



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Licenciatura en Ciencias Biológicas

## **Impacto de la longevidad del tejido de la glándula mamaria en las lesiones neoplásicas inducidas por el receptor RET**

De los Santos, María Clara

**Directora:**

Dra. Gattelli, Albana

**Directora Asistente:**

Lic. Vallone, Sabrina Aldana

Laboratorio de “Blancos terapéuticos y microambiente en cáncer de  
mama”  
Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias, Universidad de  
Buenos Aires (IFIBYNE-UBA-CONICET)

**2024**

M. Clara de los Santos

Albana Gattelli

Sabrina A. Vallone



## Resumen

La mayoría de los cánceres surgen en personas mayores de 60 años, por lo tanto, a medida que la población global envejece, el cáncer se está convirtiendo en un problema importante de salud pública. Sin embargo, se ha ignorado en gran medida la contribución del envejecimiento a las señales oncogénicas, y la mayoría de los estudios preclínicos se diseñan en ratones adultos jóvenes en lugar de llevarse a cabo en ratones de mayor edad que reflejen una condición adecuada para el modelo de la enfermedad. Desde hace varios años, nuestro grupo ha estudiado la función oncogénica del receptor tirosina quinasa RET en el cáncer de mama.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres y la causa más común de muerte por cáncer en la población femenina a nivel mundial. El receptor RET se encuentra sobre-expresado en aproximadamente el 50% de los tumores mamarios en comparación con el tejido normal, y los niveles altos de RET se correlacionan con una menor supervivencia de las pacientes con cáncer mamario. Previamente, utilizando un sistema de ratón transgénico inducible (Ret/MTB), demostramos que la expresión de RET en el epitelio mamario es oncogénica y genera tumores que expresan el receptor de estrógenos (ER), lo que representa el subtipo luminal humano. Más recientemente, reportamos que RET se expresa en etapas específicas durante el desarrollo de la glándula mamaria del ratón. Sin embargo, no hemos estudiado hasta el momento su expresión en hembras de edad avanzada. Considerando que la edad es un factor de riesgo principal en el cáncer de mama, con lo cual aumenta notablemente la incidencia tumoral en mujeres post-menopáusicas, en este trabajo, nuestro objetivo fue abordar el impacto de la longevidad en el desarrollo de lesiones neoplásicas inducidas por RET.

En primer lugar, utilizamos el sistema Ret/MTB para evaluar los cambios tanto en la incidencia como en la progresión de tumores mamarios inducidos por RET en grupos de hembras longevas respecto de hembras jóvenes. Luego, mediante ensayos de biología molecular, llevamos a cabo una primera caracterización de las lesiones neoplásicas generadas en ambos grupos. Hasta este momento del análisis, no hemos obtenido diferencias significativas; los resultados sugieren que la longevidad de las hembras no afecta el potencial oncogénico de RET en las glándulas mamarias.



En una segunda parte, analizamos en profundidad el tejido de las glándulas mamarias de ratones hembra longevas. Además de los cambios histopatológicos, observamos que las glándulas envejecidas presentan un patrón diferencial de fosforilación/activación de RET y de ER: respecto al tejido mamario joven, el tejido mamario proveniente de ratones hembra longevas muestra altos niveles de fosforilación de la isoforma glicosilada de RET y un aumento significativo de la fosforilación del ER en el sitio específico S118. Estos resultados sugieren que la glándula mamaria envejecida presenta activación de una vía específica de señalización de RET.

Consideramos que los resultados de este estudio abren nuevas direcciones de investigación. En un futuro, sería interesante estudiar en mayor profundidad la regulación de la expresión y actividad de RET y su efector ER en las glándulas mamarias envejecidas, su potencial interacción y la relación con una mayor predisposición al cáncer de mama en longevidad.



## **Impact of Mammary Gland Tissue Longevity on Neoplastic Lesions Induced by the RET Receptor**

### **Abstract**

Most cancers arise in individuals over 60 and, as the global population ages, cancer is becoming a significant public health problem. Yet, the contribution of aging to oncogenic signals is largely ignored, with most preclinical studies designed in 2-month-old adult mice rather than older mice reflecting an age-appropriate to the disease being modeled. Since several years our lab have been studied the oncogenic function of the RET receptor in breast cancer.

Breast cancer is the most common cancer in women and the leading cause of cancer-related deaths in women worldwide. RET is a receptor tyrosine kinase overexpressed in 50% of breast tumors respect to normal tissue and high RET correlates with decreased survival. Using a doxycycline-induced transgenic mouse system (RET/MTB), we previously demonstrated that RET expression in the mammary epithelium induced estrogen receptor (ER) positive tumors, representing the human luminal subtype. More recently, we reported that RET is expressed at specific stages during mammary development. However, we have not yet studied RET expression and function in aged females. Considering that age is the main risk factor in breast cancer, significantly increasing tumor incidence in postmenopausal women, our aim in this work is to address the impact of longevity on the development of RET-induced neoplastic lesions.

First, we used the Ret/MTB system to assess changes in both the incidence and progression of RET-induced mammary tumors in groups of aged females compared to young females. Then, through molecular biology assays, we performed an initial characterization of the neoplastic lesions generated in both groups. Up to this point in the analysis, we have not found significant differences; the results suggest that the longevity of the females does not affect the oncogenic potential of RET in mammary glands.

Secondly, we conducted a more in-depth analysis of the mammary gland tissue from aged female mice. In addition to the morphological changes (histological analysis), we observed that aged glands exhibit a differential pattern of RET and ER



phosphorylation/activation: compared to young mammary tissue, mammary tissue from aged female mice shows high levels of phosphorylation of the glycosylated isoform of RET and a significant increase in ER phosphorylation at the specific site S118. These results suggest that the aged mammary gland may exhibit activation of a specific RET signaling pathway.

We believe that the results of this study open new research directions. In the future, it would be interesting to study in greater depth the regulation of RET expression and activity, along with its effector ER, in aged mammary glands, their potential interaction, and the relationship with increased breast cancer susceptibility in longevity.



## Agradecimientos

Como cierre de esta etapa tan linda, quiero aprovechar para agradecer a todos aquellos que formaron parte de ella. En particular:

A la Universidad de Buenos Aires, especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que se volvió casi mi segunda casa en estos últimos 6 años. Gracias por permitirme estudiar esta carrera tan linda, de la que me fui enamorando cada vez más.

A los docentes que tuve en cada materia, quienes, además de ser increíbles en lo académico, siempre demostraron ser muy buenas personas.

A mis directoras, Albana y Sabri. Creo que no me podría haber tocado un mejor grupo para hacer la tesis. Gracias Albi por haberme recibido en tu grupo de laboratorio, guiarme en todo el proceso y estar disponible para cualquier cosa que necesitara, siempre con una sonrisa. Y Sabri, gracias por estar conmigo desde el día 1 literalmente. Gracias por tener la paciencia de explicarme paso a paso cada experimento, de responderme cada pregunta, y estar ahí siempre con la mejor predisposición. Les agradezco a las dos por haberme hecho sentir tan acompañada durante estos dos años, y por todo lo que me enseñaron.

A Edith, Caro y todo el grupo Kordon-Gattelli en general, por compartirnos sus ideas y encaminarnos cada vez más en cada reunión.

A todas las chicas del laboratorio (y a Marcos), por haberme hecho sentir cómoda desde el primer día y ayudarme con cada cosa que necesitara. Son un grupo de personas muy lindo. Todo el proceso no hubiese sido lo mismo sin los almuerzos, chusmeríos, compartidas de mate y chipas con ustedes.

A mis compañeros de la facultad, por haber hecho de las horas y horas de cursada, un tiempo también de compartida y muchas risas. Gracias por ser un apoyo e impulso durante toda la carrera. Estoy feliz de haberme encontrado con personas tan lindas, que hoy forman parte de mis amigos más cercanos.



A mis amigas del colegio y de toda la vida. Es tan lindo ver como cada una va armando su propio camino y creciendo, y a la vez seguir acompañándonos en todo el proceso.

A Juan, por ser mi compañero en todo durante los últimos 3 años. Por acompañarme en los momentos felices, y los no tan lindos también. Gracias por impulsarme a ser mi mejor versión.

A toda mi familia. A mamá y papá, por haberme dado siempre lo mejor en esta vida. Gracias por apoyarme en todo, y ayudarme siempre en todo lo que necesito. Gracias a todos mis hermanos, por estar siempre cerca, y hacerme sentir siempre acompañada. A todos los quiero tanto que no me alcanzan las palabras.

A todas las personas que, de alguna forma u otra, estuvieron conmigo y me acompañaron durante todo este tiempo, gracias.



## Abreviaturas

<b>AKT</b>	<i>Protein kinase B</i>
<b>ER</b>	Receptor de estrógeno (subunidad $\alpha$ )
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>GDNF</b>	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
<b>GFR<math>\alpha</math></b>	<i>GDNF family receptor alpha</i>
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>kDa</b>	kilo Daltons
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>MMTV-LTR</b>	<i>Mouse mammary tumor virus- Long Terminal Repeat</i>
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PR</b>	Receptor de progesterona
<b>pS118ER</b>	ER fosforilado en serina 118
<b>pS167ER</b>	ER fosforilado en serina 165
<b>pS473AKT</b>	Akt fosforilado en serina 473
<b>pT202/Y204ERK</b>	Erk fosforilado en treonina 202 y tirosina 204
<b>pY1062Ret</b>	Ret fosforilado en tirosina 1062
<b>pY705STAT3</b>	Stat3 fosforilado en tirosina 705
<b>R/M</b>	<i>Ret/MTB</i>
<b>Ret</b>	<i>REarrangement during Transfection</i>
<b>RTK</b>	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
<b>rtTA</b>	<i>Reverse tetracycline-controlled transactivator</i>
<b>STAT3</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b>TetO</b>	<i>Tetracycline operator</i>
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i> o fenotipo salvaje





## Índice

<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>Agradecimientos</b>	5
<b>Abreviaturas</b>	7
<b>Introducción</b>	10
I. La glándula mamaria	11
II. Cáncer de mama	13
III. Envejecimiento y cáncer	14
IV. El receptor de estrógeno (ER)	17
IV. I. ER y cáncer de mama	17
IV. II. Estructura del ER y su activación	18
IV. III. Sitios de fosforilación del ER	19
IV. III. I. Fosforilación en serina 167 del ER	19
IV. III. II. Fosforilación en serina 118 del ER	20
V. El receptor RET	20
V. I. RET y cáncer de mama	23
V. II. La relación entre RET y ER en cáncer de mama	24
VI. El ratón transgénico Ret/MTB como modelo de estudio de tumores mamarios	26
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	31
<b>Materiales y Métodos</b>	33
I. Animales	34
II. Ratones <i>wildtype</i> (WT) de la cepa FVB/	34
III. Línea de ratones transgénicos Ret/MTB	35
III. I. Mantenimiento de la línea transgénica	35
III. II. Genotipado de los animales	35
III. II. I. Extracción de DNA genómico	36
III. II. II. PCR de punto final	36
IV. Inducción <i>in vivo</i> de la expresión de Ret en ratones hembras longevas y jóvenes en el sistema transgénico Ret/MTB	37
V. Registro del ciclo reproductivo de los animales experimentales por frotis vaginal	39
V. I. Recolección de células vaginales	39
V. II. Tinción con cristal violeta	40
VI. Monitoreo de crecimiento tumoral	41
VII. Cálculo de incidencia y frecuencia tumoral e incidencia de metástasis	42
VIII. Registro del peso de los ratones	42



IX. Análisis histológico.....	43
X. Ensayos de inmunohistoquímica (IHQ).....	43
XI. Análisis de proteínas por ensayos de <i>Western Blot</i> (WB).....	45
XI. I. Extracción de proteínas.....	45
XI. II. Cuantificación de proteínas.....	45
XI. III. Ensayo de WB.....	45
XI. IV. Cuantificación de resultados.....	47
XII. Análisis estadístico.....	48
<b>Resultados.....</b>	<b>49</b>
<b>Parte I - Evaluación del impacto de la longevidad en el proceso tumorigénico inducido por RET en la glándula mamaria .....</b>	<b>50</b>
I. I. Preparación de los grupos experimentales de hembras jóvenes y longevas en el modelo de ratón transgénico Ret/MTB. ....	51
I. II. Estudio del desarrollo y progresión tumoral de lesiones inducidas por RET en el sistema transgénico Ret/MTB en hembras jóvenes y longevas.....	54
I. III. Análisis de las características de los tumores Ret/MTB generados en hembras jóvenes respecto de hembras longevas. ....	60
<b>Parte II- Estudio de las características del tejido mamario en longevidad: RET y sus vías de señalización. ....</b>	<b>67</b>
II. I. Cambios en la morfología de las glándulas mamarias en longevidad.....	68
II. II. Cambios en los niveles de fosforilación de ER y otros efectores de la vía de señalización de RET en tejido mamario en longevidad.....	69
<b>Conclusiones y Discusión.....</b>	<b>73</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>82</b>



Impacto de la longevidad del tejido  
de la glándula mamaria en las lesiones  
neoplásicas inducidas por el receptor RET  
M. Clara de los Santos

# Introducción



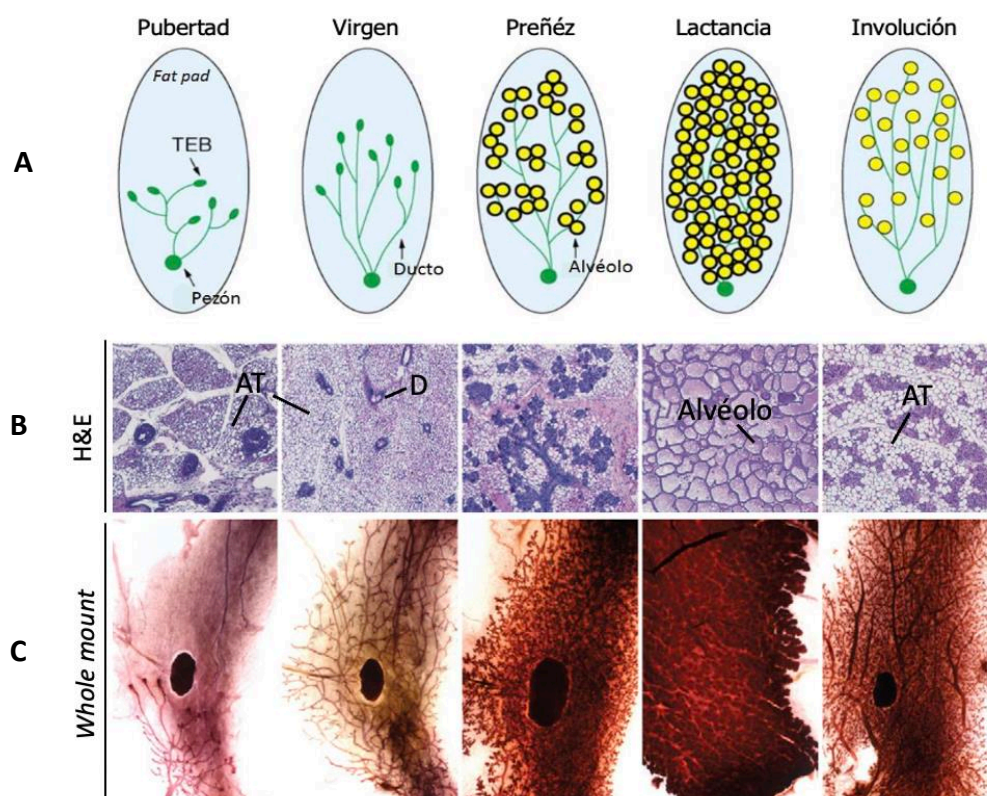
## I. La glándula mamaria

La glándula mamaria es un órgano secretorio complejo que atraviesa varios cambios morfológicos y funcionales durante su desarrollo y cuya diferenciación terminal se completa luego del nacimiento. Si bien la glándula está presente tanto en hembras como en machos, este órgano se encuentra desarrollado en las hembras, mientras que los machos presentan una forma rudimentaria y generalmente no funcional (*Khan Y. S., 2023*).

