican estos receptores (*Fgfr1-Fgfr4*). Los FGFRs constan de ~800 aminoácidos y su estructura consiste de una simple hélice transmembranal compuesta por una región extracelular que une FGF, un dominio transmembranal y un dominio intracelular tirosinasa que transmite la señal al interior de la célula (Itoh N y Ornitz, 2011). La región extracelular está compuesta por tres dominios tipo Ig (I-III) con una región ácida rica en serina entre los dominios I y II que constituye el sitio de unión a ligando. El primer dominio Ig, junto con la región ácida, juega un papel importante en la autoinhibición del receptor (Beenken y Mohammadi, 2009).

A su vez, el dominio Ig-III es el sitio determinante de la especificidad del receptor hacia su ligando. En *Fgfr1–Fgfr3*, el splicing alternativo en este dominio genera las isoformas IIIb y IIIc que son predominantemente expresados en tejidos epiteliales y mesenquimales, respectivamente y cada una cuenta con diferentes ligandos específicos. En general, un ligando producido en tejido epitelial activará un receptor mesenquimal y viceversa. FGF1 es capaz de activar ambas isoformas por lo que puede unirse a todos los receptores de FGF (Itoh N y Ornitz, 2011).

Así, se tiene un total de siete proteínas con diferente especificidad de unión a ligando generados por 4 genes *Fgfr* (FGFR Ib, Ic, IIb, IIc, IIIb, IIIc y IV) (Ornitz e Itoh N, 2015).

Recientemente, se ha identificado un quinto receptor no RTK (FGFRL1) que puede unir FGFs y posiblemente puede funcionar como un receptor señuelo, un inhibidor de la dimerización de FGFRs o un modulador de la señalización (Itoh N y Ornitz, 2011).

La sobreexpresión o activación anormal de FGFRs está involucrada en la progresión del cáncer. Se han reportado alteraciones en los receptores de FGF en una variedad de cánceres humanos, tales como cáncer de mama, vejiga, próstata, endometrio y pulmón. La mutación de estos receptores es la alteración genética más común y está fuertemente asociada con el grado de malignidad del tumor, principalmente en etapas tempranas (Nguyen y cols, 2013).

Hasta el momento se desconoce con exactitud qué isoforma de FGFs se une a cada receptor para dirigir cierto proceso celular en particular; sin embargo, existe evidencia que sugiere que FGF2 activa principalmente a FGFR1 (Nurcombe y cols, 2000).

FGFR1

La señalización a través de FGFR1 regula varios procesos celulares como la proliferación, migración, supervivencia celular y angiogénesis (Nguyen y cols, 2013).

La sobreexpresión de FGFR1 está relacionada con cambios en el citoesqueleto, específicamente con la reestructuración de actina y la adquisición de una morfología fibroblastoide (Strutz y cols., 2002).

Por otro lado, se ha asociado la amplificación de FGFR1 con los casos de reincidencias y la baja tasa de supervivencia del cáncer. De hecho, la amplificación de la región cromosomal 8p11-12, donde se localiza el gen que codifica este receptor, aparece en aproximadamente un 10% de los cánceres (Wesche y cols., 2011). En algunos tipos de cáncer como en próstata y pulmón, FGFR1 ha sido considerado como un oncogén y su expresión se ha visto elevada en comparación con el tejido normal (Nguyen y cols, 2013).

Algunos estudios empleando líneas celulares de mama y modelos animales sugieren el papel de la señalización a través de FGFR1 en el proceso de carcinogénesis mamaria y demuestran que la activación de FGFR1 promueve la proliferación e invasión celular (Wesche y cols., 2011).

Vías de señalización

En las células cancerígenas la unión de un factor de crecimiento con su receptor promueve la activación de diversas cascadas de señalización intracelulares que controlan procesos celulares vitales como la proliferación, la diferenciación, la migración y la supervivencia celular (Wesche y cols., 2011). La transducción de estas señales generalmente conlleva a un reclutamiento de cinasas, tales como MAPK, PI3K y PLCγ, que pueden afectar directamente la integridad epitelial o dirigir la transcripción de factores reguladores de la Transición Epitelio-Mesénquima como son Snail, Slug, Twist o Zeb. La combinación de estos

elementos modulan diversas etapas de la progresión tumoral (Said y Williams, 2009; Witsch y cols., 2010).

La cascada de señalización de los miembros de la familia de FGFs de tipo parácrino está regulada en parte por su afinidad a las moléculas de proteoglicanos heparán sulfato presentes en la matriz extracelular y en parte por la dimerización de algunos FGFs (Itoh y Ornitz, 2011).

Los HSPGs consisten en un núcleo de un proteoglicano que une dos o tres polisacáridos lineales (cadenas de heparán sulfato). Se encuentran en la superficie celular y en la matriz extracelular, donde interactúan con una gran cantidad de ligandos. En la membrana, los HSPGs actúan como correceptores para diversos receptores de factores de crecimiento, regulando su umbral de activación o la duración de la señalización (Sarrazin y cols., 2011). Los FGFs se unen a los polisacáridos cargados negativamente de los HSPGs mediante interacciones electrostáticas. El sitio de unión para las cadenas de proteoglicanos heparán sulfato (HBS) se compone del bucle formado por β 1- β 2 y parte de la región que abarca β 10 y β 12 (Beenken y Mohammadi, 2009). De esta manera, los HSPGs participan en la formación del complejo FGF-FGFR y evitan su degradación (Wesche y cols., 2011).

La unión de los diferentes FGFs (parácrinos) a su receptor induce la dimerización funcional y la formación de un complejo conformado por 2 ligandos, 2 receptores y 2 cadenas de HSPGs (figura 15). Posteriormente, la activación del dominio intracelular cinasa y la auto-fosforilación de residuos de tirosina que actúan como sitios de acoplamiento para proteínas adaptadoras, conducen a la activación de dos principales vías de señalización: PLC γ 1 (también conocida como FRS1) y FRS2 (Beenken y Mohammadi, 2009; Itoh y Ornitz, 2011).

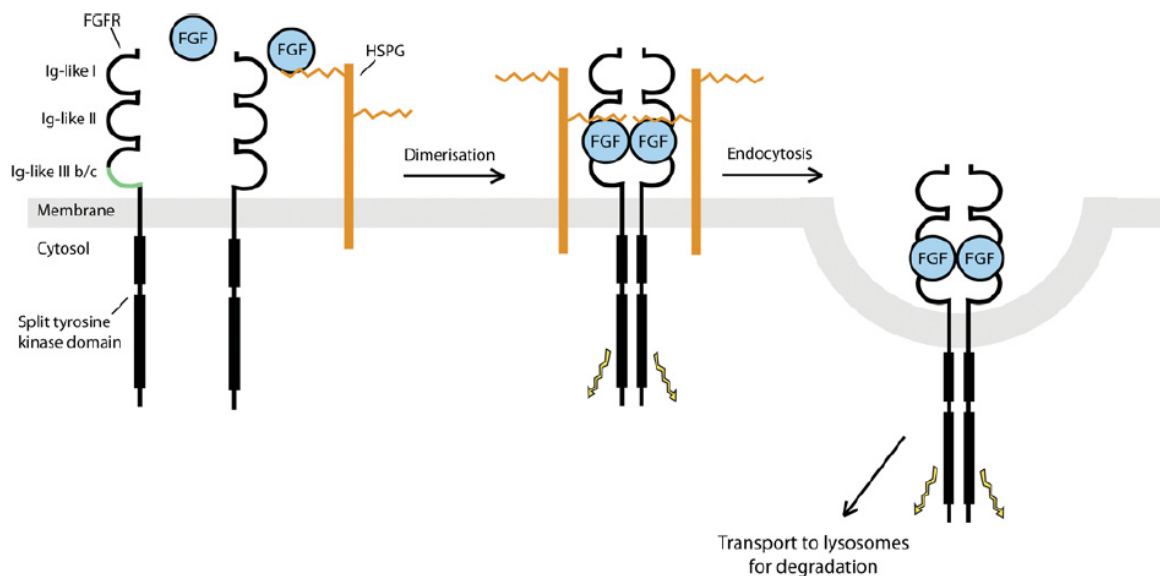


Figura 15. Complejo FGF-FGFR-HSPGs con el que inicia la señal. La estructura básica de un FGFR se muestra en el lado izquierdo. Un FGFR es un clásico RTK que consiste en un solo dominio transmembrana con una región extracelular compuesta de tres dominios tipo Ig (I-III), y una región intracelular que contiene un dominio de tirosina cinasa escindible. El complejo formado por dos FGFs, dos cadenas de heparán sulfato y dos FGFRs provoca la dimerización y transfosforilación por las cinasas en varios residuos de tirosina en la parte intracelular de los FGFRs, causando la activación de cascadas de señalización río abajo. Después de la activación, el complejo se internaliza mediante endocitosis y se transporta a los lisosomas para su degradación (Wesche y cols., 2011).

En FGFR1 se han identificado ocho sitios de fosforilación (Tyr⁴⁶³, Tyr⁵⁸³, Tyr⁵⁸⁵, Tyr⁶⁵³, Tyr⁶⁵⁴, Tyr⁶⁷⁷, Tyr⁷³⁰ y Tyr⁷⁶⁶). Algunos de estos actúan como sitios de acoplamiento para diversas moléculas de señalización que contengan dominios SH2. Una de ellas es PLC γ que se une a la fosfotirosina Tyr⁷⁶⁶ en el extremo C-terminal de FGFR1 cuando es activado. PLC γ hidroliza PIP₂ para producir DAG e IP₃, el cual desencadena la liberación de calcio y la activación de PKC (Wesche y cols., 2011).

Por otro lado, la proteína adaptadora FRS2 actúa como un sitio donde convergen varias vías de señalización luego de que los FGFRs sean activados. Esta se une a la región yuxtamembranal del receptor y es fosforilada en varios residuos de tirosina, creando sitios de acople para otras proteínas adaptadoras. Una de ellas

es GRB2 que vincula la activación de la vía de señalización Ras/MAPK a través del factor intercambiador de nucleótido de guanina SOS así como la vía PI3K/Akt a través de GAB1 (Figura 16) (Beenken y Mohammadi, 2009; Wesche y cols., 2011).

Además, se han reportado muchas otras moléculas de señalización que pueden ser activadas por los FGFRs, como son RSK2, STATs y Src (Wesche y cols., 2011).

Algunos FGFs pueden actuar también intracelularmente de manera directa. Diversos estudios han demostrado que tras ser estimuladas las células con FGF2 pueden endocitar FGFR1 al citosol. De esta manera, el receptor transloca al núcleo junto con su ligando. En 1997 Stachowiak demostró que el FGFR1 en el núcleo es capaz de estimular la transición de G0/G1 a la fase S del ciclo celular. Además, en el núcleo, FGFR1 actúa como un factor de transcripción que activa diversos genes relacionados con el crecimiento y diferenciación celular (Beenken y Mohammadi, 2009; Nguyen y cols, 2013).