Existen dos compartimentos tisulares que constituyen la glándula mamaria: el epitelio, compuesto de células epiteliales que poseen la capacidad de producir leche; y el estroma, o tejido conectivo, principalmente compuesto de tejido adiposo (AT). Estructuralmente, las células epiteliales forman conductos (D) y alvéolos con un lumen central que se abre a la superficie del cuerpo a través del pezón. La mayoría de las células epiteliales son células lumbinales secretoras, que durante la preñez se diferencian funcionalmente para luego producir leche durante la lactancia. Adicionalmente, las células lumbinales están rodeadas por un sistema en forma de malla de células basales mioepiteliales, que son contráctiles y tienen un rol fundamental en la expulsión de la leche. El extenso sistema de conductos y alvéolos está contenido en el estroma, cuyo principal componente celular son los adipocitos, las células especializadas en el almacenamiento de lípidos que constituyen el tejido adiposo y conforman lo que se denomina almohadilla de grasa o *fat pad* (*Cardiff et al., 2018*). En el estroma, aunque en menor proporción, también están presentes otros tipos celulares como fibroblastos productores de fibras, células del sistema inmune, vasos sanguíneos y neuronas (*Hennighausen and Robinson, 2005*).

A lo largo de su desarrollo la glándula mamaria atraviesa etapas definidas en distintos estadios denominados pubertad, preñez, lactancia e involución mamaria (**Figura 11**). Cada una de estas etapas es estrictamente regulada por la acción de los factores de transcripción y transductores de señales inflamatorias conocidos como STAT (*Hughes and Watson, 2012*). En la pubertad, por acción de las hormonas del ciclo sexual (principalmente estrógeno y progesterona), las células epiteliales proliferan hasta cubrir toda la superficie del *fat pad* y alcanzar la madurez. Durante la preñez, se observa una marcada proliferación de las células epiteliales, lo que genera conductos más extendidos y ramificados. A su vez, en este estadio,

ocurre la diferenciación terminal de los alveolos, lo que permitirá la producción de leche durante la lactancia (*Silberstein and Daniel, 1987*). Al término de la preñez, las estructuras alveolares se encuentran reemplazando por completo el tejido estromal de la glándula mamaria. Luego, al finalizar la lactancia, ocurre la involución mamaria. La involución es un proceso caracterizado por una masiva muerte de las células epiteliales y remodelación del tejido glandular, en el cual el espacio ocupado por el epitelio es reemplazado por tejido adiposo, devolviendo la glándula a su estado quiescente (*Hennighausen & Robinson, 2005*).



**Figura 11. Desarrollo postnatal de glándula mamaria en el ratón.** Esquema que ilustra el desarrollo de la glándula mamaria del ratón (A). Cada etapa del esquema está acompañada por una imagen de secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) (B) y montaje del órgano completo o *Whole mount* (C). Se indican con flechas sobre las secciones de H&E las estructuras más importantes de la glándula mamaria: el tejido adiposo (AT), los alvéolos o unidades lobulillares, que son las estructuras secretorias de la glándula, y los ductos (D), que conforman los canales a través de los cuales la secreción mamaria es recolectada y confluyen en el pezón. TEB: brotes terminales de los conductos; *Fat pad*: almohadilla de grasa; AT: *Adipose tissue*. Adaptado de (*Hennighausen and Robinson, 2001; Andrechek et al., 2008*).

En este trabajo, nos centraremos en el estudio de la glándula mamaria de ratones hembra vírgenes, esto es animales adultos mayores de 2 meses de edad que no han atravesado el proceso de preñez. En la glándula mamaria en estado virgen, encontramos un sistema de



conductos primarios y secundarios, distribuidos de manera regular, con ramificaciones laterales que se forman y desaparecen en cada ciclo sexual, en los ratones denominado ciclo estral. Similar a lo descripto anteriormente, el epitelio de la glándula mamaria virgen está embebido en una matriz de abundante tejido adiposo, y no presenta las estructuras alveolares diferenciadas (*Hennighausen & Robinson, 2005*).

Si bien la glándula mamaria humana y murina son funcionalmente similares (*Mori et al., 2018*), tienen diferencias estructurales, especialmente durante la pubertad o el proceso de involución, ya que en humanos el estroma de la glándula posee más componente fibrilar (f). Además del período de involución mamaria luego del parto, ocurre una involución natural relacionada con la edad, que en la mama humana toma lugar durante la perimenopausia, cuando las mujeres cesan de ciclar, con una mayor reducción de las estructuras epiteliales. En contraste, los ratones hembra envejecidos continúan ovulando y tienen ciclos estrales, aunque alterados o aletargados, casi hasta el final de su vida por lo que la estructura de la glándula es más variable (*Cardiff et al., 2018; Mori et al., 2018; Cardiff and Wellings, 1999*).

La glándula mamaria de ratón también muestra cambios significativos con la edad. El envejecimiento, en ocasiones evidenciado por marcadores de células senescentes (*Wagner, 2022; Idda et al., 2020; Campisi, J., 2013*), conduce a la aparición de lesiones hiperplásicas, expansión de la población de células basales y una proporción alterada de células lumbinales (*Dong et al, 2016*). A su vez, se ha reportado que el envejecimiento de la glándula murina también conduce a un aumento de la rigidez de la matriz extracelular (*Jiang et al., 2022*).

## II. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres y la causa más común de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (*GLOBOCAN 2022*). En 2022, se diagnosticaron 2,3 millones de mujeres con cáncer de mama y hubo 670,000 muertes a causa de esta enfermedad a nivel mundial (*World Health Organization*). Actualmente, es la primera causa de muerte por cáncer dentro de la población femenina argentina, con una tasa estimada de incidencia de 73,1 casos por cada 100.000 mujeres, tal como lo indican los datos aportados por el Instituto Nacional del Cáncer (*Atlas INC, 2021*).





En base a los perfiles moleculares que detectan la expresión de proteínas específicas por ensayos de inmunohistoquímica (*IHC*), es posible clasificar a los tumores mamarios en 4 subtipos: luminal A, luminal B, basal y el subtipo HER2. Los tumores luminales expresan receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR) y representan el 70% de los pacientes (tumores ER+PR+). Por otro lado, el subtipo HER2 es menos frecuente y se caracteriza por poseer amplificación y alta expresión del gen ERBB2, el cual codifica para el receptor HER2, un receptor perteneciente a la familia de receptores con actividad tirosina quinasa (*RTK*) (*Sørlie, 2007*). El subtipo basal se caracteriza por ser triple-negativo, es decir que no expresa ninguno de los receptores previamente mencionados (tumores ER-, PR-, HER2-) y, aunque es el más agresivo, sólo representa el 10-20% de los casos.

Al desarrollarse en un órgano que no es vital para la supervivencia de la mujer afectada, la remoción quirúrgica del tumor primario es una operación de bajo riesgo para la paciente con cáncer mamario. Dependiendo del subtipo del tumor, se indica la terapia a implementar. Sin embargo, la alta tasa de mortalidad revela que, en muchos casos, existen limitaciones y resistencias terapéuticas para frenar el proceso metastásico, esto es la diseminación e invasión a órganos secundarios vitales, generalmente pulmón o hueso (*Lei et al., 2019; Bianco and Gevry, 2012*). Por lo tanto, el estudio de las bases moleculares que permitan comprender los mecanismos tanto de iniciación de lesiones pre-neoplásicas mamarias como de su progresión, permitirá diseñar técnicas de diagnóstico más precisas y estrategias terapéuticas más acertadas para bloquear el crecimiento y la diseminación metastásica del cáncer de mama.

### III. Envejecimiento y cáncer

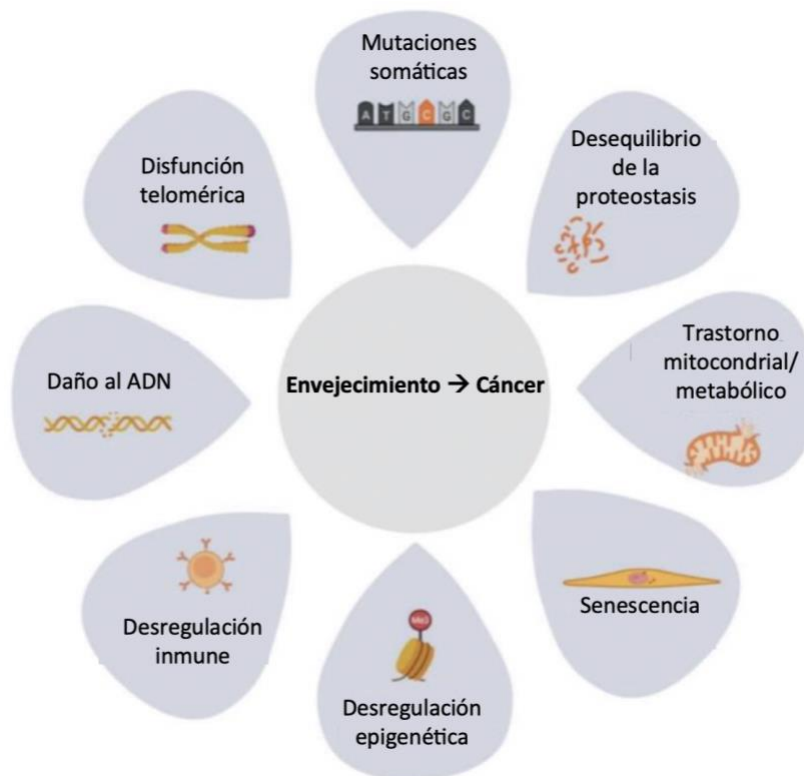
Debido al aumento notable en la esperanza de vida a nivel mundial de los últimos años, resulta indispensable estudiar en mayor profundidad las características del microambiente envejecido y los mecanismos mediante los cuales este puede promover el desarrollo de distintas patologías. El envejecimiento se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica, lo que conduce a una disminución de la función y una mayor vulnerabilidad a la muerte. Este deterioro es el principal factor de riesgo para las principales patologías humanas, incluido el cáncer (*Lopez-Otin et al, 2013*). La mayoría de los cánceres muestran un aumento significativo en su incidencia con la edad; sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares subyacentes que explican este fenómeno.



Las mutaciones genéticas son impulsoras fundamentales del cáncer, dado que pueden alterar la expresión de genes claves asociados a la proliferación celular. Durante varios años, ha prevalecido la suposición de que la relación entre el cáncer y la edad se debe al tiempo necesario para acumular las alteraciones genéticas en las células adecuadas (*Collado et al., 2007; Serrano et al., 2007*). Sin embargo, cada vez hay más evidencias científicas que sugieren que esta explicación es insuficiente para entender completamente la conexión entre el cáncer y el envejecimiento. Otros factores, propios del microambiente envejecido, parecen tener un rol fundamental en generar un entorno más propenso al desarrollo de la enfermedad. De hecho, varios estudios han revelado que alteraciones oncogénicas son sorprendentemente bien toleradas por los tejidos humanos en la adultez; sin embargo, no se comprende en profundidad por qué estos eventos parecen ser menos tolerados en los tejidos envejecidos, lo que conduce al cáncer (*Havas et al., 2022*).

A pesar de la idea preconcebida de que los procesos del cáncer (proliferación y mayor supervivencia celular) y del envejecimiento (arresto del ciclo celular y disminución de la funcionalidad) en el contexto celular son opuestos, los estudios destacan que muchas de las características del envejecimiento se comparten con el cáncer (**Figura I2**). Estas características incluyen inestabilidad genómica y epigenética, alteración de la comunicación intracelular, daño en el ADN (DNA) disfunción mitocondrial y senescencia, entre otras (*Fane and Weeraratna, 2020*). La senescencia celular, si bien fue inicialmente descrita como supresor fisiológico de las células tumorales, dado que se caracteriza por un arresto irreversible de la proliferación celular (*Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961*), hay una creciente evidencia de que esta puede también contribuir a la oncogénesis, en parte por la secreción de un conjunto de factores pro-inflamatorios (*Yang et al., 2021*).





**Figura I2. La relación entre el envejecimiento y el cáncer.** Las posibles causas del cáncer asociado a la edad incluyen mutaciones somáticas acumuladas, proteostasis desequilibrada, trastornos mitocondriales o metabólicos, senescencia celular, disfunción epigenética, disfunción inmune, daño al DNA y disfunción de los telómeros. La desregulación genómica y epigenética puede afectar en gran medida la transcripción de diversos genes, conduciendo a un aumento de la proliferación y migración celular descontrolada, características canónicas de las células cancerosas. La comunicación intracelular alterada puede interrumpir las señales que regulan el crecimiento y la muerte celular. La proteostasis puede causar la acumulación de proteínas mal plegadas, lo que induce estrés celular y activa vías oncogénicas que favorecen la transformación maligna. La senescencia celular, puede también contribuir a la oncogénesis, en parte por la secreción de un conjunto de factores pro-inflamatorios, conocido como fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). Modificado de (*Havas et al., 2022*).

En cáncer de mama, además del sexo, la edad es el factor de riesgo principal. La incidencia de este tipo de cáncer aumenta notablemente con la edad: el riesgo estimado para mujeres menores a 49 años es de 1/59, mientras que para mujeres entre 50-59 años es de 1/43 y entre 60-69 años el riesgo se eleva a 1/23 (*Siegel et al., 2014*). Mujeres mayores de 70 años tienen una probabilidad de 1/15 de desarrollar cáncer de mama. Sin embargo, es importante destacar que, si bien la incidencia aumenta con la edad, el tipo de cáncer de mama en edades avanzadas suele ser menos agresivo y de menor mortalidad que aquel que se desarrolla en mujeres jóvenes. En mujeres de edad avanzada, el tipo de cáncer de mama más frecuente es el luminal A, generalmente tratable con terapias endocrinas que bloquean la actividad de los



receptores hormonales, mientras que mujeres jóvenes (menores a 40 años) son más propensas a presentar el subtipo basal triple-negativo, que es más metastásico y resistente a las terapias disponibles en la clínica (*McGuire et al, 2015*).

En resumen, el aumento de la incidencia de cáncer de mama con la edad podría correlacionarse con varios factores presentes en el microambiente envejecido. Por ejemplo, particularmente en la mama, se ha postulado que el envejecimiento causa un aumento en la rigidez de la matriz extracelular, lo que favorece la capacidad invasiva de las células cancerosas (*Bahcecioglu et al., 2021*). A su vez, también se demostró que con la edad se favorece la generación de un microambiente pro-inflamatorio, que puede incrementar la proliferación de las células tumorales mamarias que llevaban originalmente oncogenes activos (*Jiang et al., 2022*). Aun así, la contribución del envejecimiento a las señales oncogénicas se ha ignorado en gran medida, y la mayoría de los estudios con animales de laboratorio, estudios *in vivo*, conocidos como pre-clínicos, están diseñados utilizando ratones adultos en lugar de ratones de mayor edad que reflejen una edad apropiada para modelar la enfermedad del cáncer.

## IV. El receptor de estrógeno (ER)

### IV. I. ER y cáncer de mama

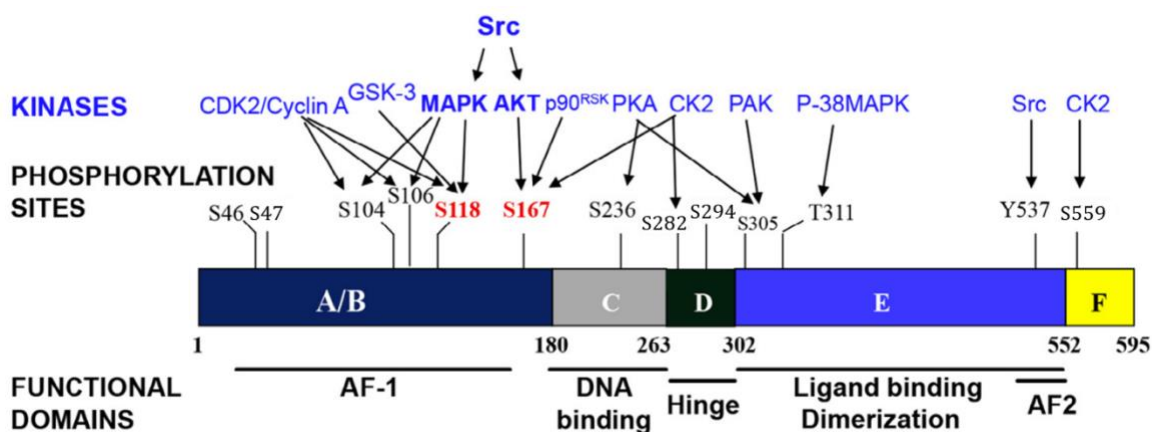
El receptor de estrógeno (ER) es parte de la superfamilia de receptores nucleares hormonales que actúan como factores de transcripción regulando la proliferación celular, diferenciación y homeostasis en varios tejidos, y cuya actividad está principalmente regulada por la unión del estrógeno. Existen al menos dos isoformas del ER, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , siendo el más estudiado en tejido mamario el ER $\alpha$ ; en este trabajo solo analizaremos el ER $\alpha$  (al que denominaremos ER). En el modelo clásico de activación, el estrógeno se une al receptor en el citoplasma de la célula, provocando un cambio de conformación en el receptor que permite su fosforilación por quinasas, su dimerización y consecuente translocación al núcleo, donde se une a secuencias blanco del DNA y regula la expresión de diversos genes (*Gourdy et al, 2018*).

Si bien el estrógeno es una hormona indispensable en el crecimiento, desarrollo, reproducción, y mantenimiento de numerosos sistemas fisiológicos, hace tiempo que se sabe que la exposición sostenida a esta molécula estimula el desarrollo de cáncer de mama (*Missmer et al, 2004*). Más aun, el ER es el principal impulsor de aproximadamente el 75% de los

cánceres de mama, y múltiples fármacos dirigidos contra el ER, como tamoxifeno que bloquea el sitio de unión de estrógenos en el receptor, son comúnmente utilizados en la clínica para tratar a pacientes con cáncer de mama ER+. Sin embargo, aproximadamente un 40% de los pacientes con cáncer de mama presentan tumores resistentes a la terapia endocrina o desarrollan resistencia a la terapia endocrina durante el transcurso del tratamiento (*Gattelli et al., 2020*).

## IV. II. Estructura del ER y su activación

El ER es una proteína modular que consta de varios dominios funcionales, incluyendo un dominio N-terminal, dos funciones de activación transcripcional (AF-1, AF-2), un dominio de unión al DNA ubicado centralmente, una región bisagra y un dominio de unión al ligando en el extremo C-terminal (**Figura I3**) (*Anbalagan and Rowan, 2015*). Si bien la activación clásica del ER consiste en la unión de la hormona, también existen otras vías de activación independientes de la unión de los estrógenos al receptor. La actividad del dominio AF-2 es dependiente de la unión de estrógenos, mientras que la actividad del dominio AF-1 es regulada por fosforilaciones que pueden ocurrir independientemente de la unión de estrógeno, aunque suele ser potenciada por la presencia de la hormona (*Morandi et al, 2011*).



**Figura I3. El ER, sus dominios funcionales, sitios de fosforilación y las quinasas asociadas.** Los dominios funcionales del ER son: función de activación-1 (AF-1); dominio de unión al DNA (DBD); bisagra, dominio de unión al ligando (LBD); dimerización; función de activación-2 (AF-2); y el dominio F, que se considera que reprime la función de ER $\alpha$ . Las quinasas que han sido descritas con capacidad de fosforilar ER $\alpha$  son: CK2, quinasa de caseína 2; CDK, quinasa dependiente de ciclinas; IKK, inhibidor de la quinasa kappa; p90RSK, quinasa de proteínas ribosómicas de 90 kDa; PAK1, quinasa 1 activada por p21; PKA, quinasa A. S, serina; T, treonina; Y, tirosina. Se indican en rojo los sitios de fosforilación del ER de interés en este trabajo. Adaptado de (*Anbalagan and Rowan, 2015*).



La activación del ER de manera independiente de estrógenos es interesante de estudiar en tumores que son independientes al tratamiento con hormonas, como aquellos resistentes a la terapia endócrina, donde el ER permanece activo aun en presencia de bloqueadores del sitio de unión al ligando como el tamoxifeno.

El receptor de progesterona (PR) es también parte de la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción y su actividad está regulada por la hormona progesterona. En tejido mamario, se pueden detectar dos isoformas de PR, PRA y PRB (*Kariagina et al., 2008*). Se ha demostrado que el PR es un gen regulado directamente por ER (*Kastner et al., 1990*). La expresión del PR está estrechamente controlada por la actividad de ambos dominios, AF-1 y AF-2 del ER. Tumores mamarios que expresan tanto ER como PR (ER+PR+) generalmente se asocian a una mejor respuesta a la terapia hormonal. Por otro lado, tumores ER+ pero negativos para PR suelen indicar la presencia de un ER no funcional o mutado, por lo que se los suele asociar con mayor resistencia a las terapias endocrinas (*Li et al., 2022*).

#### IV. III. Sitios de fosforilación del ER

El impacto de la fosforilación del ER y sus consecuencias funcionales es extensamente complejo en cáncer de mama (*Li et al., 2023*). Simplificadamente, la fosforilación del ER puede ocurrir en diversos sitios, principalmente sobre el N-terminal (**Figura I3**), y está regulada tanto por la unión del ligando, como por mecanismos independientes a éste. Los sitios de fosforilación del ER contribuyen a la regulación de múltiples actividades funcionales, incluyendo la sensibilidad a la hormona, la localización nuclear, la unión al DNA, las interacciones con proteínas/cromatina, la estabilidad de la proteína y la transcripción de genes blanco. En este trabajo, nos centraremos principalmente sobre dos sitios de fosforilación del ER bien caracterizados: la fosforilación en serina 118 (pS118ER) y la fosforilación en serina 167 (pS167ER). La fosforilación de ambos sitios es regulada por múltiples vías de señalización (**Figura I3**), aun en ausencia de ligando, y afecta la transcripción de genes blancos del ER (*Anbalagan and Rowan, 2015*).

##### IV. III. I. Fosforilación en S167 del ER



La serina 167 del ER (S167) puede ser fosforilada por distintas quinasas citoplasmáticas, incluyendo diversas quinasas oncogénicas como ERK, AKT, mTOR y p70S6K (Morandi *et al.*, 2011). La fosforilación en S167 del ER aumenta la unión del ER a la cromatina, mejora la unión de coactivadores al ER en presencia de estrógenos y, consecuentemente, potencia la transcripción. Si bien hay ciertos estudios en líneas celulares que postulan que la fosforilación en este sitio promueve resistencia a las drogas anti-estrogénicas, la mayoría de los estudios reportan una asociación positiva entre fosforilación en S167, la supervivencia del paciente y su respuesta a la terapia endocrina (Anbalagan and Rowan, 2015; Yamashita *et al.*, 2005).

#### **IV. III. II. Fosforilación en S118 del ER**

La fosforilación en la serina 118 (S118) del ER es un sitio de fosforilación más caracterizado. La S118 puede ser fosforilada por varias quinasas citoplasmáticas, incluyendo MAPK, GSK-3 IKK $\alpha$ , CDK7 y mTOR. Similarmente a lo reportado para S167 del ER, la accesibilidad de la S118 no solo puede ser desencadenada por la unión de estrógenos al ER, sino también por vías independientes a la hormona. Por ejemplo, se ha demostrado que la activación de ciertos receptores del tipo *RTK* como HER2 o EGFR por sus respectivos ligandos activan vías de señalización que culminan en la fosforilación de ER en S118 (pS118ER) (Anbalagan and Rowan, 2015).

En cáncer de mama, la presencia de pS118ER se asocia con un fenotipo de tumor más diferenciado, mejor pronóstico y respuesta a terapia con tamoxifeno (Anbalagan and Rowan, 2015; Kok *et al.*, 2009). Se ha demostrado que pS118ER media funcionalmente la interacción del ER con proteínas co-reguladoras de la transcripción como CBP/p300 y p160, potenciando la actividad transcripcional del ER (Dutertre and Smith, 2003; Leo and Chen, 2000). Sin embargo, al ser un sitio que puede estar fosforilado independientemente de la presencia de la acción de los estrógenos, se ha postulado que pS118ER podría ser también un marcador de resistencia a la terapia endócrina (Gattelli *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013).

#### **V. El receptor RET**

RET, descrito como *RTK*, es el receptor para la familia de péptidos denominados factores neurotróficos derivados de la glía (GDNF). Estos ligandos se unen a RET junto con la

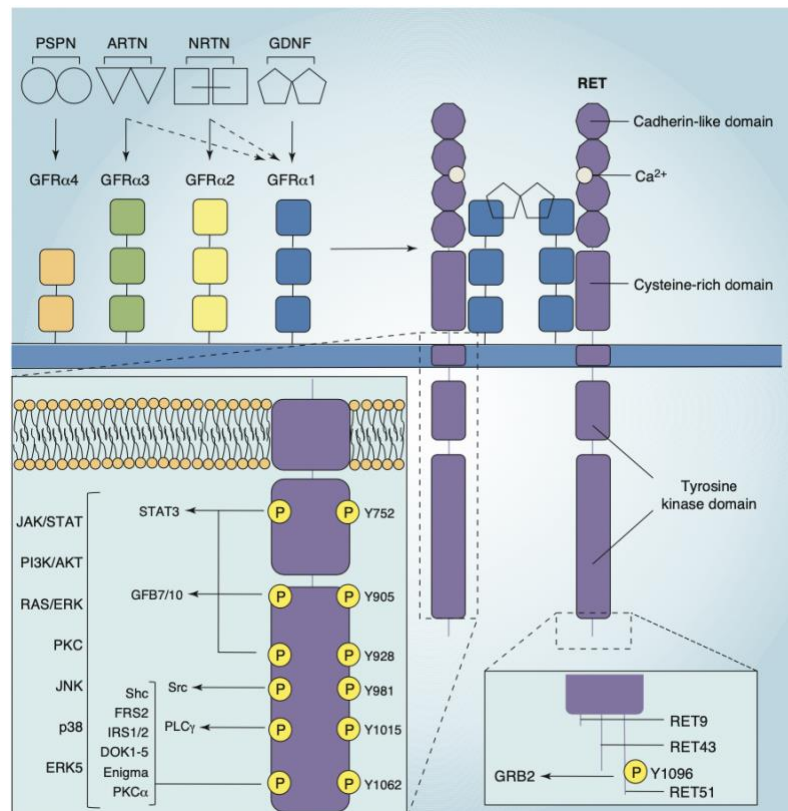


familia de co-receptores de los receptores de GDNF ( $GFR\alpha$  1-4), los cuales suelen estar anclados a la membrana, pero también existen en forma soluble. Los  $GFR\alpha$  forman homodímeros que son reclutados por ligandos selectivos de la familia de GDNF (GDNF, NRTN, ARTN y PSPN) formando un complejo de alta afinidad, el cual luego interactúa y activa a homodímeros de RET (*Mulligan, 2014*) (**Figura I4**).

Durante su activación, RET se autofosforila en residuos tirosina y, a su vez, activa numerosas vías de señalización intracelular río abajo relacionadas con proliferación, diferenciación y migración celular (*Mulligan, 2014*). Como se describirá más adelante, en células tumorales mamarias RET activa la vía de las quinasas oncogénicas como ERK y AKT, y de los factores de transcripción STAT (**Figura I4**) (*Gattelli et al., 2013*). Además, la activación de RET también conduce a la fosforilación en sitios específicos de otro factor de transcripción de importancia en tejido mamario, el ER (*Morandi et al, 2011*).

El gen de *Ret* codifica para tres isoformas (Ret9, Ret43 y Ret51) las cuales a nivel proteico difieren en sus dominios carboxilo-terminales y en sus residuos tirosina quinasa (**Figura I4**). La isoforma Ret51 codifica para la forma completa de la proteína, es decir aquella que posee todos los residuos susceptibles a fosforilación, y junto con Ret9 constituyen las isoformas más abundantes en los tejidos (*Ibáñez, 2013*) incluyendo tanto tejidos de tumores de mama como líneas celulares tumorales mamarias (*Boulay et al., 2008*).





**Figura I4. El receptor RET y su señalización río abajo.** Los ligandos de RET se unen a sus respectivos co-receptores GFR $\alpha$  (las flechas continuas indican las interacciones preferidas, la flecha discontinua indica interacciones potenciales) y activan al receptor RET. Las proteínas GFR $\alpha$  tienen dominios ricos en cisteína y están unidas a la membrana plasmática por un anclaje GPI (aunque existen versiones solubles). La unión de iones Ca<sup>2+</sup> a los dominios extracelulares de RET es necesaria para su activación. La activación de RET conduce a la trans-fosforilación de residuos de tirosina (Y) en el dominio quinasa de RET, lo que resulta en el reclutamiento de diferentes moléculas de señalización y proteínas adaptadoras, como se destaca en el área ampliada. El *splicing* alternativo genera las tres C-terminales alternativas de 51, 43 y 9 aminoácidos. La fosforilación en Y1096 es posible solo en la isoforma RET51. Adaptado de (Morandi *et al.*, 2011).