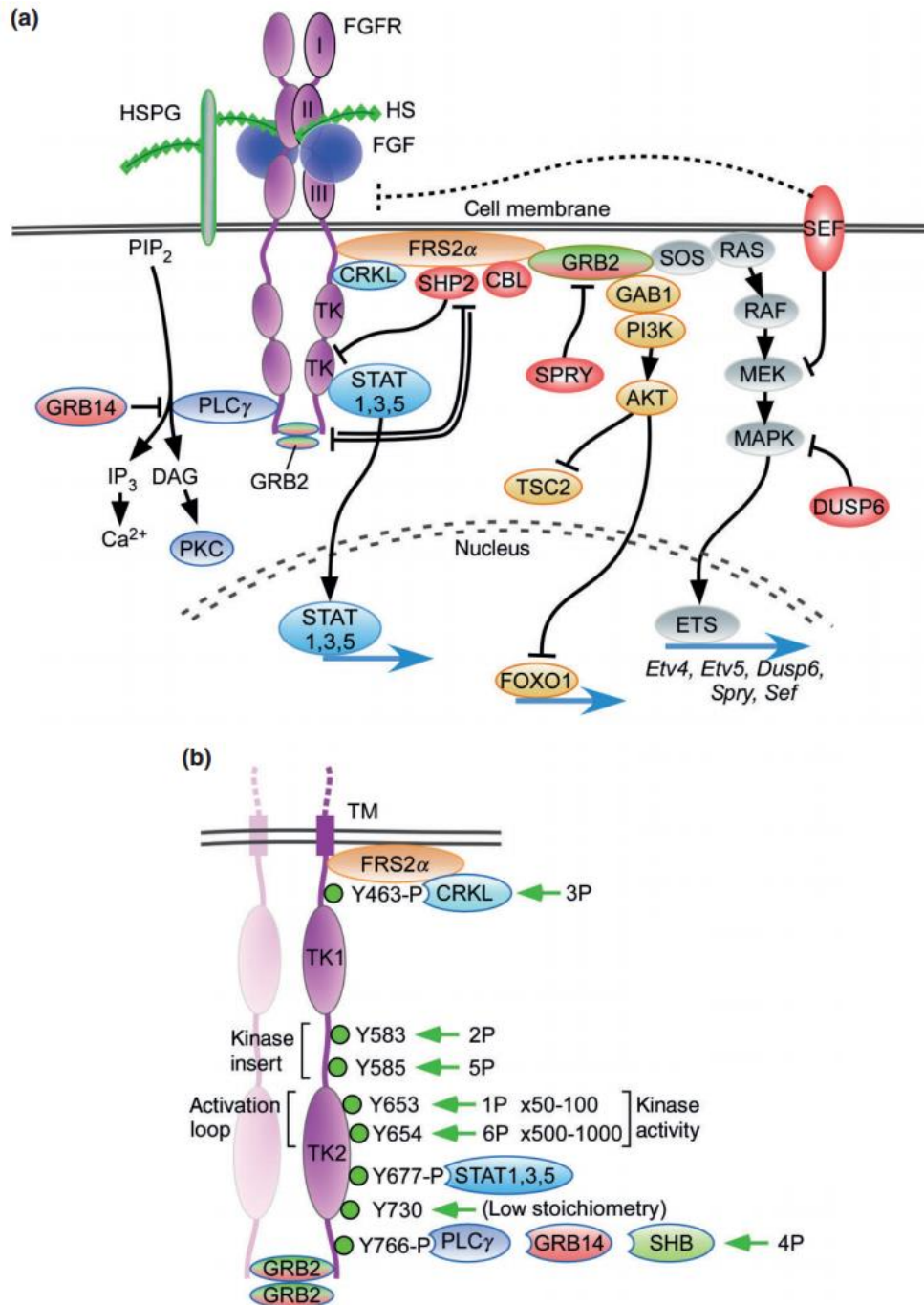


Figura 16. Vía de señalización de FGF. **a)** la unión de FGFs de tipo canónico a su receptor con HSPG como cofactor induce la formación del complejo FGF-FGFR-HSPG, el cual activa el dominio intracelular tirosinasa mediante la fosforilación de residuos de tirosina específicos. El receptor activado es acoplado a la vía de señalización de RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ , and STAT. Las moléculas en rojo actúan inhibiendo la señalización de FGFR. **b)** La dimerización de FGFR1 conduce a la fosforilación de residuos de tirosina (1P–6P) lo cual incrementa la actividad cinasa y la fosforilación de tirosinas que sirven como sustratos para la unión de CRKL, STAT, GRB14, y PLC γ (Ornitz e Itoh, 2015).

Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)

Todos los tejidos en el organismo requieren de un aporte de oxígeno y nutrientes proporcionado a través de la vasculatura circundante. La formación de estos vasos puede ocurrir por medio de dos procesos: la vasculogénesis (formación de *novo* a partir de precursores endoteliales llamados angioblastos) y la angiogénesis (a partir de vasos sanguíneos preexistentes), siendo este último el proceso implicado durante el desarrollo del tumor (R.M.B. Loureiro y cols., 2005).

Aunque la vasculatura tumoral difiere en algunos aspectos que en el resto de los tejidos, diversos elementos comunes están asociados en su desarrollo y mantenimiento como son: PDGF, TGF- β , VEGF, FGF2, la angiopoyetina 1 y 2, algunas MMPs y componentes de la matriz extracelular como laminina, fibronectina, colágeno y elastina, entre otros (R.M.B. Loureiro y cols., 2005).

Diversos estudios han concluido que la densidad microvascular del tumor es un marcador del pronóstico de la enfermedad (Larsson y cols., 2002). Cada vez existe más evidencia sobre la relación entre la expresión de VEGF (tanto en la circulación como en el tumor) y el diagnóstico desfavorable de los pacientes con cáncer. Es expresado en una gran diversidad de tipos celulares incluyendo las células tumorales. Se ha reportado una sobreexpresión de VEGF en una amplia gama de cánceres como son: pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico, de mama, cervicouterino, de ovario, entre otros (Huang y cols., 2004; R.M.B. Loureiro y cols., 2005).

VEGF es miembro de una familia de integrada por seis proteínas relacionadas estructuralmente: VEGF-A, -B, -C, -D, -E y el Factor de Crecimiento Placentario. VEGF-A (también llamado Factor de Permeabilidad Vascular o simplemente VEGF) es considerado un potente inductor de angiogénesis, actúa como mitógeno para las células endoteliales promoviendo su proliferación y migración, regula también la migración de las células de músculo liso vasculares, la formación de tubos vasculares e incrementa la permeabilidad microvascular (Larsson y cols., 2002; R.M.B. Loureiro y cols., 2005).

Se han descrito tres receptores para VEGF expresados en las células endoteliales: VEGFR1 (flt-1), VEGFR2 (flk-1) y neurofilina-1. VEGFR2 es el principal receptor responsable de la señalización durante la división y migración de células endoteliales. Sin embargo, aunque VEGFR1 posee una mayor afinidad por VEGF, no participa en este proceso durante la embriogénesis. Por otro lado, se cree que neurofilina-1 actúa como co-receptor para potenciar la actividad de VEGFR2 (R.M.B. Loureiro y cols., 2005).

Regulación de VEGF

Aunque se conoce poco acerca de la regulación de VEGF, resulta esencial durante el proceso de embriogénesis así como en el mantenimiento vascular durante la vida del adulto; además, se ha reportado que este factor de crecimiento juega un papel crítico durante el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis teniéndose un mayor conocimiento sobre su regulación en estados patológicos. VEGF es sobreexpresado en la mayoría de los tumores y se sabe que su expresión en la condición tumoral es regulada por un amplio número de efectores incluyendo factores de crecimiento, citocinas, oncogenes, hormonas, entre otros.

La transcripción de VEGF puede ser regulada directamente en el sitio promotor o fuera de este a través de potenciadores o represores. El sitio promotor de VEGF no contiene elementos típicos de reconocimiento e iniciación sino que es regulado por un sitio de unión a Sp1 que consiste en 50 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Muchos estudios in vitro han demostrado que esta región rica en GC juega un importante rol tanto en el control de la expresión basal del VEGF como en la inducción mediada por numerosos. La regulación transcripcional tiene un papel muy importante en la regulación de los niveles de VEGF en la condición tumoral y el hecho más sorprendente en el cáncer es que esta se lleva a cabo a través de diversos mecanismos (Salimath y cols., 2000; Larsson y cols., 2002; R.M.B. Loureiro y cols., 2005).

Factor Inducible de Hipoxia-1 (HIF-1)

La rápida proliferación de células tumorales a menudo excede la tasa de neovascularización y por lo tanto el suministro de oxígeno resulta inadecuado para las regiones alejadas de los vasos sanguíneos funcionales lo cual conduce al desarrollo de las zonas hipóxicas en la masa tumoral (Chiavarina y cols., 2012; Lv Y y cols., 2015).

Diversos estudios han establecido la regulación de VEGF por la condición de hipoxia. A nivel transcripcional, resulta de gran interés el sitio HRE, que forma parte de la región promotora de VEGF; este es sitio de unión del Factor Inducible de Hipoxia 1 (HIF-1), el cual es capaz de potenciar la transcripción de VEGF (R.M.B. Loureiro y cols., 2005).

HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico formado la subunidad HIF-1 β (o ARNT) que es expresada de manera constitutiva y HIF-1 α que incrementa sus niveles durante la condición de hipoxia (R.M.B. Loureiro y cols., 2005).

La subunidad HIF-1 α posee una estructura de hélice-bucle-hélice y posee un dominio bHLH-PAS necesario para la unión con la subunidad HIF-1 β y un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) (figura 17) (Ke Q y Costa, 2006).

Durante condiciones de normoxia, la proteína VHL se une a HIF-1 α y regula su degradación por ubiquitinación. La proteína p53 puede regular también la degradación de HIF-1 α por proteólisis. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, la subunidad HIF-1 α se estabiliza y es translocada al núcleo donde dimeriza con la subunidad HIF-1 β . Este dímero se une a elementos de respuesta a hipoxia (HRE; 5'-RCGTG-3') dentro del sitio promotor de sus genes blanco para inducir su transcripción (R.M.B. Loureiro y cols., 2005)

Otras moléculas como óxido nítrico y monóxido de carbono pueden regular también la transcripción de VEGF a través de la regulación de la transcripción de HIF-1 α , aumentando su estabilidad y afinidad por el elemento HRE.

Se ha observado que los tumores deficientes de HIF-1 α presentan una expresión reducida de VEGF, un menor número de vasos y alteración de la función vascular por lo que, de manera general, se cree que la inducción de VEGF por la hipoxia es siempre regulada por HIF-1 y el elemento HRE; sin embargo, estudios recientes han demostrado resultados contradictorios, no encontrando diferencia en la expresión de VEGF y la vasculatura en tumores deficientes de HIF-1 α . En células cancerígenas de colón se ha descrito la inducción de la transcripción de VEGF durante la condición de hipoxia independiente de HRE.

Asimismo, se ha propuesto un nuevo mecanismo que involucra la participación de RTEF-1 el cual es sobreexpresado durante la condición de hipoxia y es capaz de unirse al sitio de unión a Sp1 dentro del sitio promotor de VEGF; sin embargo, se desconoce si este mecanismo funciona en otros tipos celulares aunque permite pensar en la posibilidad de la existencia de otros mecanismos que permitan la regulación de VEGF.

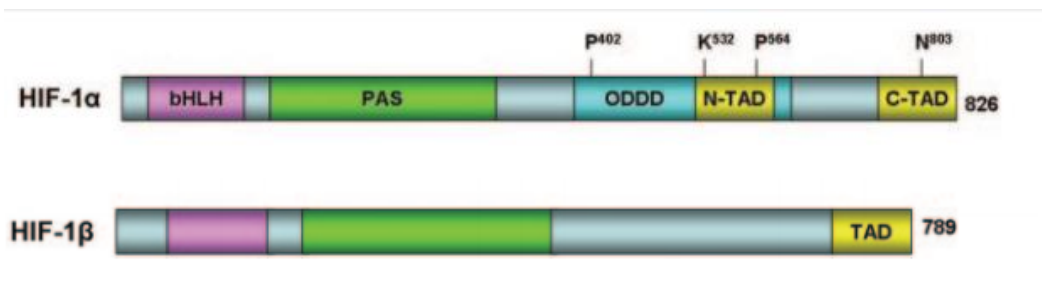


Figura 17. Estructura de HIF-1 α y HIF-1 β . HIF-1 α contiene un dominio ODDD que regula su estabilidad mediada por oxígeno a través de la hidroxilación de dos residuos de prolina (P) y la acetilación de una lisina (K). Se aprecia el número total de aminoácidos de cada subunidad (Ke Q y Costa, 2006).

Planteamiento del problema

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y cada año la incidencia y el número de muertes por cáncer se incrementa de manera alarmante. En México, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente y el de más alta mortalidad en la población femenina. Cada año se detectan entre 18 mil y 20 mil nuevos casos y cerca del 70% llega a etapas avanzadas. Se estima que cada día mueren 15 mujeres en el país a causa de este padecimiento.

La tasa de mortalidad en las mujeres que padecen cáncer de mama es alta debido principalmente a la capacidad de desarrollar metástasis hacia otros tejidos y a la falta de un diagnóstico oportuno en etapas tempranas del desarrollo del tumor.

Además de la regulación hormonal, una compleja red de elementos interviene en la biología de la glándula mamaria, por lo que los procesos que controlan el crecimiento normal y la diferenciación de las células mamaria siguen siendo poco conocidos. Por otro lado, se ha descrito que es a través del proceso de Transición Epitelio-Mesénquima mediante el cual las células malignas adquieren las características que les permiten proliferar, invadir y realizar metástasis.

La TEM es regulada por diversos mensajeros extracelulares, como son los factores de crecimiento, tal es el caso del Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2). Existe evidencia que sugiere la participación de FGF2 tanto en el desarrollo normal de la mama, como en la progresión tumoral; sin embargo, esta resulta contradictoria e incompleta desconociéndose hasta el momento con certeza el mecanismo molecular involucrado así como su posible desregulación principalmente en estadios avanzados del cáncer que permitan esclarecer el papel de este factor de crecimiento en el mantenimiento de un fenotipo maligno por parte de las células tumorales.

Conocer el espectro completo de señalización de los factores inductores del cáncer permitiría establecer estrategias terapéuticas efectivas aún en etapas avanzadas de la enfermedad por lo que este trabajo de investigación se centra en estudiar el papel de FGF2 en un modelo celular proveniente de cáncer de mama altamente maligno, la línea MDA-MB-231.

Hipótesis

El Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2) mantiene el fenotipo mensesquimal de las células MDA-MB-231, estimulando su capacidad metastásica.

Objetivos

General

Determinar el mecanismo molecular mediante el cual el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2) mantiene el fenotipo mesenquimal de las células MDA-MB-231.

Específicos

1. Determinar la presencia del ARNm que codifica para FGF2 y su receptor específico, FGFR1, en la línea celular MDA-MB-231.
2. Investigar si la presencia de FGF2 exógeno exacerba la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231.
3. Evaluar el efecto que ejerce el FGF2 exógeno sobre la capacidad proliferativa de la línea celular MDA-MB-231.
4. Determinar si el efecto que ejerce FGF2 sobre la capacidad migratoria en las células MDA-MB-231 depende de la concentración empleada.
5. Analizar los niveles de expresión de los Factores de Transcripción asociados a la Transición Epitelio-Mesénquima en la línea celular MDA-MB-231 en presencia y ausencia de FGF2.
6. Examinar si la presencia de FGF2 modifica la expresión del ARNm que codifica para el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial A (VEGF-A), el Factor Inducible de Hipoxia-1 (HIF-1) e Interleucina 6 (IL-6).