En la fisiología normal, RET se expresa en las células precursoras de la cresta neural y del tracto urogenital, en cerebro y en glándulas salivales (De Groot *et al.*, 2006). Más recientemente, nuestro grupo reveló que, en la glándula mamaria del ratón, RET se expresa a altos niveles durante la lactancia y dichos niveles disminuyen abruptamente durante la involución (Vallone *et al.*, 2022). Durante estos estadios, RET se encuentra activo, reflejado por la detección de su estado fosforilado en Y1062 (pY1062RET) (Vallone *et al.*, 2022). El tejido glandular de ratones hembra vírgenes muestra, en general, niveles relativamente bajos de RET (Vallone *et al.*, 2022). En tejido mamario humano, tanto RET como el co-receptor GFR $\alpha$ 1 y su ligando GDNF se expresan en niveles bajos o indetectables (Esseghir *et al.*, 2007).



Durante las distintas etapas del desarrollo de la glándula mamaria del ratón, los estudios de nuestro grupo detectaron expresión tanto de algunos de los co-receptores ( $GFR\alpha 1$  y  $GFR\alpha 2$ ) como de los ligandos de RET ( $GDNF$  y  $NRTN$ ), indicando la actividad de la vía en este tejido.

La primera manifestación clínica de la función oncogénica de RET fue identificada como re-arreglos génicos en carcinoma de tiroides (*Grieco et al., 1990*). En este tipo de tumor, la activación constitutiva de la señalización de RET es producida por la presencia de una mutación que genera una proteína de fusión (denominada RET-PTC), la cual representa la activación constitutiva de RET independientemente de la unión del ligando/co-receptor (*Grieco et al., 1990*). En cáncer de tiroides la activación de RET es acompañada de la activación de ERK, de STAT1 y STAT3 y, además, por la producción de citoquinas inflamatorias (*Kim et al., 2008; Borrello et al., 2005; Hwang et al., 2004; Grieco et al., 1990*). Más tarde, se han identificado otras proteínas de fusión en adenocarcinomas de pulmón (*Kohno et al., 2012*), colon (*Le Rolle et al., 2016*) y, en un porcentaje muy bajo, en cáncer de páncreas, próstata y mama (*Gattelli et al., 2020; Stransky et al., 2014*).

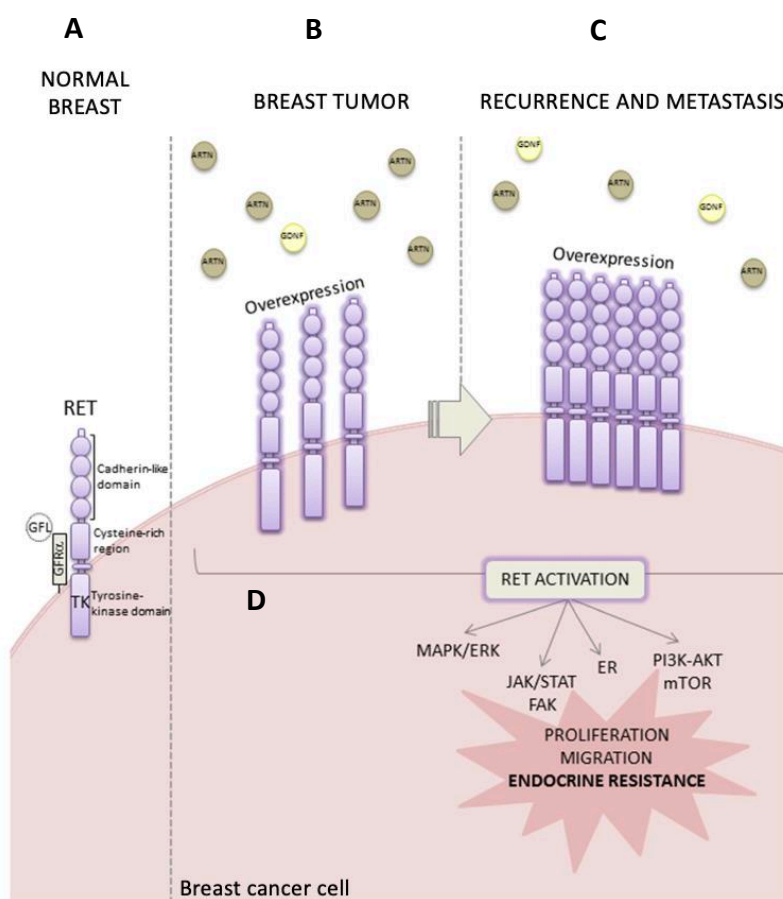
## V. I. RET y cáncer de mama

En el cáncer de mama, las mutaciones en el gen de RET no son frecuentes; menor al 1% en las diversas cohortes de pacientes analizados (*Stransky et al., 2014; Kan et al., 2010*). Sin embargo, RET se sobre-expresa en aproximadamente el 50% de los tumores de mama humanos (*Gattelli et al., 2020; Drilon et al., 2018; Gattelli et al., 2013; Esseghir et al., 2007*) (**Figura I5 A-B**). Más recientemente, en algunos casos de cáncer de mama con metástasis en cerebro, se hallaron niveles aumentados de expresión de RET en los focos metastásicos, en comparación a los tumores primarios (*Vareslija et al., 2019*) (**Figura I5, C**). Por otra parte, los ligandos de RET también están implicados en otros tipos de cáncer (*Fielder et al., 2018*). La expresión génica de *RET*, el co-receptor *GFR $\alpha$ 1* y el ligando *GDNF* se encuentra incrementada en cáncer de mama respecto de los tejidos mamarios normales (*Esseghir et al., 2007*). Además, ARTN se ha vinculado particularmente al cáncer de mama de subtipo luminal ER+ (*Kang et al., 2009; Kang et al., 2010*).

Independientemente del subtipo de cáncer mamario, niveles altos de expresión de *RET* se correlaciona con peor pronóstico del paciente (*Gattelli et al., 2013*). Por otro lado, a pesar



de que la expresión de RET se asocia mayormente a tumores del tipo luminal (ER+), los tumores que han resultado resistentes a la terapia anti-estrogénica poseen niveles aún más altos de RET (Morandi *et al.*, 2013; Plaza-Menacho *et al.*, 2010) (**Figura I5 C**), indicando su participación en mecanismos de resistencia endócrina y sugiriendo su compleja relación con el ER. La señalización desencadenada por la activación de RET en cáncer de mama incluye, además de activación del ER, la activación de las vías MAPK/ERK, AKT/mTOR, FAK y STAT, principalmente STAT1 y STAT3 (**Figura I5 D**).



**Figura I5. Alteraciones de RET en cáncer de mama y sus consecuencias.** A-B. RET está sobre-expresado en cáncer de mama, en comparación a tejido mamario normal. C. Cuando hay recurrencia a la enfermedad debido a mecanismos de resistencia a la terapia endocrina, ya sea en la mama o en sitios metastásicos, los niveles de RET están elevados. D. La señalización desencadenada por la activación de RET incluye las vías MAPK/ERK, PI3K-AKT, mTOR, ER, FAK y STAT, que contribuyen a la resistencia endocrina y al aumento de la proliferación y migración de células tumorales. Adaptado de (Gattelli *et al.*, 2020).

## V. II. La relación entre RET y ER en cáncer de mama

The diagram illustrates the signaling pathways initiated by the RET receptor and its interaction with other receptor tyrosine kinases (RTKs). RET is a transmembrane protein with an extracellular domain (purple) and an intracellular kinase domain (blue). RTKs are represented by pink dimeric structures. The diagram shows the following components and interactions:

- RET and RTKs:** Both receptors are embedded in the cell membrane. RET has multiple phosphorylation sites (yellow circles with 'P') on its intracellular tail. RTKs also have phosphorylation sites.
- Downstream Signaling:**
  - RET phosphorylation leads to the activation of PI3K (purple oval), which in turn activates mTOR (purple oval) and AKT (purple oval).
  - RET phosphorylation also leads to the activation of RAS (blue circle), which activates RAF (blue circle), which activates MEK1/2 (blue circle), which activates ERK1/2 (blue circle).
  - RTKs activate PI3K (orange oval), which activates AKT (orange oval), which activates mTOR (orange oval).
  - RTKs also activate p38 (red circle) and p90RSK (blue circle).
- Regulation of RET:**
  - CDK7 (blue circle) and TFIIH (blue circle) form a complex that phosphorylates RET at S104/106 (yellow circle with 'P').
  - Cyclin A/E (red oval) and CDK2 (red oval) form a complex that phosphorylates RET at S118 (yellow circle with 'P').
  - PAK1 (grey oval) and PKA (grey oval) form a complex that phosphorylates RET at S167 (yellow circle with 'P').
  - ERK1/2 (blue circle) phosphorylates RET at S305 (yellow circle with 'P').
  - p38 (red circle) phosphorylates RET at T311 (yellow circle with 'P').
- RET Structure:** The RET protein is shown at the bottom with its N-terminus (N), AF-1 domain (green), DBD domain (blue), LBD/AF-2 domain (orange), and C-terminus (C). The phosphorylation sites are located on the AF-1 and LBD/AF-2 domains.

25



fosforilación. Distintos receptores tirosina quinasa (RTKs) inducen la fosforilación del ER, predominantemente a través de las vías RAS–RAF–ERK y PI3K/AKT. ERK1/2 fosforila al ER de manera directa y/o a través de p90RSK. AKT fosforila al ER de manera directa y/o a través de mTOR. La señalización río abajo de RET conduce a la activación de p70S6K y la fosforilación del ER a través de mTOR, independientemente de PI3K/AKT. La fosforilación del ER también puede ser mediada por otras quinasas intracelulares. Las flechas continuas indican las interacciones conocidas y definidas entre las moléculas de señalización; las flechas discontinuas indican interacciones que requieren más investigación. Las flechas rojas indican la principal vía de señalización de RET hacia la fosforilación del ER. Adaptado de (Morandi *et al.*, 2011).

A su vez, se ha demostrado que el gen de RET es un gen blanco directo del ER. El análisis de secuencias en el promotor de *Ret* presenta sitios consenso de unión del ER (Gattelli *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2007). La funcionalidad de dicha interacción se comprobó mediante la inducción de la expresión de RET por tratamiento con estrógenos en líneas celulares ER+ (Boulay *et al.*, 2008). Como era de esperar, esta inducción se bloquea mediante el tratamiento con tamoxifeno. Sin embargo, paradójicamente, se observó que el tratamiento crónico con algunos agentes endócrinos que bloquean la actividad del receptor de ER (tamoxifeno) resulta en un aumento de los niveles de RET (Gattelli *et al.*, 2020).

En resumen, existe entonces una relación compleja entre RET y ER que aún falta dilucidar. Dado que la longevidad en hembras está caracterizada por una disminución en los niveles de estrógenos circulantes y una menor actividad de ER, resulta interesante estudiar tanto la expresión como la activación de RET y el ER en un estadio representativo de longevidad (o bien post-menopausia) particularmente en un órgano hormono-respondedor como la glándula mamaria.

## VI. El ratón transgénico Ret/MTB como modelo de estudio de tumores mamarios

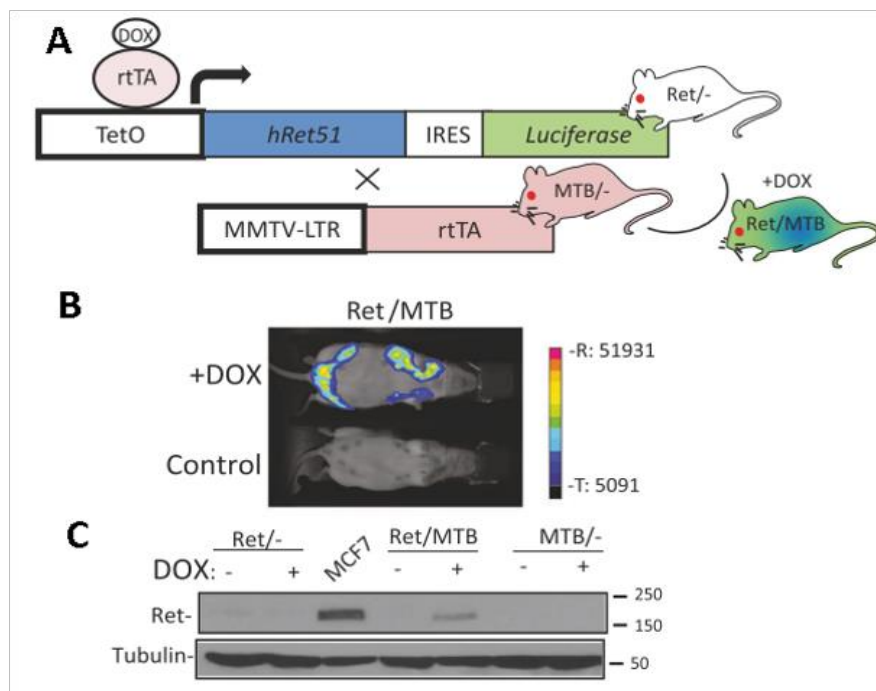
Para investigar la función oncogénica de la forma no mutada de *Ret in vivo*, contamos con la cepa de ratón transgénico (de *background* genético FVB/N) desarrollada por nuestro grupo (Gattelli *et al.*, 2018). En este sistema, la forma no mutada de *Ret51* humano salvaje o *wild-type* (WT) fue clonada e introducida río abajo del promotor mínimo de tetraciclina (TetO-Ret) (Gunther *et al.*, 2002). La secuencia IRES-luciferasa (Luc) se agregó para ser utilizada como gen reportero de la inducción del transgén (**Figura I7 A**).

Los ratones que contienen la secuencia TetO-Ret (Ret/-) se cruzan con los ratones de la cepa transgénica MMTV-rtTA (MTB/-), los cuales expresan el transactivador del promotor TetO dependiente de tetraciclina (rtTA) en el epitelio mamario, ambos de la cepa FVB/N. De

este modo, se genera la progenie bitransgénica a la que denominamos Ret/MTB (**Figura I7 A**).

Este sistema ha sido ampliamente utilizado para estudiar el efecto de otras proteínas oncogénicas como por ejemplo MYC y HER2 en la glándula mamaria (*Moody et al., 2002; Blakely et al., 2005*). En nuestro caso, la expresión del oncogén *Ret* y *Luc* es inducida mediante la ingesta del análogo del antibiótico tetraciclina, doxiciclina (DOX), en el agua de bebida de los ratones: en presencia de DOX, el rtTA se une a su promotor y la expresión de *Ret* es inducida selectivamente en la glándula mamaria. Luego de 2-3 días de administración de DOX, se detecta la inducción del transgén (*Gattelli et al., 2018*).

Los niveles de expresión del transgén en las glándulas mamarias pueden ser monitoreados *in vivo* usando bioluminiscencia, midiendo la actividad luciferasa luego de la inyección intraperitoneal de luciferina (**Figura I7 B**); o bien detectando la proteína RET mediante ensayos de *Western blot* (WB) con anticuerpos específicos sobre lisados del tejido mamario (**Figura I7 C**).

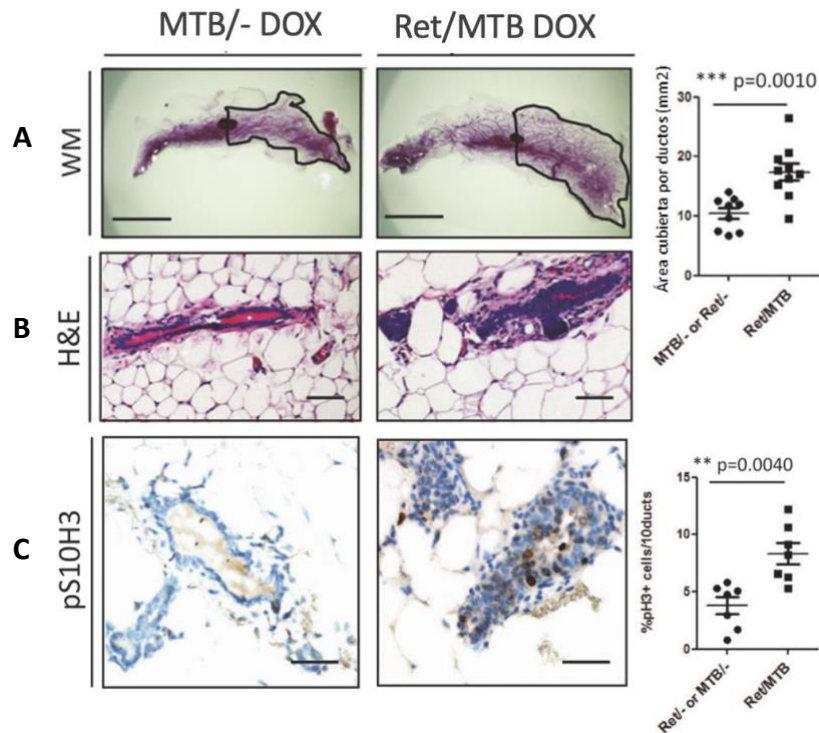


**Figura I7. Modelo tumoral de ratón transgénico Ret/MTB.** **A.** El ADNc de *Ret51* humano (hRet51) fue clonado a partir de células MCF7 e introducido río debajo del promotor de tetraciclina (TetO). El sitio IRES-luciferasa (Luc) se usa como gen reportero de la expresión del transgén. Para generar los animales bitransgénicos (Ret/MTB), los ratones conteniendo la secuencia TetO-Ret (Ret/-) fueron cruzados con la cepa transgénica conteniendo MMTV-rtTA (MTB/-), la cual expresa



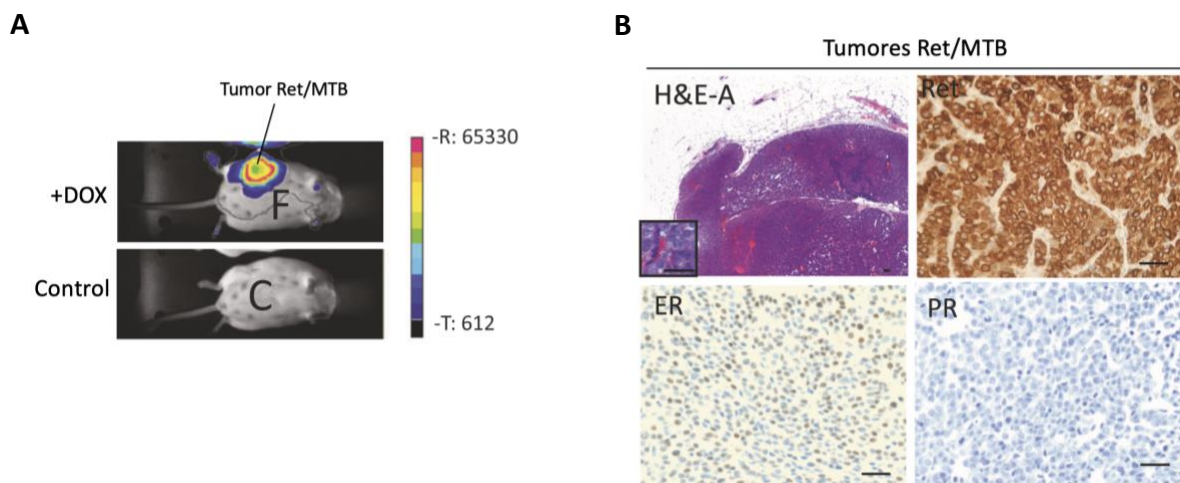
constitutivamente la proteína transactivadora del promotor TetO (rtTA) en las células del epitelio mamario. Mediante el agregado de doxíciclina (DOX) al agua de bebida de los ratones Ret/MTB, el rtTA se une a su promotor y la expresión de Ret y Luc es inducida en la glándula mamaria. **B.** La actividad de Luc en glándulas mamarias de ratones Ret/MTB vírgenes bajo 1 semana de tratamiento con DOX fue monitoreada por bioluminiscencia. Ratones sin tratamiento de DOX fueron usados como control negativo. **C.** La expresión de RET fue analizada mediante ensayos de WB usando anticuerpos específicos sobre lisados proteicos de tejido mamario de los ratones hembras transgénicos indicados, bajo tratamiento de DOX (+) o no (-). El lisado de células MCF7 fue usado como control positivo de la expresión de RET humano. Adaptado de (*Gattelli et al., 2018*).

En una primera instancia, transcurridos 2 meses de inducción crónica del sistema, la expresión de RET en la glándula mamaria de ratones transgénicos Ret/MTB promueve la generación de hiperplasias, distinguibles por un aumento de área cubierta por conductos y aumento significativo de marcadores de proliferación en células epiteliales (**Figura I8**). Transcurridos los 4-8 meses de inducción, la expresión crónica de RET en el epitelio mamario resulta en el desarrollo de tumores mamarios (*Gattelli et al., 2018*) (**Figura I9**). Estos tumores poseen características similares a los tumores luminales humanos (*Sorlie et al., 2003*); expresan niveles relativamente bajos de HER2, son ER+ pero negativos para PR (PR-), por lo que son resistentes a la terapia anti-estrogénica (*Gattelli et al., 2018*). De este modo, y dando relevancia a nuestro modelo transgénico, se reproducen las características de tumores humanos que expresan RET.



**Figura 18. La expresión de RET en ratones hembra Ret/MTB genera hiperplasias en las glándulas mamarias.** Hembras adultas tratadas en forma prolongada por 2 meses con DOX. **A.** Examen morfológico de WM. Las glándulas Ret/MTB son de mayor tamaño que las glándulas del grupo control MTB<sup>-/-</sup>, lo que resulta en un aumento significativo de las áreas cubiertas por conductos y grasa circundante. **B-C.** Cortes histológicos de tejido mamario teñidos con H&E e IHC específica de fosforilación de histona 3 (pS10H3) indican aumento de proliferación celular en los conductos hiperplásicos de los animales Ret/MTB. Los gráficos con las correspondientes cuantificaciones se indican la derecha de las imágenes. Adaptado de (*Gattelli et al., 2018*).





**Figura 19. La expresión crónica de RET en ratones hembra Ret/MTB genera tumores mamarios.** **A.** Actividad de luciferasa monitoreada por bioluminiscencia en hembras Ret/MTB, una hembra portadora de tumor luego de 5 meses de inducción con DOX (F) y una hembra a la que no se ha tratado con DOX (C). **B.** Características generales de los tumores generados por el sistema Ret/MTB: se observa la morfología por tinción por H&E e imágenes representativas de ensayos de IHC utilizando los anticuerpos indicados. Barra de escala 50  $\mu$ m. Adaptado de (Gattelli *et al.*, 2018).

Por otra parte, el sistema de ratón transgénico Ret/MTB es una herramienta muy útil, ya que, al ser un sistema inducible, la expresión RET puede ser encendida también a tiempos cortos, en cualquier momento del desarrollo de la glándula mamaria, para estudiar su función en la fisiología normal de la glándula (Vallone *et al.*, 2022).



Impacto de la longevidad del tejido  
de la glándula mamaria en las lesiones  
neoplásicas inducidas por el receptor RET  
M. Clara de los Santos

# Hipótesis y Objetivos





## Hipótesis de trabajo

Estudios previos del grupo han demostrado que la expresión crónica del receptor tirosina quinasa RET es oncogénica en el epitelio mamario. Dado que varios reportes indican que la longevidad aumenta la incidencia de tumores, postulamos que un microambiente envejecido en la glándula mamaria podría promover el proceso tumorigénico iniciado por RET.

## Objetivo general

La presente tesis tiene como objetivo general estudiar el impacto de la longevidad de la glándula mamaria en el desarrollo y las características de las lesiones neoplásicas inducidas por RET, lo cual creemos ayudará a entender su función patológica.

## Objetivos específicos

Para abordar la hipótesis de trabajo nos propusimos llevar a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar *in vivo* la incidencia tumoral en el sistema de ratón transgénico Ret/MTB en hembras longevas en comparación con hembras jóvenes. Analizar las características de las lesiones halladas entre ambos grupos.
2. Estudiar las características del tejido de la glándula mamaria de ratón en longevidad. Investigar la expresión y activación de RET y sus vías de señalización.



Impacto de la longevidad del tejido  
de la glándula mamaria en las lesiones  
neoplásicas inducidas por el receptor RET  
M. Clara de los Santos

# Materiales y Métodos



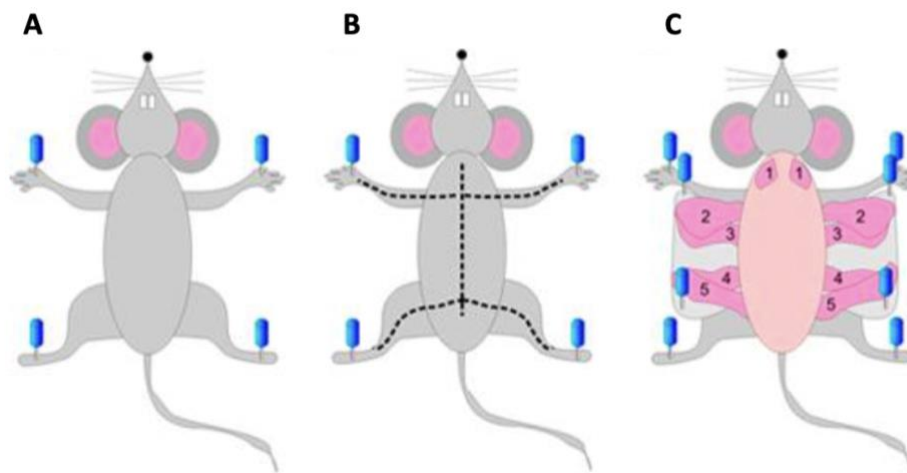
## I. Animales

Este estudio utilizó animales criados y mantenidos en el Bioterio Central (BC) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Los ratones se mantuvieron en *racks* ventilados, en ambientes a  $20 \pm 2$  °C, bajo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con acceso *ad libitum* a agua y alimento. Todas las condiciones de mantenimiento siguieron las normativas de la institución, la 'Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio' de NIH (Directiva 2010/63/UE) y las guías ARRIVE (Percie du Sert et al. 2020).

Todos los procedimientos experimentales utilizados en este trabajo se encuentran aprobados por el Comité Institucional Cuidado y buen Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCEN (protocolo#53, Dra. Gattelli aprobado 2016, enmienda aprobada 2018). Además, las personas a cargo de la concepción, diseño y realización de este proyecto, poseen aprobado el curso obligatorio de capacitación para el uso de animales de laboratorio dictado por la CICUAL.

## II. Ratones *wild type* (WT) de la cepa FVB/N

Se utilizaron glándulas mamarias de hembras FVB/N vírgenes longevas (10-12 meses de edad, n=11) y jóvenes (2-4 meses de edad, n=8). De cada hembra se colectaron las glándulas mamarias #4 de ambos flancos (**Figura M1**) y se obtuvieron las muestras correspondientes. A una de las glándulas #4 se le retiró el ganglio linfático y se la cortó en trocitos, los cuales se congelaron a -80°C para su utilización en técnicas de biología molecular. El resto del material extirpado se colocó en PFA 4% diluido en PBS 1X por 24 horas y luego se las mantuvo en ETOH 100% hasta el posterior procesamiento histológico.



**Figura M1. Procedimiento de autopsia de un ratón hembra.** **A.** Luego de la eutanasia, el animal es montado mediante chinchetas en las extremidades sobre la superficie de trabajo. **B.** Las líneas de puntos indican los cortes que se realizan en la piel del animal para ingresar a la cavidad corporal (sin ingresar al peritoneo) y poder reconocer las glándulas mamarias. **C.** Numeración según la disposición de las glándulas mamarias en el ratón hembra.

### III. Línea de ratones transgénicos Ret/MTB

El modelo transgénico Ret/MTB (de *background* genético FVB/N) descrito en la introducción (Gattelli *et al.*, 2018) se ha generado en el laboratorio de la Dra. Hynes en Suiza e incorporado y establecido al BC de la FCEN-UBA por la Dra. Gattelli.

#### III. I. Mantenimiento de la línea transgénica

Con el objetivo de mantener la línea, se aparearon los ratones mediante retro-cruzas a partir del mes de vida siguiendo los métodos recomendados por la CICUAL. Según una segregación mendeliana, a partir del cruzamiento de los animales simple transgénicos Ret/- y MTB/-, se obtuvieron todas las variantes genéticas: Ret/-, MTB/-, Ret/MTB y -/-. En algunos casos, también se realizaron cruzamiento de los animales bitransgénicos Ret/MTB y -/-. Siempre se mantuvieron los animales en heterocigosis respecto de los genes Ret y MTB. El cruzamiento de los animales se realizó aproximadamente cada 3 meses y hasta el año de vida para los machos y 6 meses para las hembras aproximadamente, para evitar la longevidad sexual de los individuos.

#### III. II. Genotipado de los animales



### III. II. I. Extracción de DNA genómico

A partir de los 21 días de vida, se les extrajo a los animales una pequeña porción de tejido de las orejas (cartílago). A los fragmentos extraídos contenidos en un tubo *ependorff* se les agregó 75 µl de una solución de lisis alcalina (NaOH 25mM y buffer EDTA a pH 12) y se los calentó a 95°C por 30 minutos. Pasado este tiempo, luego de reposar 10 minutos, se agregó a cada tubo 75 µl de una solución de neutralización (buffer Tris-HCl 40 mM a pH 5). Luego de éste procedimiento, se espera que el DNA genómico quede libre en solución. Las muestras pueden utilizarse inmediatamente o se conservan a -20°C.

### III. II. II. PCR de punto final

La genotipificación de la línea transgénica se efectuó a través de reacciones de PCR, donde se utilizaron dos pares de *primers* específicos (*Gattelli et al., 2018*). Uno de ellos se utilizó para amplificar una región genómica codificante para la proteína RET 51 humana (Ret) y parte del vector, el cual corresponde a un producto de 200 pb. El otro par de *primers* se utilizó para reconocer la presencia del promotor MMTV-rtTA (MTB), con un producto de amplificación de 354 pb (**Tabla M1**).

En cada muestra se analizó la presencia de ambos genes, lo cual implica 2 reacciones de PCR, una por cada par de *primers*. La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, donde 3 µl corresponden al DNA genómico (obtenido como se indica en el punto anterior) y 22 µl a la mezcla de reactivos para PCR, compuesta por: 2,5 µl de buffer 10X, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µl de taq (PB-L Productos Biológicos), 0,5 µl dNTPs (Lobov Científica), 0,1 µl de primer *forward*, 0,1 µl de primer *reverse* y 17,1 µl de H<sub>2</sub>O destilada.