Material y métodos

Línea celular MDA-MB-231

Para el presente proyecto se empleó como modelo experimental la línea celular MDA-MB-231, la cual fue adquirida a la empresa American Type Culture Collection (ATCC) de los Estados Unidos de América.

Las células MDA-MB-231, es un línea celular de cáncer mama altamente metastásica, obtenidas a través de una efusión pleural, de una mujer caucásica de 51 años; es una línea celular hormono-independiente, clasificada por la ATCC como triple negativo debido a que no posee receptor de estrógeno (ER-), receptor de progesterona (PR-) ni HER2 (HER2-).

Cultivo celular

Para realizar el cultivo de la línea celular MDA-MB 231, el criovial madre se descongeló a baño maría por 90 segundos a 35°C y el contenido celular se resuspendió en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (Advanced-DMEM), suplementado con 3% de SFB, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico; esto en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Posteriormente, el contenido fue sembrado en un matraz de cultivo de 25 cm² de superficie y mantenido en incubación a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂ con medio de cultivo que fue renovado cada 72 horas.

Cada tres días aproximadamente (según el comportamiento del crecimiento de las células), el cultivo fue sometido a un proceso de tripsinización como se describe a continuación: se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados consecutivos con PBS estéril. Con el objetivo de despegar las células del sustrato del matraz se les añadió 2 ml de tripsina al 0.25%; tras cinco minutos de reposo, se adicionaron 4 ml de medio de cultivo y se resuspendió mecánicamente con ayuda de una pipeta. La suspensión celular fue transferida a un tubo cónico de 15 ml y centrifugada a 1,200 rpm durante 5 minutos; por último, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 4ml de medio de cultivo, a partir de

la cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre en nuevos matraces y sembrar las células para los experimentos posteriores.

Para los ensayos de migración de cierre de herida, proliferación y expresión génica, se utilizaron cultivos en placas de seis pozos a las cuales se le agregaron 2 ml de medio de cultivo por pozo y 50µl de la suspensión celular. Las células crecieron formando una monocapa y, una vez que alcanzaron una confluencia deseada (dependiendo del experimento realizado), se iniciaron los diferentes tratamientos a diferentes concentraciones o a diferentes tiempos con FGF2, empleando en cada serie experimental un pozo como condición control es decir, sin recibir tratamiento.

Para ensayos de migración en cámaras Transwell, se utilizaron placas de 24 pozos en los que se sembraron 20 000 células y se incubaron durante 12 horas con los tratamientos correspondientes.

Método de tinción celular

Se empleó la tinción con cristal violeta para teñir las células MDA-MB-231 en los ensayos de migración. Tras someter a las células al tratamiento con FGF2, fueron lavadas dos veces con PBS 1X, seguido de la fijación durante 30 minutos con una solución en una proporción 1:1 de metanol/acetona a 4°C. Posteriormente, se retiró la solución fijadora y se incubó con el colorante cristal violeta durante 20 minutos a temperatura ambiente; finalizada la tinción, se realizaron de tres a cuatro lavados con agua tridestilada para eliminar los restos de colorante. Las muestras se preservaron hidratadas con agua tridestilada hasta la obtención de la fotografías.

Ensayo de migración

Ensayo de cierre de herida

Se efectuó un ensayo preliminar de cierre de herida con diferentes tratamientos de FGF2 a diferentes concentraciones (25 pM, 100 pM, 250 pM, 600 pM y 1000 pM). Se realizó una herida a la monocapa confluyente con la punta de una micropipeta en el eje X de los pozos y se retiró el exceso de células del medio mediante lavados con PBS. Transcurridas las primeras 15 horas de incubación a 37°C, se realizó la fijación y tinción celular y se tomaron 5 fotografías en campos arbitrarios con un microscopio óptico utilizando un objetivo de 4X para verificar cambios en la migración celular inducida por FGF2. Con ayuda del software *ImageJ*, se midió el área delimitada por los bordes de la herida.

Ensayo en cámara Transwell

Se empleó el ensayo de migración en cámaras Transwell con poros de 8 µm de diámetro para evaluar la migración de las células MDA-MB-231.

Se sembraron 20 000 células en el compartimento superior de la cámara en medio DMEM libre de suero. En el compartimento inferior de la cámara se colocaron 500 µL de medio con las diferentes condiciones de tratamiento de FGF2 (25 pM, 100 pM, 250 pM, 600 pM y 1000 pM). Luego de 12 horas de incubación a 37°C se retiró el medio de cultivo de los dos compartimentos y con un hisopo se eliminó el exceso de células en la parte superior de la membrana. Las células que lograron migrar hacia la parte inferior a través de los poros de la membrana fueron fijadas y teñidas y se obtuvieron 5 fotografías en campos arbitrarios a 10X para realizar el conteo celular con ayuda del software *ImageJ*. Los datos fueron expresados en una gráfica como porcentaje de migración con respecto de los valores obtenidos del control (células sin estímulo).

Ensayo de proliferación

Con el fin de evaluar la proliferación celular inducida por el tratamiento de FGF2, se empleó el método directo de conteo celular.

Se realizó el cultivo celular en placas de 6 pozos. Una vez alcanzada una confluencia del 80% se inició el tratamiento de FGF2 a una concentración de 600 pM y se incubó durante 24 horas. Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X no estéril; tras los lavados, se incubaron durante 5 minutos en agitación con 500 µL de tripsina no estéril, al finalizar la incubación se añadió 1.5 mL de PBS; el contenido de la placa fue resuspendido y se realizó el conteo con el contador de células *SCEPTER™ 2.0 Cell Counter (Millipore)*. La concentración de células fue expresada como el número de células por mililitro de solución.

Ensayo de expresión génica

Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total utilizando el kit *Quick-RNA™ (MiniPrep)* siguiendo las instrucciones de uso.

Se aspiró el medio de cultivo de cada pozo en la placa y se realizaron dos lavados con PBS 1X no estéril; se agregaron 500 µL de buffer de lisis y, tras dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente, el contenido fue transferido a una columna colocada en un tubo colector. Se centrifugó durante 3 minutos a 12,000 g y se desechó el contenido del tubo colector. Con el objetivo de purificar el ARN, la muestra fue sometida a lavados con las soluciones del kit: se realizó un lavado con buffer de prelavado y dos con el buffer de lavado. Tras cada lavado, la muestra se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos desechando el contenido del tubo colector en todo momento. Por último, la columna fue transferida a un tubo de 1.5 mL estéril y se agregaron 50 µL de agua libre de nucleasas para eluir el ARN contenido en el filtro de la columna. Se dejó reposar la muestra durante 2 minutos

a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12,000 g por 5 minutos para obtener el filtrado conteniendo el ARN.

Cuantificación de ARN

Posterior a la extracción, se cuantificó la concentración y calidad del ARN extraído mediante espectrofotometría. Para ello, se empleó una dilución con 4 μL de la muestra y 196 μL de agua estéril para obtener un volumen final de 200 μL ; la concentración fue evaluada a una longitud de onda de 260 nm y la integridad del ARN se evaluó como el cociente obtenido entre las longitudes de onda 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}). El valor del cociente obtenido debió ubicarse en un rango de 1.6 – 2.0 para considerarse como una muestra de ARN de buena calidad y poder ser empleado en los ensayos de RT-PCR.

RT-PCR

Para la síntesis de la primera cadena de Ácido Desoxirribonucleico complementario al ARN extraído (ADNc), se empleó el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se hizo un “master mix” (mezcla de componentes) como se muestra en la tabla de la figura 18 del cual se añadieron 9 μL de forma común a todas las muestras.

Reactivo	Volumen
Buffer RT	2 μl
dNTP's	0.8 μl
Iniciadores aleatorios	2 μl
Transcriptasa Reversa (MultiScribe™)	1 μl
Agua	3.2 μl
	Total: 9 μl

Figura 18. Contenido del tubo de reacción para la retrotranscripción según el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*.

Para cada tubo de reacción se empleó un volumen final de reacción de 20 μL , por lo que el volumen restante (11 μL) fue completado con la muestra de ARN más agua.

Se realizaron los cálculos para conocer el volumen de la muestra de ARN que se requería por cada tubo de reacción mediante una “regla de tres” de forma que cada uno de ellos contuviera 2 μg de ARN.

CONDICIÓN	CONCENTRACIÓN DE ARN	
	X μg	_____ 1000 μL
“X”	2 μg	_____ x \rightarrow Volumen de muestra requerido

Se empleó un termociclador *Mastercycler gradient (Eppendorf)* para realizar el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C, finalmente la temperatura de los tubos se llevó 4°C, para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

El ADNc obtenido, fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimierasa (PCR) semi-cuantitativa, con la finalidad de evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica los diversos elementos de interés para este proyecto utilizando los oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos listados en la tabla de la figura 19.

Se utilizó la enzima *Dream Taq PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific)* y se prepararon tubos de reacción con un volumen final de 20 μL como se especifica en la figura 20.

PRIMER	DIRECCIÓN	SECUENCIA (Dirección: 5'- 3')	T _m (°C)	% GC	Tamaño esperado (bp)
FGF2	Forward	TGAAACGAACTGGGCAGTATAA	54.1	40.9	627
	Reverse	TTGACCTGACTGTGGAAGAAC	54.7	47.6	
FGFR1	Forward	GAGGCTACAAGGTCCGTTATG	55.1	52.3	360
	Reverse	CCATCTCTTTGTCCGGTGGTATTA	54.3	43.4	
VEGF-A	Forward	GGAAGAGGAGGAGATGAGAGA	54.8	52.3	368
	Reverse	CTCAGAAGCAGGTGAGAGTAAG	54.5	50	
HIF-1 α	Forward	TCTCCATCTCCTACCCACATAC	61.7	50	288
	Reverse	GATCGTCTGGCTGCTGTAATAA	63.0	45.4	
IL-6	Forward	GAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGT	60.6	40	388
	Reverse	GCGCAGAATGAGATGAGTTGT	64.3	47.6	
SNAIL1	Forward	CCTTCGTCCTTCTCCTCTACTT	61.7	50	388
	Reverse	GGCACTGGTACTTCTTGACATC	62.5	50	
SNAIL2	Forward	CTCTCTCCTCTTTCCGGATACT	61.7	50	235
	Reverse	CAGTGCAGCTGCTTATGTTTG	63.5	50	
TWIST	Forward	AGCTGAGCAAGATTCAGACCCTCA	60.0	50	452
	Reverse	AGAATGCAGAGGTGTGAGGATGGT	60.1	50	
ZEB1	Forward	TTCAGCATCACCAGGCAGTC	66.6	55	736
	Reverse	GAGTGGAGGAGGCTGAGTAG	60.6	60	
β -Actina	Forward	CAAAGACCTGTACGCCAACAC	64.4	52.3	218
	Reverse	CATACTCCTGCTTGCTGATCC	63.7	52.3	

Figura 19. Especificaciones de los oligonucleótidos empleados.

Reactivo	Volumen
Dream Taq	10 μ L
Primer Forward	1 μ L
Primer Reverse	1 μ L
Agua	6 μ L
ADNc	2 μ L
Total:	20 μL

Figura 20. Contenido del tubo de reacción para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El protocolo de PCR, como el fundamento de la técnica lo establece, se realizó contemplando las siguientes fases:

- Inicio: Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94°C que se mantiene durante 5 minutos.
- Desnaturalización del ADNc: esta etapa se logra al calentar las muestras a 94°C durante 30 segundos.
- Alineación: la temperatura desciende, de tal manera que los oligonucleótidos “forward” y “reverse” se alineen con sus secuencias complementarias, la temperatura requerida dependerá de la temperatura de alineamiento específica para cada oligonucleótido. La duración de esta etapa es de 30 segundos
- Extensión: la temperatura aumenta hasta los 72°C por un minuto para permitir que la enzima Taq polimerasa se una a cada iniciador y así, se sintetice una nueva cadena de ADNc.
- Elongación final: se lleva a cabo a una temperatura de 72 °C durante 10 minutos. Con ella se asegura que el ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado.
- Conservación: en este paso se lleva la temperatura a 4 °C durante un tiempo indefinido para conservar los productos de la reacción.

Estos pasos se repitieron de 30 a 40 veces dependiendo de la muestra a evaluar para así obtener múltiples copias del fragmento de interés.

Electroforesis

Se continuó el desarrollo de los experimentos con la separación electroforética de los productos obtenidos en la PCR en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio.

Para la preparación del gel se disolvieron 600 miligramos de agarosa en 50 ml de buffer TAE 1X. La solución fue calentada, se añadieron 4 µL de bromuro de etidio

(BrEt) y se vertió en la cámara de electroforesis dejando gelificar por 40 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras se cargaron en el gel con la siguiente composición: 9µL de muestra con 15µL de buffer de carga; como marcador de peso molecular, se empleó el patrón de ADN comercial *6x DNA Loading (Thermo Scientific)*.

La separación electroforética se llevó a cabo en buffer TAE a 65 Voltios durante 80 minutos; finalmente, se obtuvieron tres fotografías de cada uno de los geles en un fotodocumentador con luz UV *ChemiDoc (Bio-Rad)*.

Los geles correspondientes a cada serie experimental se corrieron por duplicado.

Densitometría

Se realizó el análisis densitométrico de las bandas presentes en las imágenes obtenidas utilizando el software *ImageJ* para concluir con el análisis estadístico correspondiente.

Análisis de datos

Una vez concluida la fase de experimentación del proyecto, se realizó el análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con ayuda del programa *SigmaPlot* en su versión 12.3.

Se empleó la prueba *t de Student* para evaluar la diferencia entre grupos que fueron tratados con respecto al grupo control, considerando un valor de significancia para $*P<0.05$, $**P<0.01$ y $***P<0.001$. Las gráficas representativas de cada experimento muestran el valor promedio de tres ensayos realizados de manera independiente \pm el error estándar.

Resultados

1. La línea celular MDA-MB-231 expresa el ARNm que codifica para el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2) y el ARNm que codifica para su receptor, FGFR1.

En 1995, Penault-Illorca y colaboradores reportaron la expresión tanto de FGF2 como de FGFR1 en la línea tumoral de mama MDA-MB-231; sin embargo, otros grupos como el de Korah y colaboradores muestran resultados contradictorios por lo que, de manera inicial, se decidió evaluar la expresión basal de ambos en la línea celular MDA-MB-231. Mediante ensayos de RT-PCR se logró demostrar la presencia del ARN mensajero que codifica para FGF2 como se muestra en la figura 21. De igual manera, se determinó la presencia del ARN mensajero que codifica para su receptor, FGFR1. En la figura 21 se observa una intensa banda obtenida que demuestra una expresión significativa de FGFR1 en esta línea celular.

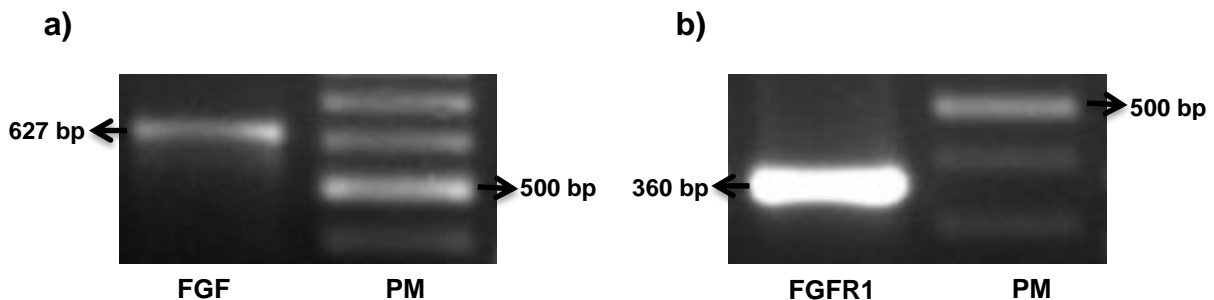


Figura 21. Expresión basal del ARN mensajero que codifica para el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2) y su receptor, FGFR1. **a)** Los geles obtenidos muestran una ligera banda de 627 pares de bases que corresponde al peso esperado para FGF2. **b)** Se observa una banda intensa de 360 pares de bases que corresponde al receptor de FGF2, FGFR1. Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas y mantenidas con medio Advanced-DMEM hasta alcanzar una confluencia del 100%. Posteriormente, se realizó la extracción del ARN, la síntesis del ADN complementario (cDNA) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando los primers específicos. Los geles de agarosa al 1.2% fueron teñidos con bromuro de etidio y digitalizados mediante un fotodocumentador con luz UV.

2. FGF2 aumenta la capacidad migratoria de la línea celular MDA-MB-231.

Para determinar si FGF2 tiene algún efecto sobre la migración de las células tumorales de mama, se realizó un ensayo preliminar de cierre de herida empleando una concentración de FGF2 de 600 pM. Después de 15 horas de incubación, las células fueron fijadas y teñidas. Se obtuvieron 5 fotomicrografías en campos arbitrarios con un microscopio óptico utilizando un objetivo de 4X y se evaluó la migración celular con base en el área delimitada por los bordes de la herida. En las imágenes de la figura 22 se observa que las células tratadas con 600 pM de FGF2 muestran una mayor recuperación de la herida lo cual sugiere que FGF2 aumenta la capacidad migratoria de esta línea celular.

Con base en los resultados obtenidos, se decidió emplear el ensayo de migración en cámaras Transwell para confirmar y evaluar de manera cuantitativa los cambios observados en la migración celular inducida por FGF2. La imagen de la figura 23 muestra las fotomicrografías representativas de las condiciones empleadas así como la gráfica obtenida del promedio de 3 experimentos independientes \pm el error estándar. Se observa que las células que fueron tratadas aumentan 2.4 veces su capacidad migratoria con respecto de las células que no recibieron el tratamiento.

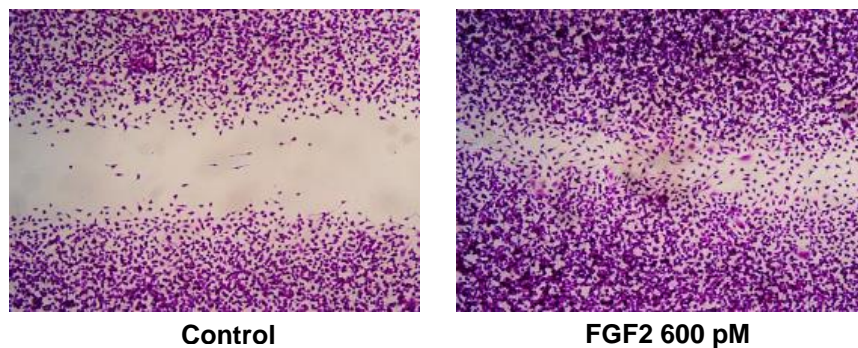
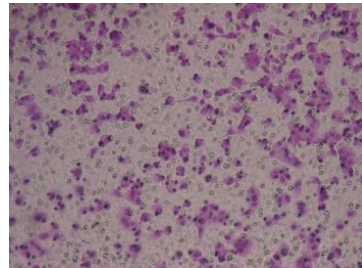
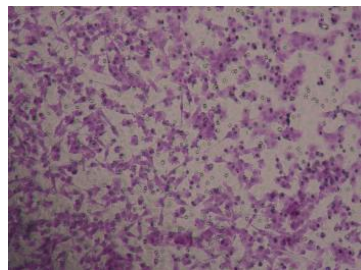


Figura 22. Ensayo de cierre de herida. Luego de que las células alcanzaron una confluencia deseada (alrededor del 70%), se realizó la herida en cada uno de los pozos y se inició el tratamiento de FGF2 por 15 horas para después ser fijadas, teñidas y observadas al microscopio para evaluar cambios en la capacidad migratoria inducida por FGF2 con respecto a la condición control. Se tomaron 5 fotografías en campos aleatorios con un objetivo de 4X y se midió el área delimitada por los bordes de la herida con ayuda del programa *ImageJ*.

a)



Control



FGF2 600 pM

b)

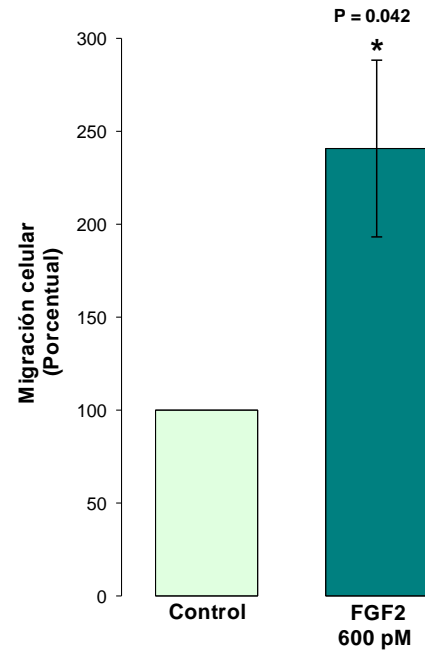
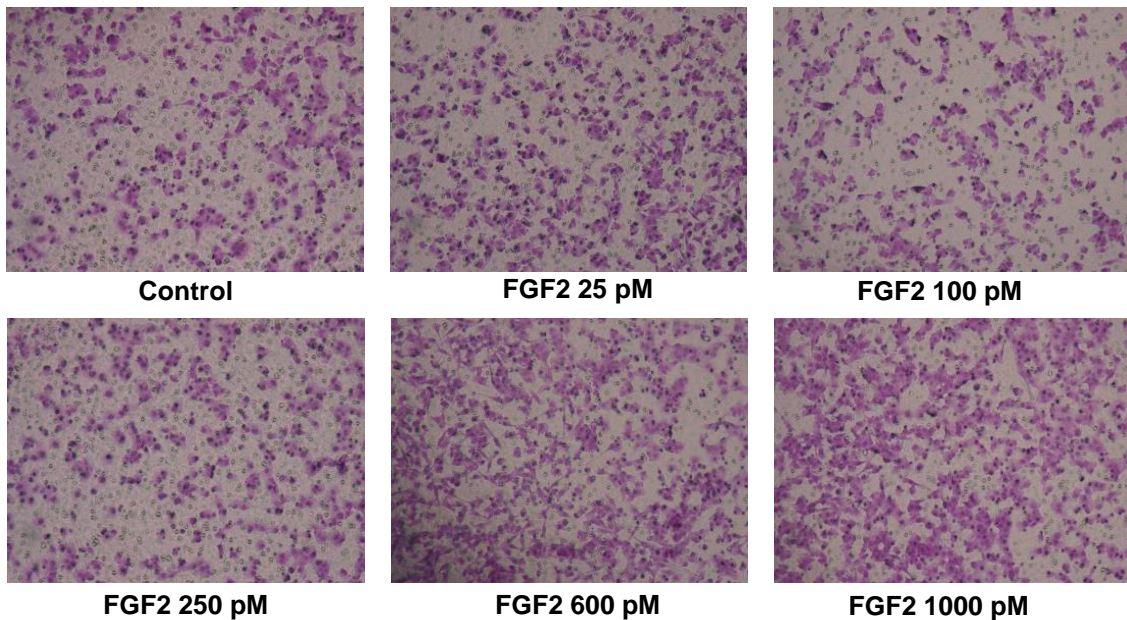


Figura 23. Ensayo de migración en cámaras Transwell. Las células fueron pretratadas por 48 horas con 600 pM de FGF2; una vez que se alcanzó el 100% de confluencia, se cosecharon y sembraron 20 000 por cámara. Luego de 12 horas, las células que lograron atravesar los poros de 8µm de diámetro presentes en la membrana fueron fijadas y teñidas. Se obtuvieron 5 fotomicrografías en campos arbitrarios con un objetivo de 10X. Con ayuda del software *ImageJ*, se contó el número de células migratorias. Se observa en **a)** una de las fotografías representativas correspondientes a cada condición (con o sin tratamiento); y en **b)**, la gráfica obtenida donde se observa un aumento significativo en la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 con respecto del grupo control con un valor de $P=0.042$. $N=3$.

3. El efecto que ejerce FGF2 sobre la capacidad migratoria en las células MDA-MB-231 es dependiente de la concentración.

Una vez demostrado que FGF2 exacerba la capacidad migratoria de la línea celular MDA-MB-231, se decidió averiguar si dicho efecto depende de la concentración empleada. Para ello se realizó una curva dosis-efecto utilizando diferentes concentraciones de FGF2 (25 pM, 100 pM, 250 pM, 600 pM y 1000 pM). Las células fueron pretratadas por 48 horas con las concentraciones correspondientes a cada pozo; una vez que se alcanzó el 100% de confluencia, se cosecharon y sembraron 20 000 células en cada cámara para cada condición experimental. Después de 12 de incubación se realizó la fijación y tinción para obtener las imágenes al microscopio. Se hizo el conteo celular utilizando el software *ImageJ* el cual revela cambios significativos en la migración celular empleando las concentraciones de 600 pM y 1000 pM con un incremento del 240.7% \pm 47.5 y 263.5% \pm 51 respectivamente (figura 24).

a)



b)

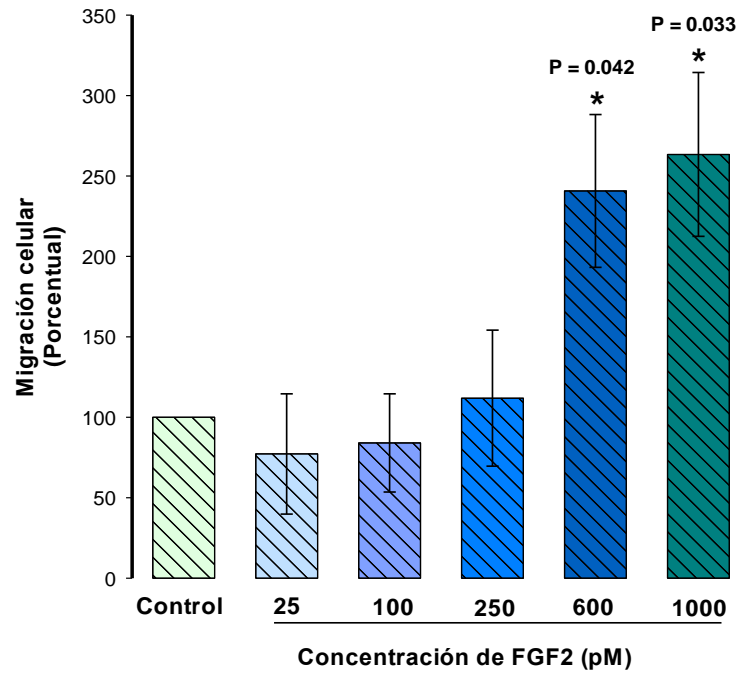


Figura 24. Efecto dosis-dependiente de FGF2 sobre la capacidad migratoria de la línea tumoral MDA-MB-231. **a)** Fotomicrografías a 10X de las células que migraron a través de la membrana de la cámara Transwell después del tratamiento a diferentes concentraciones de FGF2. **b)** Porcentaje de migración celular con respecto a la condición control. Los resultados se representan como los promedios \pm el error estándar de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$

4. FGF2 incrementa la capacidad proliferativa de la línea tumoral de mama MDA-MB-231.

El papel que tiene FGF2 sobre algunos procesos celulares y en particular sobre la capacidad proliferativa de algunas líneas tumorales resulta muy controversial. El trabajo realizado hace dos décadas por el grupo de Delehedde demostró que este factor de crecimiento estimulaba la proliferación de la línea tumoral de mama MCF-7 y por su parte, que las células MDA-MB-231 eran insensibles ante el estímulo.