Se utilizó un termociclador BIO-RAD T100. Las condiciones de ciclado para la reacción fueron: un paso inicial a 95°C por 3 minutos para desnaturalizar las hebras de ADN, seguido por 30 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos para permitir la hibridización de los *primers* con las cadenas de ADN y 72°C por 45 segundos para la extensión del producto. Finalmente, se realiza una extensión final a 72°C por 2 minutos para permitir la elongación de los fragmentos que podrían haber quedado incompletos.



Los productos de PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en solución *buffer* TAE adicionándose a la preparación de agarosa con bromuro de etidio (BrEth) (0,5 µg/ml). En una calle adicional se corrió un marcador de peso molecular (producción IFIBYNE), conteniendo fragmentos de DNA de longitud conocida. De ésta forma, se pudo corroborar el tamaño de los productos de amplificación obtenidos mediante la reacción de PCR. Los animales dobles transgénicos (bitransgénicos) se reconocieron por ser positivos para ambas amplificaciones, mientras que los simple transgénicos resultan positivos para una u otra banda.

Fragmento génico a detectar	Secuencia de <i>primers</i> utilizados	Longitud del producto de PCR (pb)
Ret	<i>Forward:</i> 5'-ATCCACGCTGTTTTGACCTC-3' <i>Reverse:</i> 5'-CGAGAAGTAGAGGCCCAATG-3'	200
MTB	<i>Forward:</i> 5'-ATCCGCACCCTTGATGACTCCG-3' <i>Reverse:</i> 5'-GGCTATCAACCAACACACTGCCAC-3'	354

**Tabla M1.** Secuencias de los *primers* para el genotipado de los animales transgénicos del modelo Ret/MTB utilizados en ensayos de PCR.

#### IV. Inducción *in vivo* de la expresión de *Ret* en ratones hembras longevas y jóvenes en el sistema transgénico Ret/MTB

Mediante los cruzamientos mencionados en III. I. se generaron hembras bitransgénicas Ret/MTB, simple transgénicas Ret/- o MTB/- y hembras no transgénicas -/-. En este trabajo, se realizaron dos experimentos independientes de inducción del sistema transgénico, y posteriormente, se realizó un análisis en conjunto sobre los resultados obtenidos de ambos experimentos. Se trabajó con un número total de 13 hembras Ret/MTB jóvenes (2-4 meses de edad), un grupo de 9 hembras Ret/MTB longevas (8-12 meses de edad), y un grupo de 4 hembras -/- (no transgénicas) longevas como control. Cabe aclarar que todas las hembras utilizadas a lo largo de todo el trabajo eran vírgenes.

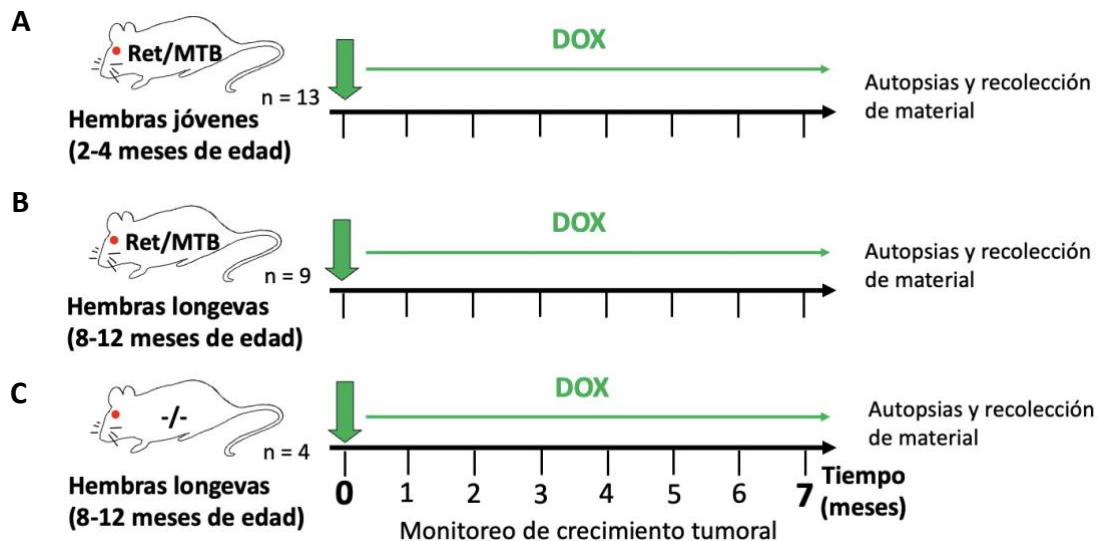
A los 3 grupos mencionados se les administró el antibiótico doxiciclina (DOX) (*Jenner Lafarvet*), agregándolo al agua de bebida (2g/l), durante 7 meses (**Figura M2**). La



administración de DOX tuvo como objetivo la inducción del sistema transgénico: sólo las hembras Ret/MTB tendrán expresión del transgén *Ret* (y la proteína RET) en las células epiteliales de las glándulas mamarias. En aquellos animales donde la sobre-expresión de RET produjo tumores, se monitoreó el crecimiento tumoral en los 2 grupos de animales transgénicos a lo largo de los 7 meses. La solución de DOX fue preparada *de novo* y renovada cada 3-4 días de los bebederos. Se utilizaron botellas color caramelo como bebederos para mantener protegida la doxyciclina de la luz.

Los animales fueron sacrificados a los 7 meses de administración del antibiótico, o cuando el tamaño tumoral superó los 1500 mm<sup>3</sup> aproximadamente, como lo indican los comités de ética internacionales. Se procedió con las eutanasias (cámara de CO<sub>2</sub> y/o dislocación cervical) y las autopsias según el protocolo del CICUAL correspondiente. De cada animal, se conservaron al menos 2 glándulas mamarias libres de tumor: una que se colocó en PFA 4% (en PBS 1X) para el posterior procesamiento histológico y otra a la que se le retiró el ganglio linfático, se cortó en trocitos y se guardó en -80°C para su utilización en técnicas de biología molecular. En los ratones que desarrollaron tumores, se extrajo el tejido tumoral, almacenando parte del tumor en trocitos en -80°C y otra parte del tumor rodeado por la grasa circundante fue conservado para el posterior procesamiento histológico, tal como se mencionó previamente.

Los pulmones de todos los ratones también fueron extirpados y fijados en solución de Bouin (*Gattelli et al., 2013*). Posteriormente, se observaron los pulmones en la lupa y se cuantificó la presencia de focos metastásicos. Se separó cada lóbulo del pulmón y se analizó la presencia de focos en cada uno de ellos. El fijador de Bouin tiñe a todo el órgano de color amarillo, dejando los focos metastásicos de color blanco fácilmente observables a la lupa.



**Figura M2. Diseño experimental de inducción de la expresión de RET en el sistema de ratón transgénico Ret/MTB. A-C.** Se indujo la expresión crónica de RET en la glándula mamaria mediante la administración de DOX en el agua de bebida durante 7 meses de hembras Ret/MTB jóvenes (A,  $n=13$ ) y longevas (B,  $n=9$ ). Se utilizó un grupo de hembras longevas no transgénicas (-/-) como control (C,  $n=4$ ). Se realizaron 2 experimentos independientes de inducción del sistema utilizando en cada uno 3 grupos de animales para cada condición. Se indica la suma del número de animales utilizados en cada experimento. En el caso de desarrollo de tumor, se monitoreó el crecimiento tumoral. Pasados los 7 meses, todos los animales se sacrificaron y se recolectó el material para su posterior análisis.

## V. Registro del ciclo reproductivo de los animales experimentales por frotis vaginal

Previo a realizar los experimentos de inducción del sistema Ret/MTB, se analizó el estado del ciclo reproductivo del grupo de hembras jóvenes (2-4 meses de edad) y longevas (8-12 meses de edad). Este estudio se realizó sobre los 3 grupos experimentales que posteriormente se sometieron a la inducción del sistema Ret/MTB (**Figura M2**), así como también sobre un grupo adicional de hembras jóvenes no transgénicas (-/-) que no formaron parte del experimento de inducción.

### V. I. Recolección de células vaginales

La recolección de las muestras se realizó en el laboratorio de experimentación del Bioterio Central de la FCEN de la UBA, donde se encontraban alojados los animales utilizados en este trabajo. Usando una micropipeta de 200  $\mu$ l, se tomaron aproximadamente 50  $\mu$ l de PBS 1x. Dentro de la campana de ventilación, se sacó al ratón de la jaula y se lo colocó en la tapa de la misma y, sujetando firmemente la cola del ratón, se le elevó la parte trasera. Luego, se

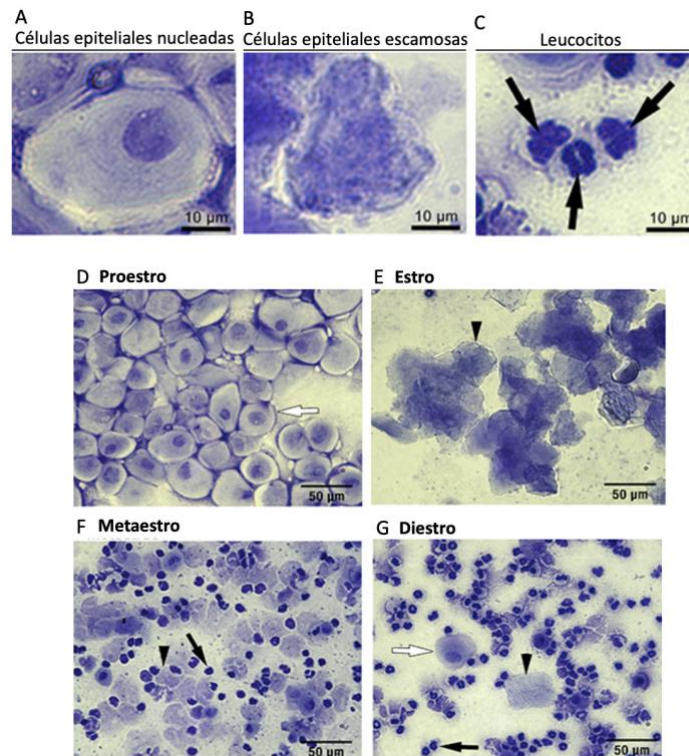




colocó el extremo de la punta del *tip* conteniendo PBS 1X en la entrada del canal vaginal, teniendo especial cuidado de no penetrar el orificio. Luego, se presionó suavemente el émbolo de la micropipeta, expulsando aproximadamente la mitad del volumen (25ul), hacia el interior del canal vaginal. Inmediatamente después, se soltó lentamente la presión ejercida sobre el émbolo, permitiendo que el líquido salga del canal vaginal y entrase en el *tip*. Se repitieron estos últimos dos pasos unas 4 o 5 veces para cada ratón, para procurar obtener una cantidad suficiente de células para cada muestra. Finalmente, se colocó la muestra tomada sobre un portaobjetos, se observó al microscopio óptico para corroborar suficiente cantidad de células, y se la dejó secar completamente a temperatura ambiente, para su posterior tinción con cristal violeta. Los animales volvieron a colocarse en sus respectivas cajas. Este protocolo se llevó a cabo durante cinco días consecutivos, para lograr observar el cambio en la tipología de las células epiteliales del canal vaginal y así evaluar, luego de la tinción, el estado del ciclo reproductivo según lo reportado (**Figura M3**).

## **V. II. Tinción con cristal violeta**

Se colocaron los portaobjetos con las muestras completamente secas en un frasco *Coplin* conteniendo el cristal violeta durante 1 minuto. Luego, se pasaron las muestras a un segundo frasco *Coplin* y se realizaron 2 lavados de 1 minuto cada uno con agua destilada. Finalmente, se montaron las muestras con bálsamo sintético y se dejaron secar a temperatura ambiente antes de su observación al microscopio óptico.



**Figura M3. Determinación de ciclo sexual por evaluación tipológica de frotis vaginales de ratón.** Por medio de esta técnica se pueden identificar tres tipos de células principales en muestras de frotis vaginal: **A.** células epiteliales nucleadas, **B.** células epiteliales escamosas cornificadas y **C.** leucocitos. La proporción de estos tipos de células presentes en el frotis se puede utilizar para identificar ratones en **(D)** proestro, **(E)** estro, **(F)** metaestro o **(G)** diestro. Las puntas de flecha negra indican la morfología típica de células epiteliales escamosas cornificadas, las flechas negras señalan leucocitos y las flechas blancas resaltan células epiteliales nucleadas. Adaptado de (McLean et al., 2012).

## VI. Monitoreo de crecimiento tumoral

Durante los 7 meses de inducción con doxiciclina se monitoreó semanalmente el crecimiento tumoral en cada ratón perteneciente a cada grupo experimental (**Figura M2**), palpando cada una de las glándulas mamarias de la hembra. En el caso de que la hembra desarrollase algún tumor, se midió el tamaño de este con un calibre, registrando el ancho y largo del mismo cada semana. Para la generación de las curvas de crecimiento tumoral (**Figura R3**), se calculó el volumen tumoral mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \text{largo (mm)} * (\text{ancho (mm)})^2 * \frac{\pi}{6}$$



Esta fórmula permite estimar el volumen de un tumor asumiendo que su forma es aproximadamente elipsoidal y es comúnmente utilizado en investigaciones científicas que utilizan modelos de generación de tumores en ratones (*Gattelli et al, 2018*).

En el caso de que una hembra desarrollase más de un tumor, se registró el tamaño de todos, pero se utilizaron los valores correspondientes al tumor que se detectó primero para graficar las curvas de crecimiento tumoral.

## VII. Cálculo de incidencia y frecuencia tumoral e incidencia de metástasis

La incidencia tumoral, que es una medida de la cantidad de ratones que desarrollan tumor respecto del total de animales analizados se calculó, para cada grupo de estudio (Ret/MTB jóvenes y longevas, y longevas -/-), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia tumoral} = \frac{\# \text{ animales con al menos un tumor}}{\# \text{ total de animales}}$$

La frecuencia tumoral, que se refiere al número promedio de tumores desarrollados por animal, para cada grupo de estudio, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia tumoral (\# tumores por animal)} = \frac{\# \text{ total de tumores}}{\# \text{ total de animales con al menos un tumor}}$$

Para el cálculo de la incidencia de metástasis pulmonares, se consideró únicamente en la presencia o ausencia de focos metastásicos en cada pulmón, y no en el número de focos metastásicos de cada uno. La superficie de todos los lóbulos pulmonares teñidos con solución de Bouin se observó detenidamente bajo lupa (Leica). La incidencia de metástasis se calculó para cada grupo de estudio mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia de metástasis} = \frac{\# \text{ animales con al menos un foco metastásico en pulmon}}{\# \text{ animales con al menos un tumor}}$$

Los parámetros de incidencia se expresaron generalmente en %. No se incluyó al grupo de longevas no transgénicas en el análisis de frecuencia tumoral, así como tampoco de incidencia de metástasis dado que ninguna hembra de este grupo desarrolló tumores.