Para evaluar dicho efecto, se trató a nuestro modelo experimental con una concentración de 600 pM de FGF2. Luego de 24 horas de tratamiento, se empleó el contador de células portátil *Scepter 2.0* y se demostró un aumento significativo del 21.4% \pm 4.2 en el número de células en comparación con el grupo control. La figura 25 muestra la gráfica correspondiente al conteo celular realizado.

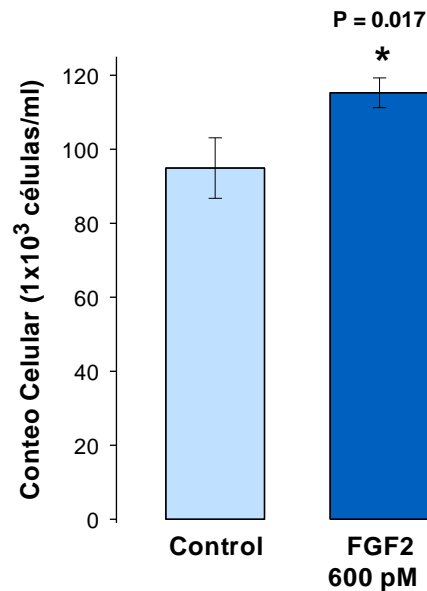


Figura 25. Efecto de FGF2 sobre la capacidad proliferativa de la línea tumoral MDA-MB-231. El conteo celular arrojó un valor promedio de 94.92×10^3 células/ml para la condición control y 115.27×10^3 células/ml para las células que fueron tratadas con FGF2. Los resultados se representan como el promedio \pm el error estándar de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$.

5. Las células MDA-MB-231 expresan el ARN mensajero que codifica para los Factores de Transcripción *Snail1*, *Snail2* y *Zeb1*.

Se decidió valorar la presencia de los Factores de Transcripción Asociados a la Transición Epitelio Mesénquima *Snail1*, *Snail2*, *Twist* y *Zeb1*. Mediante RT-PCR se evaluaron los niveles de expresión del ARNm que codifica para cada uno de ellos. La figura 26 muestra las bandas obtenidas de los geles de electroforesis y el valor promedio de las densitometrías expresado con respecto de β -actina, observando una mayor expresión basal de *Snail2* (1.03 ± 0.04 UA) con respecto a *Snail1* (0.52 ± 0.05 UA) y *Zeb1* (0.49 ± 0.07 UA), cuyos valores resultan muy similares. Por otro lado no se detectó la expresión de *Twist* en esta línea celular.

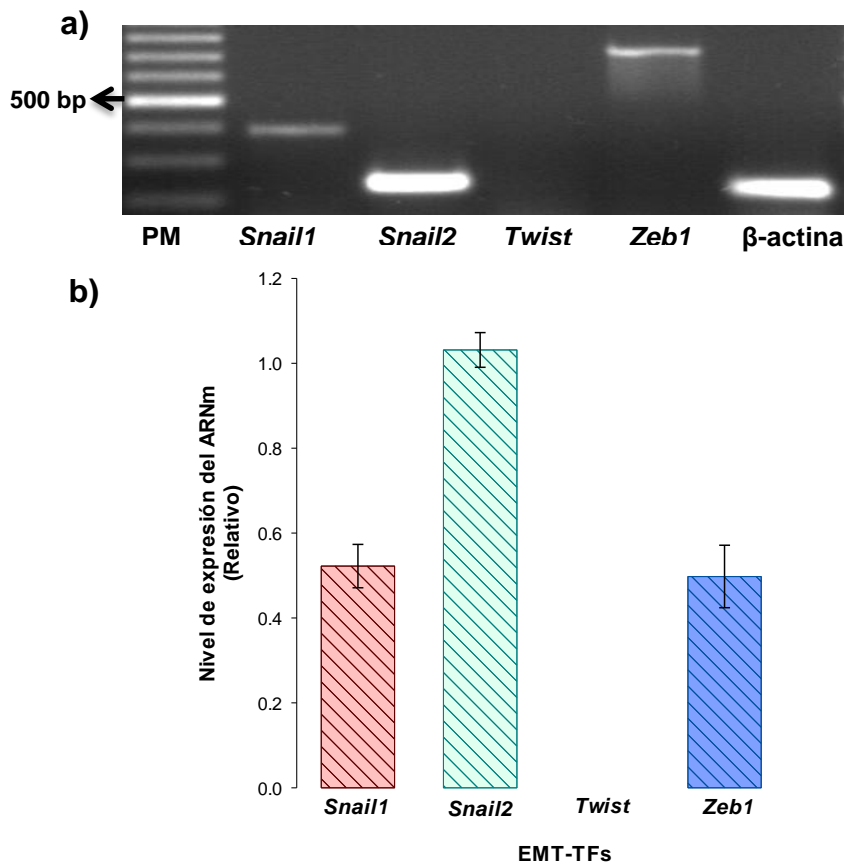
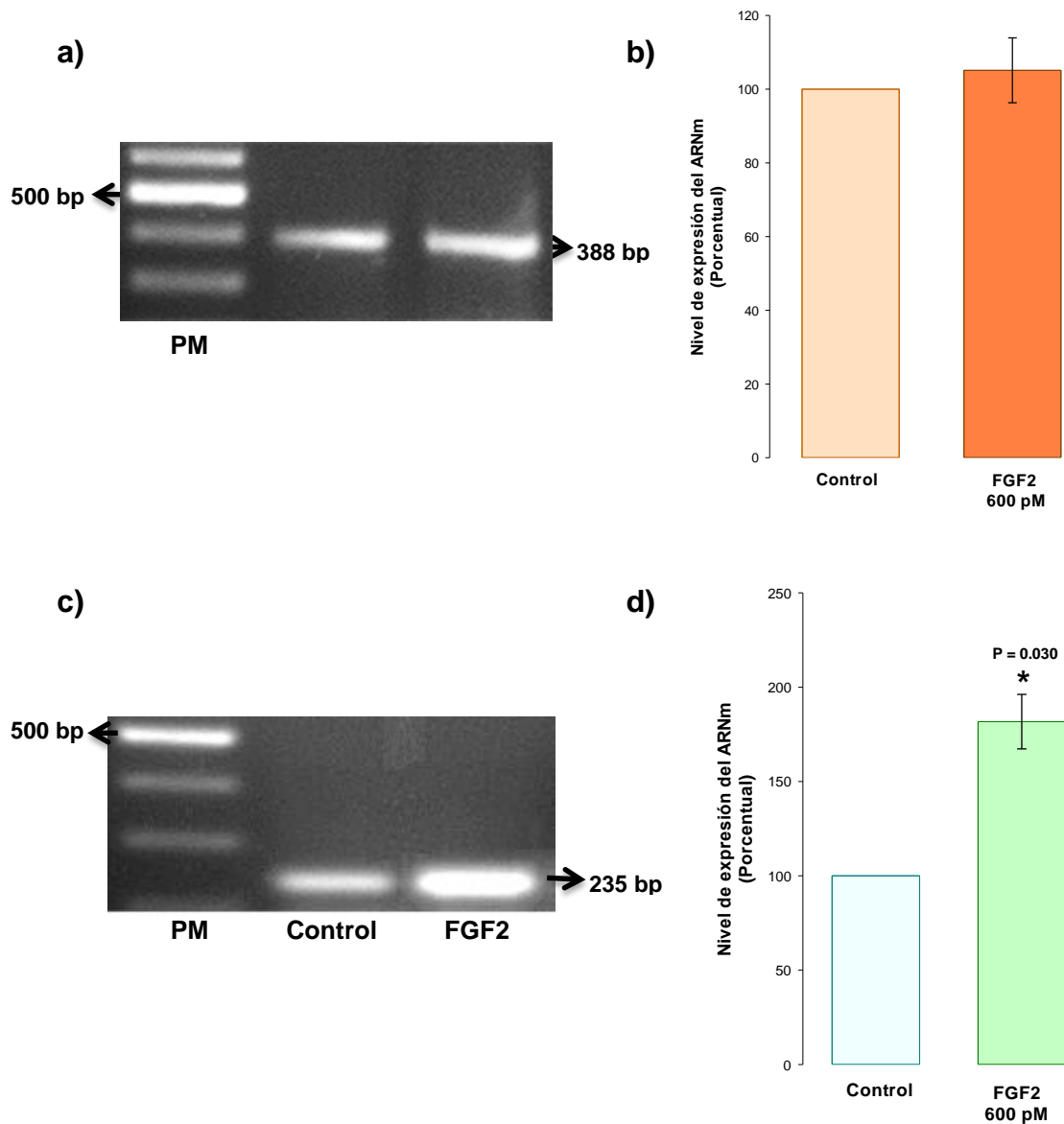


Figura 26. Nivel de expresión del ARNm que codifica para *Snail1*, *Snail2*, *Twist* y *Zeb1*. **a)** Se muestran las bandas que corresponden al ARNm que codifica para *Snail1* (388 bp), *Snail2* (235 bp) y *Zeb1* (736 bp). No se observa alguna banda que corresponda a *Twist*. **b)** La gráfica muestra los promedios \pm el error estándar de tres ensayos independientes con respecto al nivel de expresión del ARNm que codifica para β -actina expresados como unidades arbitrarias (UA).

6. El tratamiento con FGF2 aumenta el nivel de expresión del ARN mensajero que codifica para los Factores de Transcripción *Snail2* y *Zeb1*.

Para investigar si el aumento de la capacidad migratoria inducido por FGF2 pudiera ser regulado por alguno de los Factores de Transcripción que fueron evaluados, se analizó si FGF2 era capaz de inducir cambios en los niveles del ARNm que los codifica. El tratamiento por 4 horas con una concentración de 600 pM de FGF2 resultó en un aumento significativo del nivel de expresión del ARNm que codifica para *Snail2* y *Zeb1* con un valor de 181 y 167%, respectivamente. Por otro lado, no hubo cambios significativos en la expresión del ARNm que codifica para *Snail1* (figura 27).