## VIII. Registro del peso de los ratones



Mediante el uso de una balanza, se registró el peso corporal de cada uno de los ratones utilizados en el ensayo (**Figura M2**). El registro del peso se realizó cada 40 días aproximadamente, durante los 7 meses de inducción con DOX. Para la generación de las curvas, se agruparon los ratones únicamente por edad (joven y longeva), sin discriminar por el genotipo. Se graficó el peso promedio de los ratones de cada grupo en cada día de medición.

## IX. Análisis histológico

El tejido extraído y conservado en PFA 4% posteriormente fue trasladado a ETOH 70% para evitar el sobre-endurecimiento de los tejidos. El mismo se envió a servicios técnicos externos para su procesamiento y obtención de tacos de parafina, de cortes en blanco y de cortes sucesivos teñidos con hematoxilina-eosina (H&E). Los cortes sucesivos de H&E se utilizaron para tener una exploración más en profundidad del órgano, analizar diferencias en la morfología de las glándulas envejecidas (comparadas a las jóvenes) y para poder determinar la incidencia tumoral resultante del experimento realizado en el modelo transgénico Ret/MTB (**Figura M2**).

Todas las imágenes histológicas fueron obtenidas mediante microscopio óptico (Microscopio Olympus CX31) con ocular 10x y objetivos de aumentos 4x, 10x y 40x, resultando magnificaciones de X40, X100 y X400, respectivamente. Las imágenes histológicas se informan con la magnificación correspondiente.

## X. Ensayos de inmunohistoquímica (IHQ)

Se utilizaron cortes de entre 5 y 6  $\mu\text{m}$  de espesor del material montado en portaobjetos silanizados. Para desparafinar las muestras, los vidrios se incubaron a 60°C por 45 minutos y luego se colocaron en xilol durante 10 minutos. Posteriormente, se hidrataron los cortes con pasajes de 3 minutos en alcohol de concentración decreciente (100%, 95% y 70%). A continuación, se realizó la recuperación antigénica colocando los vidrios en buffer citrato (Citrato de sodio 1 mM, pH 6) e incubándolos en microondas durante 10 minutos a una temperatura de sub-ebullición. Posteriormente, para inactivar la enzima peroxidasa endógena se incubaron las muestras por 10 minutos en  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en PBS y luego se realizaron tres lavados en PBS de 3 minutos cada uno. Este paso es crucial ya que se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, por lo que la actividad de la peroxidasa endógena debe ser



agotada. Seguido a eso, se realizó el bloqueo del pegado inespecífico de los anticuerpos con una solución de BSA al 2,5% en PBS en cámara húmeda por 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron preparados en BSA al 2,5% en PBS (**Tabla M2**) e incubados en cámara húmeda toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos, cada uno con PBS, y se incubaron los vidrios con el anticuerpo secundario anti-*Rabbit* biotinilado preparado en BSA al 2,5% en PBS en cámara húmeda a temperatura ambiente por 1 hora. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Con el objetivo de amplificar la señal resultante se incubaron las muestras con una solución de un complejo biotina-avidina unidas a peroxidasa (VECTASTAIN® ABC kit, Vector) en una dilución 1:1 en PBS, la cual se incubó por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego, se llevaron a cabo 3 lavados de 5 minutos con PBS y se agregó el reactivo DAB durante aproximadamente 1 minuto. El DAB es procesado por la peroxidasa unida al complejo, dando un precipitado marrón en el lugar donde se encuentra la proteína de interés. Luego de visualizar la marcación deseada se frenó la reacción con agua destilada y finalmente se realizó una contra-tinción con hematoxilina (entre 1 a 2 minutos) para teñir los núcleos celulares. Se procedió con la deshidratación de las muestras con pasajes sucesivos en alcohol con concentración creciente. Finalmente, se embebieron los vidrios en xilol y se montaron con bálsamo sintético para, luego de su secado, observar al microscopio óptico y tomar las fotografías de los aumentos deseados como se describió anteriormente.

Como control de la especificidad del anticuerpo secundario, en algunas muestras no se utilizó anticuerpo primario.

Proteína específica a detectar	Concentración utilizada del anticuerpo	Proveedor del anticuerpo	Nº de catálogo del anticuerpo
ER	1:1000	<i>Santa Cruz</i>	#542
PR	1:200	<i>Thermo Fisher</i>	RM-9102-S0
<i>Rabbit-FC</i>	1:400	<i>Vectastain Elite ABC-HRP Kit</i>	PK-6101

**Tabla M2.** Anticuerpos utilizados para los ensayos de IHC.



## **XI. Análisis de proteínas por ensayos de *Western Blot* (WB)**

### **XI. I. Extracción de proteínas**

A partir del tejido mamario conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se obtuvieron extractos de proteínas totales. Se utilizó solución de lisis RIPA (Tris-HCl 20 mM, pH=7.4; EDTA 2mM; NaCl 137 mM; Glicerol 10%; SDS 0,1%; Deoxicolato de Sodio 0,5%; Tritón X100 1%) suplementada con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem, San Diego, CA*) y de fosfatasa (NaF 1mM, glicerolfosfato de sodio 40 mM y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM). De cada muestra se tomó un trozo de tejido de aproximadamente medio centímetro de diámetro y se lo colocó en un *ependorf* de 2 ml conteniendo 600  $\mu\text{l}$  de la solución de lisis. Las muestras se homogeneizaron utilizando Ultraturax T25 (Ika Labortechnik Staufen, Alemania) realizando al menos 2 pulsos de 5 seg (colocando las muestras en hielo entre cada pulso, de modo de evitar el aumento de temperatura) hasta lograr la completa disociación del tejido. Los extractos se incubaron 10-20 minutos en hielo y luego se centrifugaron por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 12000 rpm. Posteriormente, se separó el sobrenadante, y este se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **XI. II. Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante el método Bradford realizando una dilución 1:10 en PBS a cada muestra y una curva de calibración con concentraciones crecientes (1-12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de albúmina sérica bovina (BSA, Promega). Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  de cada muestra o punto de la curva y se sembraron en placas de 96 pocillos (BD) con 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford (*Coomassie Blue G250* 4%; Etanol 5%; ácido fosfórico 8,5%). Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro y se construyó la curva de calibración correspondiente graficando la absorbancia en función de la concentración de BSA. Luego, se tomó la función de la curva, que responde a la Ley de Lambert-Beer y se utilizó la misma para calcular la concentración de las muestras incógnita. Esto es posible si la absorbancia de las muestras coincide con la zona de linealidad de la curva de calibración. Para este trabajo se utilizaron curvas con un  $R^2$  mayor a 0,9.

### **XI. III. Ensayo de WB**

A partir de los extractos proteicos, se tomaron volúmenes conteniendo 40-60  $\mu\text{g}$  de proteínas y se llevaron a un volumen final de 40  $\mu\text{l}$  con PBS 1X. Posteriormente, se agregaron





a todas las muestras 10  $\mu$ l de buffer de siembra (Tris-HCl 50mM, pH 6.8; SDS 2%; Glicerol 10%; Azul de Bromofenol 0,006%) y beta-mercaptoetanol 1%. Luego, se incubaron las muestras durante 10 minutos a 95°C para completar el proceso necesario de desnaturalización de las proteínas.

Se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Dependiendo del grado de resolución deseado entre las proteínas, se realizaron geles de poliacrilamida (Bio-Rad) de diferente concentración (entre 10 y 12,5%).

Se sembraron 20  $\mu$ l de muestra en cada calle del gel, junto con un marcador de peso molecular conocido (*Rainbow marker*, GE). Las electroforesis fueron realizadas a voltaje constante (100V durante aprox. 20 minutos, seguido de 160V por 1 hora y media aprox.), en el buffer de corrida (Tris-HCl 25 mM, pH 8.8; Glicina 192 mM; SDS 0.1 %).

Finalizada la corrida, las muestras se transfirieron a una membrana de PVDF (GE *HealthCare*), o de nitrocelulosa, mediante una transferencia de tipo húmeda. La transferencia se realizó a amperaje constante (0,3A) durante 1 hora 30min o a voltaje constante (30V) durante 16 horas. Esta última se utilizó particularmente para mejorar la transferencia de proteínas de alto peso molecular, como lo es RET.

Posteriormente, se corroboró la correcta electro-transferencia, las membranas fueron teñidas con una solución de rojo Ponceau-S (Rojo Ponceau 0,1 %; Ácido Acético 5 %). Luego, se lavaron con agua destilada y posteriormente con TBS-T 0,1% (Tween 0,1% en TBS 1X).

A continuación, se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente en leche 5% en TBS-T 0,1%. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación con la dilución deseada de los anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés (**Tabla M3**), preparados previamente en leche 5% en TBS-T.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en TBS-T. Luego se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con diluciones de los respectivos anticuerpos secundarios específicos de la especie (porción FC) del anticuerpo primario (anti-*Rabbit* o anti-*Mouse* según la especie del anticuerpo primario) preparados en





leche 5% en TBS-T. Una vez transcurrida esta incubación, se realizaron 6 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T.

Finalmente, se realizó el revelado del ensayo mediante una reacción quimioluminiscente utilizando el reactivo ECL+PlusSystem (*GE HealthCare*) y exposición en placas radiográficas (*Thermo Scientific*) a diferentes tiempos (10 seg a 30 seg, 1 min, 5 min, 15 min y 30 min).

Proteína específica a detectar	Dilución del anticuerpo	Proveedor del anticuerpo	Nº de catálogo del anticuerpo
RET	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	#3223
pY1062RET	1:1000	<i>Santa Cruz</i>	#20252
ER	1:1000	<i>Santa Cruz</i>	#542
pS118ER	1:1000	<i>Upstate</i>	05-793
pS167ER	1:1000	<i>Santa Cruz</i>	#101676
PR	1:1000	<i>Thermo Fisher</i>	RM-9102-S0
ERK	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	#9102
pT202/Y204 ERK	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	#9101
AKT	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	#9272
pS473AKT	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	#9271
STAT3	1:1000	<i>Transduction Lab</i>	#610190
pY705STAT3	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	#9131
Vinculina	1:2000	<i>Santa Cruz</i>	#73614
Gapdh	1:2000	<i>Santa Cruz</i>	#32233
<i>Rabbit-FC</i>	1:5000	<i>Amersham</i>	NA934
<i>Mouse-FC</i>	1:5000	<i>Amersham</i>	NA931

**Tabla M3.** Anticuerpos utilizados en los ensayos de WB.

#### **XI. IV. Cuantificación de los resultados**



A pesar de que el WB no es el mejor método cuantitativo de los niveles de proteínas, se decidió igualmente realizar un análisis de densidad de las bandas obtenidas, en el caso de RET, pY1062RET, pS118ER y pS167ER. Para ello, se llevó a cabo la cuantificación de las bandas del WB utilizando el procesador de imágenes ImageJ. En el caso de RET, se expresó el resultado como unidades relativas de intensidad de la banda obtenida para RET respecto de la banda obtenida para Vinculina. En el caso de pY1062RET, se expresó el resultado como unidades relativas de intensidad de la banda obtenida para pY1062RET respecto de la banda obtenida para RET total. Tanto la cuantificación de pS118ER, como la de pS167ER, se expresó como unidades relativas de intensidad de la banda obtenida para cada una respecto de la banda obtenida para ER total. En el caso de que una misma muestra se utilizase en distintos *blots* con el mismo anticuerpo, para la cuantificación se eligió el resultado obtenido solo en uno de ellos.

## **XII. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism* 7. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. Para las comparaciones realizadas entre dos grupos (como en el caso de las cuantificaciones realizadas de los WB, la frecuencia tumoral y el peso de los ratones) se realizó la prueba t de *Student*, posteriormente a la corroboración de la distribución normal de los datos. Para los análisis de contingencia (como en el caso de la incidencia tumoral y la incidencia de metástasis) se realizó la prueba de Fisher. Se consideraron significativas las diferencias de  $p < 0,05$ .



Impacto de la longevidad del tejido  
de la glándula mamaria en las lesiones  
neoplásicas inducidas por el receptor RET  
M. Clara de los Santos

# Resultados



Impacto de la longevidad del tejido  
de la glándula mamaria en las lesiones  
neoplásicas inducidas por el receptor RET  
M. Clara de los Santos

# Parte I

Evaluación del impacto de la longevidad  
en el proceso tumorigénico inducido por  
RET en la glándula mamaria

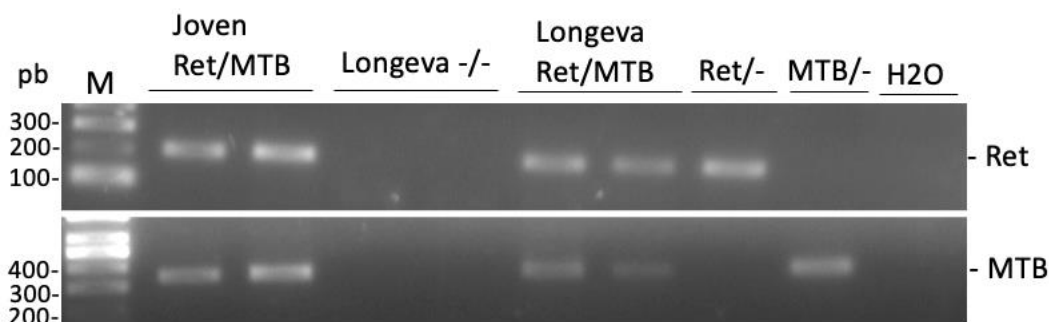


En esta primera parte del trabajo (Parte I) nos propusimos estudiar el efecto de la longevidad en el desarrollo de lesiones neoplásicas y/o tumores inducidos por RET, utilizando el modelo de ratón bitransgénico Ret/MTB.