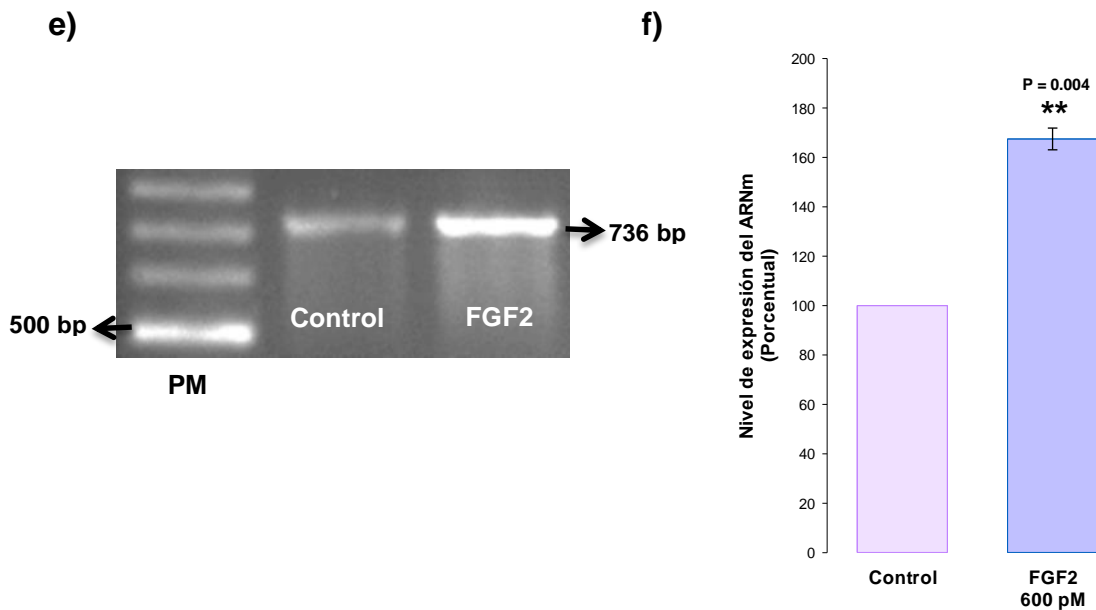


Figura 27. Efecto del FGF2 sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para los EMT-TF's *Snail1*, *Snail2* y *Zeb1*. Las células fueron MDA-MB-231 tratadas durante 4 horas con 600 pM de FGF2 y mediante ensayos de RT-PCR se evaluaron cambios en el nivel de expresión del ARNm con respecto su grupo control. **a)** Se muestran las bandas que corresponden al ARNm que codifica para *Snail1* con y sin tratamiento. **b)** El análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre ambos grupos. Se observa en **c)** una mayor intensidad de la banda que corresponde a *Snail2* tras el tratamiento y en **d)** la gráfica obtenida donde se aprecia un aumento del 81% (14.43) en la expresión del ARNm. **e)** Para el nivel de expresión de *Zeb1* también se observa un aumento en la intensidad de la banda obtenida con el tratamiento de FGF2. **f)** El análisis estadístico revela un alto grado de significancia con un valor del 167% (± 4.39) con respecto de su grupo control. Las gráficas muestran los promedios \pm el error estándar de tres ensayos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

7. El aumento en el nivel de expresión del ARN mensajero que codifica para *Snail2* y *Zeb1* es dependiente del tiempo de exposición a FGF2.

De manera general, la expresión de los factores de transcripción ocurre durante las primeras horas de exposición ante el estímulo, sin embargo muestran un comportamiento variable con respecto al tiempo; debido a esto, decidimos analizar el curso temporal de expresión de los factores de transcripción *Snail1*, *Snail2* y *Zeb1* en las células MDA-MB-231 al ser estimuladas con FGF2.

Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar y cuando alcanzaron una confluencia del 90% se inició el tratamiento con FGF2 (600 pM) durante 1, 2, 4, 6 y 8 horas. Mediante RT-PCR se determinó la expresión a lo largo del tiempo del ARNm que codifica para cada uno de los EMT-TF's.

La línea tumoral MDA-MB-231 no había mostrado cambios significativos en el nivel de expresión del ARNm que codifica para *Snail1* a las 4 horas de tratamiento y, aunque es posible apreciar un ligero incremento a las 6 horas, no existen diferencias estadísticamente significativas sobre su expresión que sugieran una regulación por parte de FGF2.

Para el caso de *Snail2* se obtiene un aumento significativo desde la primera hora de exposición a FGF2, el cual se intensifica hasta las 4 horas alcanzando un valor del 181.7% \pm 14.4 comparado con la condición control, y que luego regresa a su nivel basal.

Por su parte, la expresión del ARNm codificante para *Zeb1* también muestra un aumento dependiente del tiempo que se vuelve significativo a partir de las 4 horas (167.5 \pm 4.4) duplicando el valor basal a las 8 horas de haber iniciado el tratamiento (figura 28).

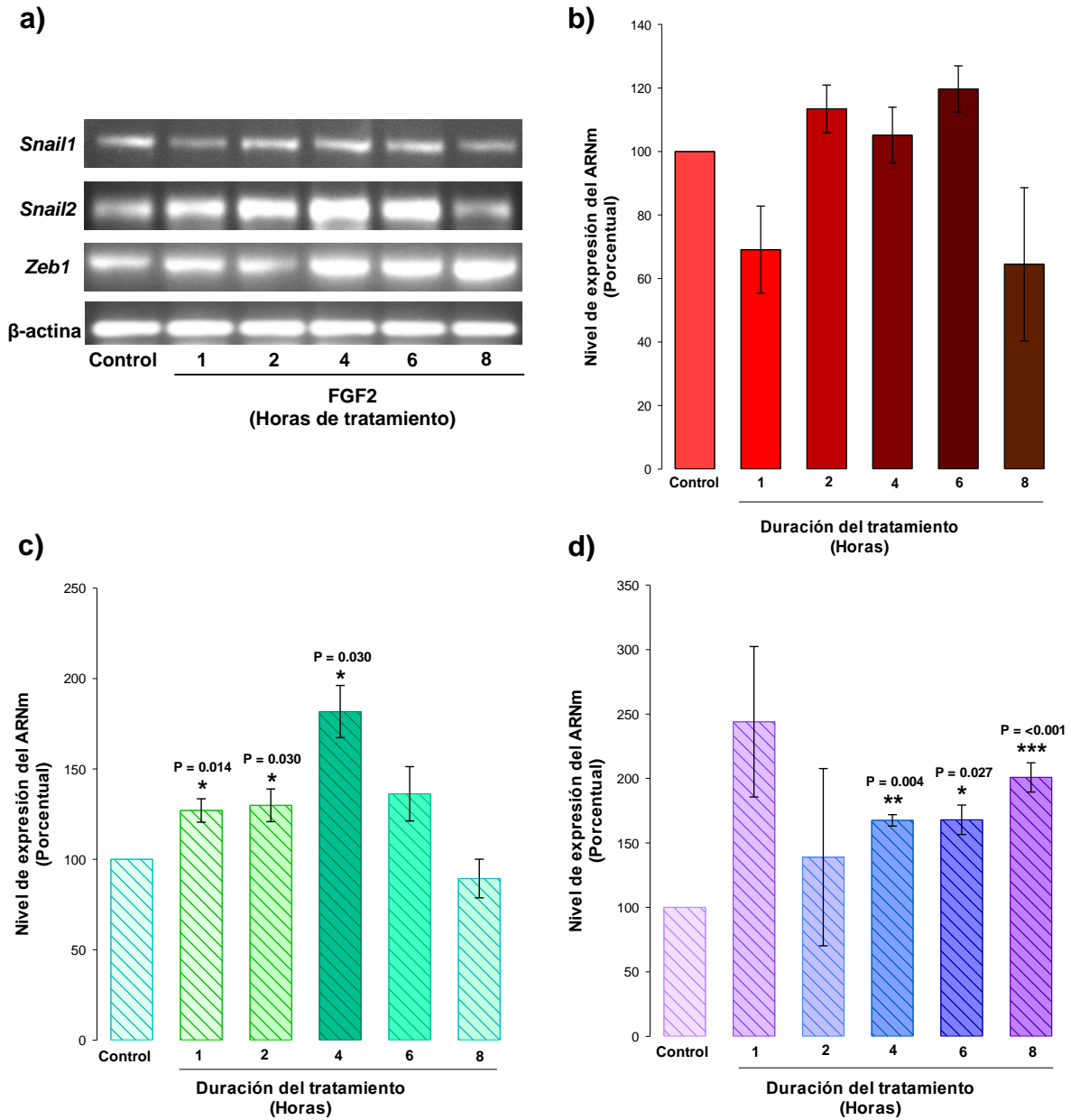


Figura 28. Curso temporal de la expresión del ARNm que codifica para *Snail1*, *Snail2* y *Zeb1* inducida por FGF2. Se realizó la extracción de ARN de las células MDA-MB-231 a los tiempos indicados después de la exposición a 600 pM de FGF2. **a)** Se observan los geles correspondientes a los factores de transcripción evaluados en los tiempos que se señalan así como la expresión del β -actina empleado como gen reportero. **b)** A pesar de que la gráfica muestra un ligero incremento de *Snail1* a las 6 horas, no resulta estadísticamente significativo. **c)** *Snail2* aumenta su expresión desde la hora 1 (127 % \pm 6.5) alcanzando un valor máximo observado a las 4 horas (181.7% \pm 14.4) para luego regresar al nivel basal. **d)** Aunque *Zeb1* también muestra un aumento desde la primera hora de exposición a FGF2, estos cambios no son significativos hasta las 4 horas (167.5% \pm 4.4) alcanzando un valor de expresión de 200.8% \pm 11.3 a las 8 horas. Los valores para cada muestra se normalizaron a los niveles de β -actina. En cada experimento, el nivel basal de cada factor de transcripción en células no tratadas se definió como el 100%. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes \pm el error estándar. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

8. El estímulo con FGF2 aumenta los niveles del ARNm que codifica para VEGF-A de manera independiente de HIF-1 α

Se sabe que la expresión de VEGF en la condición tumoral es regulada por un amplio número de efectores incluyendo factores de crecimiento, citocinas, oncogenes, hormonas, entre otros. Desde hace casi dos décadas el grupo de Seghezzi demostró que FGF2 era capaz de inducir la expresión de VEGF en las células endoteliales a través de un mecanismo autócrino y parácrino. Por otro lado, es bien sabido que en condiciones bajas de oxígeno, el Factor Inducible de Hipoxia-1 es el responsable de la regulación transcripcional de VEGF aunque, recientemente ha surgido evidencia que refuta esta idea.

Para evaluar la participación de algún mecanismo responsable de la inducción angiogénica en nuestro modelo celular decidimos evaluar la presencia de VEGF-A y la subunidad HIF-1 α encontrando niveles altos en la expresión basal del ARN mensajero que codifica para ambas moléculas como se muestra en la figura 29.

El siguiente paso fue determinar si el nivel de expresión tanto de VEGF-A como de HIF-1 α es sensible al estímulo con FGF2 para así, poder establecer algún mecanismo regulatorio que implique la participación del Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico en el desarrollo de un microambiente tumoral favorable.

Para ello, las células MDA-MB-231 fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 80% y tratadas con una concentración de FGF2 de 600 pM durante 4 horas para medir cambios en el nivel de expresión de VEGF-A y HIF-1 α .

Mediante ensayos de RT-PCR se determinó un aumento significativo en la expresión del ARNm que codifica para VEGF-A del 71% \pm 26.6 con respecto al nivel de expresión en las células que no fueron estimuladas. Sin embargo, el estímulo con FGF2 no indujo un cambio significativo en el nivel de expresión del ARNm que codifica para HIF-1 α (figura 30).

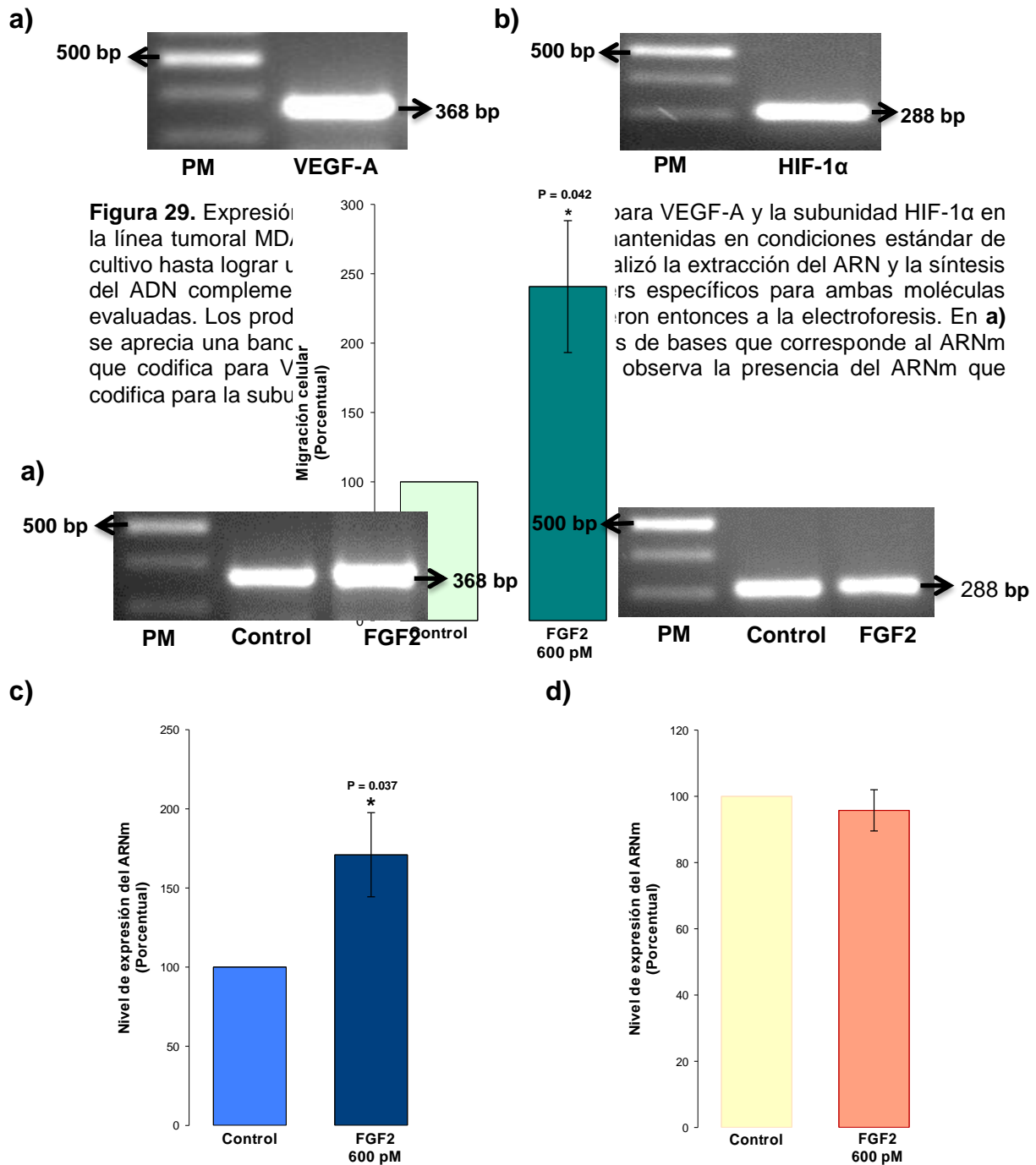


Figura 29. Expresión de la línea tumoral MD, cultivo hasta lograr el ADN complementario evaluadas. Los productos se aprecia una banda que codifica para VEGF-A y la subunidad

para VEGF-A y la subunidad HIF-1α en mantenidas en condiciones estándar de alizó la extracción del ARN y la síntesis de los productos específicos para ambas moléculas fueron entonces a la electroforesis. En a) se observa la presencia del ARNm que

Figura 30. Expresión del ARNm que codifica para VEGF-A y HIF-1α inducida por FGF2. Después del tratamiento de FGF2 por 4 horas los niveles de ARNm fueron medidos. **a)** Se muestra un gel representativo de la electroforesis donde se observa una mayor intensidad de la banda obtenida (368 pares de bases) para VEGF-A tras el estímulo de FGF2 con respecto de la condición control. **b)** El promedio de tres experimentos independientes revela un aumento en la expresión del ARNm del $71\% \pm 26.6$ inducido por el tratamiento de FGF2. **c)** La expresión de HIF-1α no parece estar implicada en el aumento de VEGF-A a las 4 horas de tratamiento. **d)** El análisis estadístico no muestra diferencia entre la expresión del ARNm que codifica para HIF-1α con o sin el estímulo. $N=3$; $*P<0.05$.

9. El aumento en la expresión de VEGF inducido por FGF2 puede ser regulado por IL-6

La presencia de la subunidad HIF-1 α resultó controversial debido a que no parece estar involucrada en el aumento del nivel de expresión de VEGF-A inducido por FGF2. Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que la expresión de VEGF en el cáncer puede ser regulada por diversas moléculas presentes en el microambiente tumoral, entre ellas algunas citocinas proinflamatorias. A su vez, se ha demostrado que algunas pueden ser reguladas por FGF2 como lo es interleucina-6 (IL-6).

Para determinar la posible participación de IL-6 en la sobreexpresión de VEGF-A inducida por FGF2, decidimos investigar si en nuestro modelo experimental existía la expresión basal de esta molécula. Mediante RT-PCR determinamos la presencia del ARNm que codifica para IL-6 obteniendo una banda intensa de 388 pares de bases (Figura 31).

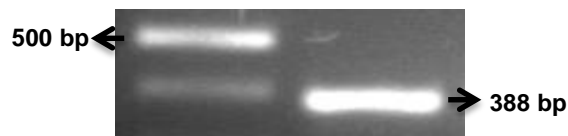


Figura 31. Expresión basal del ARNm que codifica para IL-6 en la línea celular MDA-MB-231. Empleando los primers específicos se determinó la presencia de una banda intensa de 388 pares de bases que demuestra la expresión de IL-6 en la línea tumoral de mama MDA-MB-231 a nivel del ARN mensajero.

Posteriormente, decidimos evaluar si el estímulo con FGF2 podía modificar el nivel de expresión basal de IL-6. Asimismo, ya que era necesario descartar un posible desfase temporal entre la expresión de HIF-1 α y el aumento observado de VEGF-A a las 4 horas, decidimos evaluar la expresión de VEGF-A, HIF-1 α e IL-6 a diferentes tiempos de exposición a FGF2 (1, 2, 4, 6 y 8 horas). Los resultados obtenidos muestran que el incremento en el nivel de expresión de VEGF-A es dependiente de la duración del estímulo, siendo estadísticamente significativo entre las primeras 2 y 6 horas de iniciado el tratamiento. Por otro lado, se comprobó que no existen cambios en el nivel de expresión de HIF-1 α en los tiempos observados, lo cual indica que el aumento en el nivel de expresión de

VEGF inducido por FGF2 es independiente de la regulación del Factor Inducible de Hipoxia-1. Los resultados muestran también una sobreexpresión significativa de IL-6 a partir de la primera hora del estímulo ($158.5\% \pm 19.7$) que se intensifica a las 4 horas ($180.5\% \pm 13.6$) y que correlaciona con el aumento de VEGF-A pudiendo actuar como una molécula intermediaria en la señalización de FGF2 (figura 32).

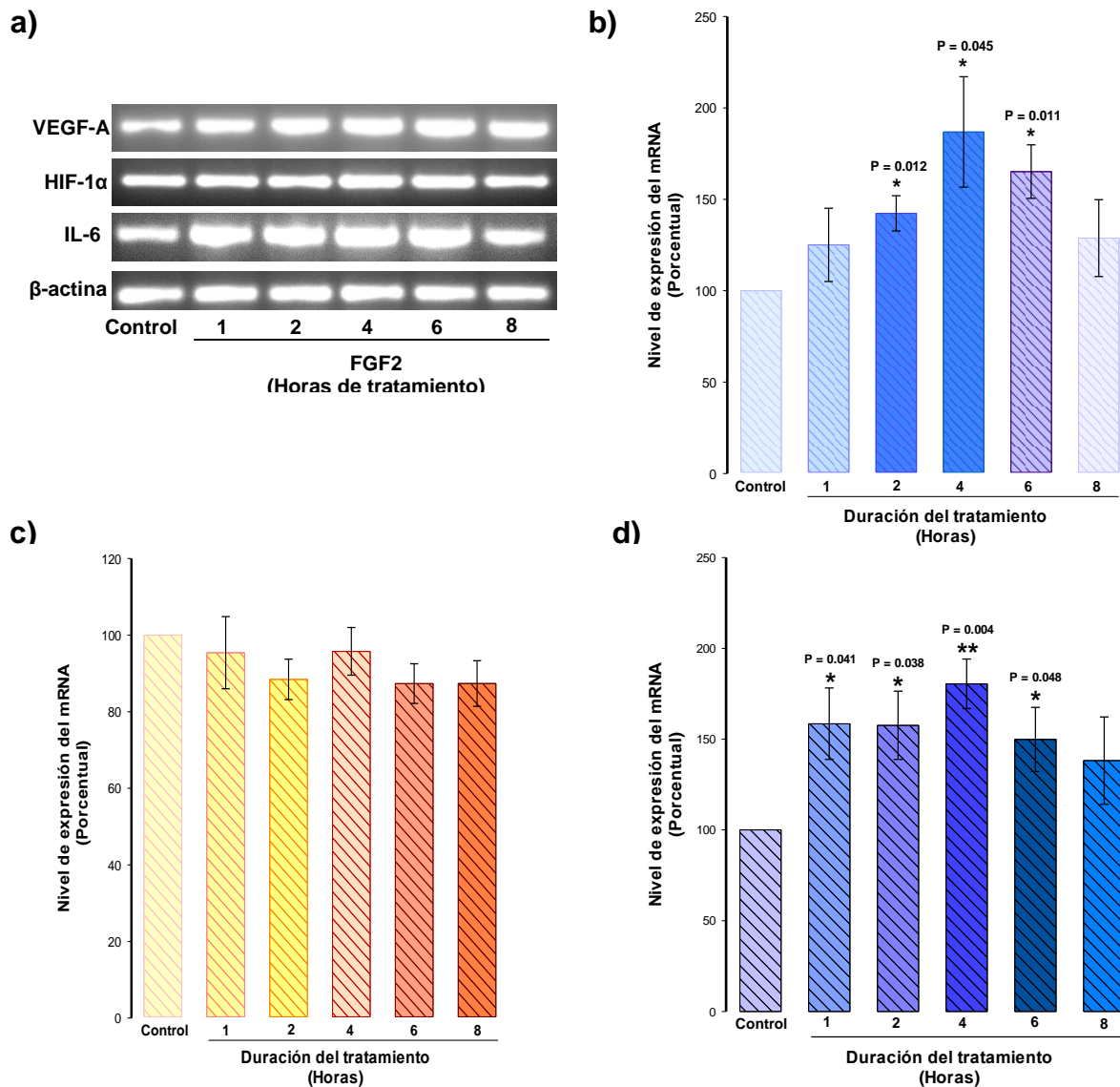


Figura 32. Curso temporal de la expresión del ARNm que codifica para VEGF-A, HIF-1α e IL-6 inducida por FGF2. Después del tratamiento de FGF2 a los tiempos que se indican los niveles de ARNm fueron medidos mediante RT-PCR. **a)** Se muestran los gels correspondientes a cada condición **b)** Se observa una máxima expresión de VEGF a las 4 horas 186.9 ± 30.2 . **c)** FGF2 no induce cambios en la expresión de HIF-1α. **d)** Para IL-6 se obtuvieron valores significativos entre la hora 1 y 6 con un valor máximo de $180.5\% \pm 13.6$ a las 4 horas de iniciado el tratamiento. Los valores para cada muestra se normalizaron a los niveles de β-actina. N=3; *P<0.05; **P<0.01.

Discusión

La capacidad del FGF2 para inducir la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) ha sido estudiada a partir de los trabajos publicados por los grupos de Perantoni y Sakurai en 1995 y 1977 respectivamente, quienes mostraron que dicho factor de crecimiento promueve la tubulogénesis temprana en el desarrollo embrionario. Sin embargo, es sabido que algunas de las señales responsables de inducir la TEM durante la embriogénesis, están implicadas también en los procesos de invasión tumoral y metástasis, a lo cual FGF2 no parece ser la excepción (Yang y Weinberg, 2008).

El FGF2 así como su receptor, juegan un papel muy importante durante el desarrollo de la glándula mamaria y en la homeostasis del organismo, por lo que la desregulación de la señalización de FGF2 se ha asociado a diversas patologías, incluyendo el desarrollo del cáncer, donde se observa una sobreexpresión de FGFR1. La activación de este receptor induce el proceso de Transición Epitelio-Mesénquima, la invasión y la angiogénesis tumoral (Nieto y Cano, 2012).

El papel del FGF2 puede variar dependiendo la etapa durante la progresión tumoral así como del tipo de cáncer, por lo que su función pudiera resultar en un inicio contradictoria.

Se ha observado que el nivel de expresión del FGF2 es inversamente proporcional al grado de malignidad de las células tumorales y al tamaño del tumor, lo cual hace que los pacientes que presentan bajos niveles de FGF2 tengan un pronóstico de sobrevida malo (Luqmani y cols., 1992; Anandappa, 1994). Ensayos de inmunohistoquímica demostraron la presencia de FGF2 en muestras de remanentes mioepiteliales benignos y en la membrana basal que rodean al tumor pero no en las células malignas (Gomm y cols., 1991). En el año 2000, el grupo de investigación de Korah demostró que la expresión de FGF2 en la línea tumoral de mama MDA-MB-231 induce un fenotipo menos maligno.

Las evidencias en la literatura científica son controversiales en cuanto al papel del FGF2 en el inicio, desarrollo y metástasis del cáncer, por lo que decidimos evaluar en el presente trabajo el papel de este factor de crecimiento en una línea

tumoral con alto potencial metastásico, la cual representa el estadio III y IV del desarrollo del cáncer de mama en los humanos.

Las células tumorales son capaces de generar sus propias señales de crecimiento, reduciendo así su dependencia a las condiciones del microambiente tumoral. Esta autonomía de las células tumorales interrumpe los mecanismos regulatorios del organismo que normalmente funcionan para garantizar un comportamiento adecuado de los diversos tipos de células y tejidos.

Con base en esta teoría, se comprobó la expresión basal de FGF2 en nuestro modelo experimental, reportada inicialmente en 1995 por el grupo de Penault-llorca y colaboradores que, si bien es menor con respecto de otras líneas celulares de mama de menor malignidad, puede representar un sistema autosuficiente de señalización. Esta hipótesis se ve reforzada al observarse la presencia de altos niveles del ARNm que codifica para el receptor FGFR1, lo que sugiere que las células MDA-MB-231 están capacitadas para responder a la presencia extracelular de FGF2, iniciando la cascada de señalización activada por la unión FGF2/FGFR1.

La capacidad metastásica de las células tumorales puede evaluarse considerando varios indicadores, tales como la capacidad migratoria y la capacidad proliferativa. La presencia de FGF2 induce un incremento significativo en la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, siendo este efecto dosis-dependiente, obteniendo una concentración óptima estimuladora de 600 pM, muy parecida a la reportada en la bibliografía, 10 ng/ml. Con respecto a la capacidad proliferativa, la presencia de FGF2 por 24 horas indujo un aumento del 21.4% en el conteo celular de la línea tumoral MDA-MB-231.

El fenotipo mesenquimal de las células tumorales es mantenido por la expresión de factores de transcripción asociados a la TEM, tales como Snail1, Snail2, Twist y Zeb1. En condiciones de cultivo estándar, encontramos que las células MDA-MB-231 expresan el ARNm que codifica para Snail1, Snail2 y Zeb1. Decidimos investigar si el tratamiento con FGF2 era capaz de inducir cambios en los niveles

del ARNm que codifica para estos factores de transcripción. Los resultados obtenidos muestran que el estímulo de FGF2 durante 4 horas a una concentración de 600 pM induce la sobreexpresión del ARNm que codifica para Snail2 y Zeb1, obteniendo un incremento del 81 y 67%, respectivamente. Además se observó que dicho aumento es dependiente de la duración del estímulo. Por otro lado, FGF2 no indujo cambios en la expresión del ARNm que codifica para Snail1 al tiempo evaluado. Este cambio en la expresión de dichos factores de transcripción van asociados con una disminución en los niveles de expresión de E-cadherina. El trabajo de Man-Tat Lau en 2013, sugiere la participación de FGF2 en la represión de E-cadherina mediante la activación de los factores de transcripción Slug (Snail2) y Zeb1 a través de las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK respectivamente en un modelo celular de cáncer de ovario.

Estos resultados sugieren que el FGF2 induce el incremento de la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 mediante la represión de la expresión de la proteína E-cadherina apuntando principalmente a la participación de los factores de transcripción Snail2 y Zeb1.

Además de la estimulación de la proliferación celular, los factores de crecimiento pueden promover el crecimiento tumoral estimulando la angiogénesis intratumoral. El principal factor angiogénico es el VEGF-A, el cual está ampliamente expresado en la mayoría de los tumores. Sólo algunas moléculas extracelulares han sido encontradas capaces de regular la expresión de VEGF-A a nivel tumoral y entre ellas se encuentra el Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β), en células folículoestrelladas de la hipófisis; el Factor de Crecimiento Insulínico (IGF), en células de cáncer colorrectal; el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), en células de glioma maligno; el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) y el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2). Diversos estudios reportan una correlación positiva entre una expresión elevada de VEGF-A y la densidad microvascular del tumor así como de los niveles séricos de este factor con respecto a la progresión tumoral (R.M.B. Loureiro y cols., 2005).

La presencia de FGF2 en las células MDA-MB-231 induce un incremento de los niveles basales del ARNm que codifica para VEGF-A. Este aumento depende del tiempo de exposición, el cual toma un valor estadísticamente significativo a partir de las 2 horas de haber iniciado el estímulo ($142.3\% \pm 9.6$), alcanzando un valor máximo observado a las 4 horas ($186.9\% \pm 30.2$) y que luego regresa a su nivel basal.

En varios modelos experimentales de células tumorales se ha demostrado que la expresión de HIF-1 α generado por condiciones de hipoxia induce la expresión de VEGF-A; sin embargo, en nuestro modelo experimental no parecen estar relacionados.

Dankbar y colaboradores en el año 2000, demostraron que IL-6 induce la expresión de VEGF-A en células de mieloma múltiple y que recíprocamente, VEGF-A estimula la secreción de IL-6 en el estroma y en células endoteliales microvasculares. Por su parte, el grupo de Wei reportó en 2003 que IL-6 induce la producción de VEGF-A en células de cáncer cervical C33A. Por el contrario, Hatzi y colaboradores en el año 2002, encontraron que IL-6 inhibe la angiogénesis inducida por VEGF-A empleando como modelo experimental la córnea de conejo y demostraron que la expresión de IL-6 en xenoinjertos de tumores de neuroblastoma en ratones se correlaciona con una reducida neovascularización y la inhibición del crecimiento tumoral. Estas evidencias sugieren el papel diferencial que puede ejercer la IL-6 sobre la expresión de VEGF, que dependerá del modelo experimental empleado.

Para el caso particular de la línea MDA-MB-231, reportamos una expresión basal de IL-6, la cual fue exacerbada por el tratamiento con FGF2 desde la primera hora de estímulo y que se incrementa hasta las 4 horas, alcanzando un valor máximo a este tiempo de $180.5\% \pm 13.6$ con respecto a la condición control. Considerando la temporalidad en los niveles de expresión del VEGF-A y de IL-6 en las células MDA-MB 231 expuestas a FGF2, podemos sugerir que IL-6 induce la expresión de VEGF-A, desconociendo hasta el momento el mecanismo molecular involucrado.

Conclusiones

Los datos experimentales presentados en esta tesis demuestran que el FGF2 participa de manera importante en el mantenimiento del fenotipo mesenquimal de la línea celular MDA-MB-231 proveniente de cáncer de mama mediante los siguientes mecanismos:

- Incrementa la capacidad migratoria y proliferativa de las células MDA-MB-231.
- Regula el nivel de expresión de los Factores de Transcripción Asociados a la Transición Epitelio- Mesénquima (EMT-TF's) *Snail2* y *Zeb1* en las primeras 4 horas de tratamiento.
- Induce un aumento en el nivel de expresión del ARNm que codifica para el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial A (VEGF-A) de manera dependiente del tiempo de estímulo e independiente del Factor Inducible de Hipoxia-1
- Promueve la sobreexpresión de IL-6 que puede estar implicado en la regulación de VEGF-A.

Bibliografía

- Acloque H, Adams M, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* 2009;119:1438–1449.
- Anandappa SY, Winstanley JH, Leinster S, Green B, Rudland PS, Barraclough R. Comparative expression of fibroblast growth factor mRNAs in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer.* 1994;69(4):772-776.
- Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature* 2009;8:235-253.
- Behrens, J., Lowrick, O., Klein, H.L. y Birchmeier, W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88:11495-11499.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [CDC]. (2016). Prevención y Control del cáncer. Recuperado el 28 de Enero de 2016, de: <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/>
- Chiavarina B, Martinez-Outschoorn UE, Whitaker –Menezes D, Howell A, Tanowitz H, Pestell R, Sotgia F and Lisanti M. Opposing role(s) of HIF1 α and HIF2 α in tumor-associated fibroblasts and human breast cancer cells. *Cell Cycle.* 2012; 11(17): 3280-3289.
- Chioni A, Grose R. FGFR1 cleavage and nuclear translocation regulates breast cancer cell behavior. *JCB.* 2012; 197(8):801-817.
- Danele G, Corral J, Molife R, S de Bono, J. FGF receptor inhibitors: role in cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 2012;14:111-119.
- Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 2000;95(8):2630-2636.
- Delehedde M, Deudon E, Boilly B, Hondermarck H. Heparan sulfate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 1996 Dec 15;229(2):398-406.
- García A, Peiró S, Nassour M, Savagner P. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15(2):135–147.

- Gomm JJ, Smith J, Ryall GK, Baillie R, Turnbull L, Coombes RC. Localization of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta 1 in the human mammary gland. *Cancer Res.* 1991;51(17):4685-4692.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
- Hatzi E, Murphy C, Zoepfel A, Rasmussen H, Morbidelli L, Ahorn H, Kunisada K, Tontsch U, Klenk M, Yamauchi-Takahara K, Ziche M, Rofstad EK, Schweigerer L, Fotsis T. N-myc oncogene overexpression down-regulates IL-6; evidence that IL-6 inhibits angiogenesis and suppresses neuroblastoma tumor growth. *Oncogene.* 2002;21(22):3552-3561.
- Hay ED. 1989. Theory for epithelial-mesenchymal transformation based on the “fixed cortex” cell motility model. *Cell Motil Cytoskeleton* 14: 455–457
- Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lin MT, Kuo ML, Lin JT. Interleukin-6 Increases Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in Gastric Carcinoma. *J Biomed Sci* 2004;11(4):517–527.
- Hung SY, Shih YP, Chen M, Lo SH. Up-regulated cten by FGF2 contributes to FGF2-mediated cell migration. *Mol Carcinog.* 2014;53(10):787-92.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). “Estadísticas a Propósito del Día Mundial Contra el Cáncer (4 De Febrero)” DATOS NACIONALES. Recuperado el 9 de Marzo de 2016, de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf
- Ishigami T, Hida Y, Matsudate Y, Murao K, Kubo Y. The involvement of fibroblast growth factor receptor signaling pathways in dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans. *Journal Med. Inv.* 2013;60:106-113.
- Itoh N, Ornitz D. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.* 2011;149(2):121–130.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009;119(6):1420–1428
- Ke Q, Costa M. Hipoxia-Inducible Factor 1(HIF-1). *Molecular Pharmacology* 2006;70:1469–1480.
- Korah RM, Sysounthone V, Golowa Y, Wieder R. Basic fibroblast growth factor confers a less malignant phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2000;60(3):733-740.

- Kornelia Polyak. Breast cancer: origins and evolution *J. Clin. Invest.* 2007;117(11):3155–3163.
- Larsson A, Sköldenberg E, Ericson H. Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors. *Angiogenesis.* 2002;5(1-2):107-110.
- Lau MT, So WK, Leung P. Fibroblast Growth Factor 2 Induces E-Cadherin Down-Regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK Signaling in Ovarian Cancer Cells. *Plos One* 2013;8(3): e59083.
- Liu J, Uygur B, Zhang Z, Shao L, Romero D, Vary C, Ding Q, Wu WS. Slug inhibits proliferation of human prostate cancer cells via downregulation of cyclin D1 expression. *Prostate* 2010;70(16):1768–1777.
- Luqmani YA, Graham M, Coombes RC. Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR1 and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br J Cancer* 1992;66(2):273-280.
- LV Y, Zhao S, Han J, Zheng L, Yang Z and Zhao L. Hypoxia-inducible factor-1 α induces multidrug resistance protein in colon cancer. *OncoTargets and Therapy* 2015; 8: 1941-1948.
- Nguyen PT, Tsunematsu T, Yanagisawa S, Kudo Y, Miyauchi M, Kamata N, Takata T. The FGFR1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal–epithelial transition through the transcription factor AP-1. *Br. J. Cancer* 2013;109:2248–2258.
- Nieto MA, Cano A. The epithelial–mesenchymal transition under control: Global programs to regulate epithelial plasticity. *Sem in Can Biol* 2012;22:361–368.
- Nurcombe V, Smart CE, Chipperfield H, Cool SM, Boilly B, Hondermarck H. The proliferative and migratory activities of breast cancer cells can be differentially regulated by heparan sulfates. *J Biol Chem.* 2000;275(39):30009-30018.
- Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32(3):263–267.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015). Cáncer. Nota descriptiva n° 297. Recuperado el 7 de diciembre de 2015, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Ornitz, D. M. and Itoh, N. (), The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *WIREs Dev Biol.* 2015;4(3):215–266.

- Penault-Llorca F, Bertucci F, Adélaïde J, Parc P, Coulier F, Jacquemier J, Birnbaum D, deLapeyrière O. Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int J Cancer* 1995;61(2):170-176.
- Perantoni AO, Dove LF, Karavanova I. Basic fibroblast growth factor can mediate the early inductive events in renal development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(10):4696-4700.
- Perl, A.K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb y Christofori, G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998; 392:190-193.
- R.M.B. Loureiro, P.A. D'Amore. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005. 16;77–89.
- Said NA, Williams ED. Growth Factors in Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis. *Cell Tissues Organs* 2011;193:85–97.
- Sakurai H1, Barros EJ, Tsukamoto T, Barasch J, Nigam SK. An in vitro tubulogenesis system using cell lines derived from the embryonic kidney shows dependence on multiple soluble growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(12):6279-6284.
- Salimath B, Marmé D, Finkenzeller G. Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene* 2000;19(31):3470-3476.
- Sarrazin S, Lamanna W, Esko J. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(7): a004952.
- Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol*. 1998;141(7):1659-1673.
- Sorensen V, Nilsen T, Wiedłocha A. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays* 2006;28(5):504-14.
- Stachowiak ER, Maher PA, Tucholski J, Mordechai E, Joy A, Moffett J, Coons S, Stachowiak MK. Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors in human glial cells-association with cell proliferation. *Oncogene*. 1997;14:2201–2211.
- Strutz F, et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymatransformation. *Kidney Int*. 2002;61(5):1714-28.

- Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int.* 2000;57(4):1521-1538.
- Taeger J, Moser C, Hellerbrand C, Mycielska M, Gabriel Glockzin G, Schlitt H, et al. Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR Impairs Tumor Growth, Angiogenesis, and Metastasis by Effects on Tumor Cells, Endothelial Cells, and Pericytes in Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther* 2011;10:2157-2167.
- Takeichi, M., Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Op. Cell Biol.* 1993; 5:806-811.
- Taylor MA, Parvani JG, Schiemanet WP. The Pathophysiology of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor- β in Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15:169–190.
- Wang F, Chang M, Shi Y, Zhao J, Hai L, Sharen G and Du H. Down- regulation of hipoxia-inducible factor-1 suppresses malignant biological behavior of triple-negative breast cancer cells. *Int J Clin Exp Med* 2014;7(11):3933-3940
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, Hsieh CY. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* 2003;22(10):1517-1527.
- Wesche J, Haglund K, Haugsten E. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem. J* 2011;437:199–213.
- Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 2010;25(2): 85–101.
- Yang J, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev Cell.* 2008;14(6):818–829.
- Zeisberg M, Neilson E. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 2009;119(6):1429-1437.