## **I. I. Preparación de los grupos experimentales de hembras jóvenes y longevas en el modelo de ratón transgénico Ret/MTB.**

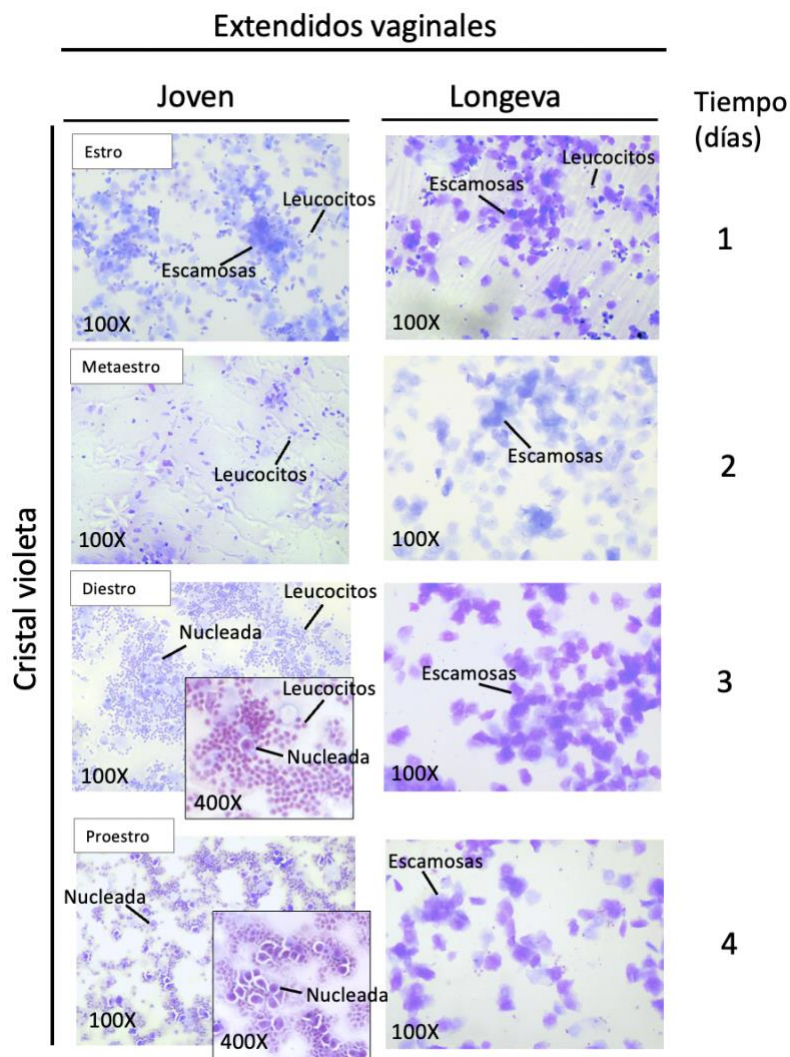
Como se mencionó previamente, utilizando este sistema de ratón transgénico Ret/MTB, nuestro grupo demostró que la expresión del RET humano en el epitelio de las glándulas mamarias de ratones hembra FVB/N genera hiperplasias al cabo de 2 meses y luego, a partir de los 4 meses de sobre-expresión crónica del transgén, genera tumores mamarios del tipo luminal ER+PR- (*Gattelli et al., 2018*). Dado que estos resultados fueron obtenidos utilizando hembras adultas jóvenes; en un rango de 3 a 6 meses de edad, en este trabajo nos propusimos evaluar el desarrollo tumoral inducido por RET en hembras longevas. Utilizamos ratones hembra vírgenes de entre 8 y 12 meses de edad como grupo longevo.

En primer lugar, se corroboraron los genotipos de los animales transgénicos del sistema Ret/MTB que se utilizaron en los grupos experimentales y control (**Figura R1**). Para ello, se extrajo DNA genómico de muestras de tejido de cartílago de orejas de cada uno de los ratones. Luego, se procedió a realizar una reacción de PCR de punto final con *primers* específicos especialmente diseñados para detectar la secuencia MTB o bien la secuencia del transgén Ret (*Gattelli et al., 2018*). Utilizamos tres grupos de hembras: un grupo de hembras jóvenes bitransgénicas Ret/MTB; un grupo de hembras longevas bitransgénicas Ret/MTB, y un grupo control de hembras longevas no transgénicas (nombradas como -/-). Agregamos además como control adicional un grupo de hembras simple transgénicas que llevan solo el transgén (Ret/-) o la secuencia MTB (MTB/-); estas muestras se utilizaron como control positivo de Ret (y negativo para MTB) o como control positivo de MTB (y negativo para Ret), respectivamente.



**Figura R1. Determinación del genotipado de los ratones hembra transgénicos del sistema Ret/MTB utilizados en los sucesivos experimentos.** En muestras de DNA genómico de los animales, se verificó la presencia del transgén Ret y de MTB en las hembras Ret/MTB (longevas y jóvenes), y la ausencia de ellos en las longevas  $-/-$ . Se muestra una imagen representativa del producto de PCR obtenido y analizado en gel de agarosa con BrEt. La presencia/ausencia y tamaño de las bandas correspondientes se corroboraron mediante controles positivos para Ret (Ret/-) y MTB (MTB/-) y el agregado de un marcador de peso molecular (M), respectivamente. Como control negativo se utilizó una muestra sin DNA genómico, reemplazada por agua (H<sub>2</sub>O).

Por otro lado, previo a comenzar el experimento, se analizó el estado del ciclo reproductivo en las hembras jóvenes y longevas, para constatar que las hembras longevas representen un estado similar al de mujeres post- o peri-menopáusicas (**Figura R2**). Para ello, durante 4-5 días consecutivos se analizó la tipología de las células epiteliales del canal vaginal a ambos grupos por frotis, siguiendo protocolos previamente descriptos (McLean, A.C., et al, 2012).



**Figura R2. Evaluación de la tipología de extendidos vaginales de los ratones hembra utilizados en los sucesivos experimentos.** Durante 4 días consecutivos, las células fueron visualizadas por tinción con cristal violeta luego de su fijación. El estudio incluyó hembras jóvenes de 2-4 meses y hembras longevas de 8-12 meses, tanto transgénicas como no transgénicas en ambos casos. La proporción de los distintos tipos de células (leucocitos, escamosas y nucleadas) presentes en el frotis permite identificar cada etapa del ciclo reproductivo (proestro, estro, metaestro y diestro). Las hembras longevas presentaron ciclos de mayor duración o no-fluctuantes en el tiempo estudiado. En la figura se muestran fotos representativas del análisis de los extendidos vaginales de una hembra longeva no-fluctuante y una hembra joven.

El ciclo reproductivo murino en hembras jóvenes suele durar 4 días y se divide en 4 etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. Las fluctuaciones definidas en los niveles de distintas hormonas inducen la transición de una etapa reproductiva a la siguiente, y los cambios en la tipología celular dentro del canal vaginal murino reflejan estos eventos endocrinos subyacentes (**Figura M3**). El proestro se caracteriza por predominancia de células epiteliales nucleadas, redondas y bien formadas. Durante el estro, las células son predominantemente





células epiteliales escamosas cornificadas, presentes en conglomerados densamente empaquetados. En metaestro pueden observarse algunas células escamosas cornificadas, a menudo en fragmentos, pero predominan los leucocitos pequeños y teñidos de color oscuro. Finalmente, durante el diestro, los linfocitos siguen predominando, y comienzan a aparecer células epiteliales nucleadas (*McLean, A.C. et al, 2012*). La evaluación diaria de la tipología de las células epiteliales vaginales nos permitió discriminar claramente hembras jóvenes de aquellas a las que consideramos longevas en nuestros experimentos. En la evaluación del ciclo reproductivo de las hembras utilizadas, observamos que las hembras jóvenes fluctuaban entre las 4 etapas reproductivas al cabo de 4 días, mientras que las hembras longevas presentaban ciclos reproductivos de mayor duración o incluso no fluctuantes, ya que no se observaron cambios en la tipología celular en el tiempo estudiado (**Figura R2**). Si bien no medimos los niveles de las hormonas sexuales circulantes, especulamos que el aletargamiento del ciclo reproductivo del grupo de hembras longevas se debe a una disminución de los estrógenos, siendo éstas las características reportadas en la bibliografía para definir animales longevos (*Nelson, J. F. et al., 1982; Liu et al., 2022*). No se observaron cambios en el ciclo reproductivo entre longevas transgénicas (Ret/MTB) y no-transgénicas (-/-), así como tampoco entre jóvenes transgénicas y no-transgénicas, por lo que descartamos la posibilidad de que el transgén este influyendo en el ciclo reproductivo.

Una vez establecidos los grupos experimentales y control, longevas y jóvenes, se procedió con la realización de los experimentos de inducción tumoral en el sistema transgénico Ret/MTB.

## **I. II. Estudio del desarrollo y progresión tumoral de lesiones inducidas por RET en el sistema transgénico Ret/MTB en hembras jóvenes y longevas**

Con el objetivo de estudiar el impacto de la utilización de hembras longevas en la generación de tumores por expresión crónica de RET, procedimos con la inducción de RET en el sistema transgénico Ret/MTB en 3 grupos de ratones definidos como se describió anteriormente: un grupo de hembras jóvenes (2-4 meses) bitransgénicas Ret/MTB; un grupo de hembras longevas (8-12 meses) bitransgénicas Ret/MTB, y un grupo control de hembras longevas no transgénicas (-/-) (**Figura R3 A**). A lo largo de los 7 meses de inducción, mediante la ingesta *ad libitum* de DOX contenida en el agua de bebida, se monitoreó semanalmente a los

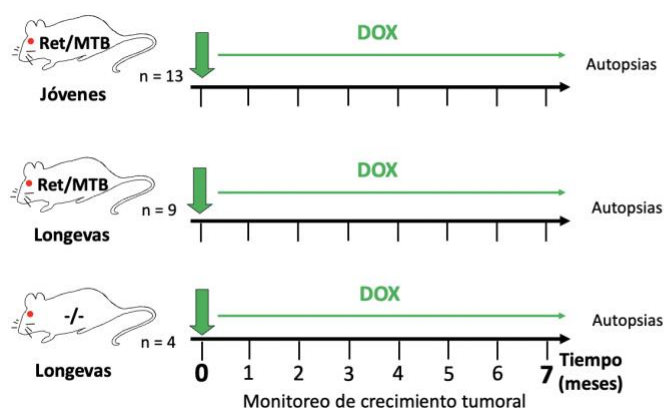


animales (1 vez por semana) para detectar la aparición de tumores y registrar el crecimiento tumoral. Una vez transcurridos los 7 meses, o una vez que el tamaño tumoral superase los 1500mm<sup>3</sup> de volumen aproximadamente, los animales fueron sacrificados. De todos los animales utilizados, se extrajeron tanto los tumores (si los hubiese) como las glándulas mamarias. Se almacenó y preparó el material para posterior análisis. Se verificó el correcto funcionamiento del sistema (**Figura R3 B**), esto es expresión del transgén, en los grupos de hembras experimentales por presencia de niveles elevados de la proteína RET en glándulas mamarias de hembras bitransgénicas Ret/MTB (R/M) (jóvenes y longevas) y la ausencia de ésta en el grupo control de hembras longevas no transgénicas (-/-).

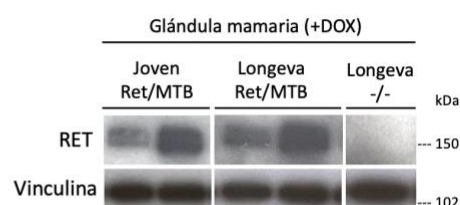
De acuerdo con lo esperado, el grupo control (-/-) no desarrolló tumores, mientras que detectamos generación de tumores en los grupos bitransgénicos Ret/MTB (**Figura R3 C**). No se observaron diferencias respecto de la latencia tumoral y tampoco de las pendientes de las curvas de crecimiento de tumores entre el grupo de ratones hembra Ret/MTB jóvenes y longevas.

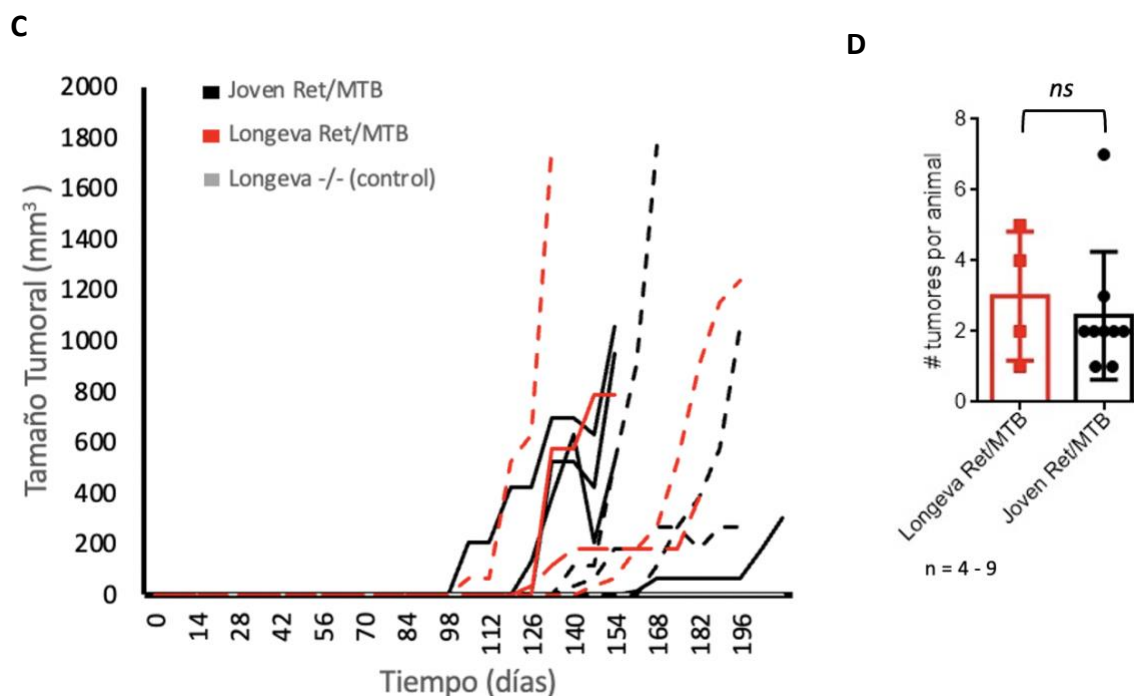
Es importante aclarar que, en la primera réplica del experimento, solo una hembra Ret/MTB longeva desarrolló tumor. Luego, se decidió repetir el experimento, aumentando el número de animales en cada grupo para obtener un análisis más robusto en ambos grupos. Los resultados que se presentan a continuación corresponden a la suma de los datos obtenidos en cada experimento.

**A**



**B**





**Figura R3. Experimento de inducción tumoral en hembras jóvenes y longevas en el sistema transgénico Ret/MTB: diseño experimental, curvas de crecimiento tumoral y frecuencia de tumores generados.** **A.** Diseño experimental: en 2 experimentos de inducción crónica de RET independientes, grupos de hembras transgénicas Ret/MTB jóvenes (2-4 meses de edad) (total n=13), grupos de hembras transgénicas Ret/MTB longevas (8-12 meses de edad) (total n=9) y un grupo de hembras longevas no transgénicas (8-12 meses de edad) (total n=4) fueron administradas con DOX y monitoreadas durante 7 meses. Al finalizar este período se procedió con las autopsias y la recolección de tejido para su posterior análisis. **B.** Control del funcionamiento del sistema transgénico: se muestra un ensayo representativo de WB realizado con lisados de muestras de glándulas mamarias provenientes de los ratones utilizados en el experimento en las condiciones indicadas. Mientras las hembras bitransgénicas (R/M) expresan el transgén, no se detecta RET en las no transgénicas (-/-). **C.** Curvas de crecimiento tumoral: se muestran los resultados obtenidos del crecimiento tumoral de los tumores generados en los 2 experimentos independientes: experimento 1 (línea continua) y experimento 2 (línea discontinua). **D.** Frecuencia tumoral: se muestra el gráfico de barras representando la multiplicidad de tumores por animal obtenida en los grupos de hembras jóvenes y longevas. Aclaración: en el grupo de longevas Ret/MTB, si bien hubieron 5 animales que desarrollaron tumor, solo se pudo evaluar el número de tumores por animal en 4 de ellos, dado que un animal se extravió en el transcurso del experimento. El análisis estadístico se realizó mediante prueba t de *Student*. ns: no significativo.

Durante las autopsias, se registró tanto la frecuencia tumoral por animal, representado por el número (#) promedio de tumores presentado por cada animal (**Figura R3 D**), así como también la incidencia tumoral de cada grupo, esto es la cantidad de animales que presentaron al menos un tumor respecto del total de animales utilizados en el experimento (**Tabla R1**). En

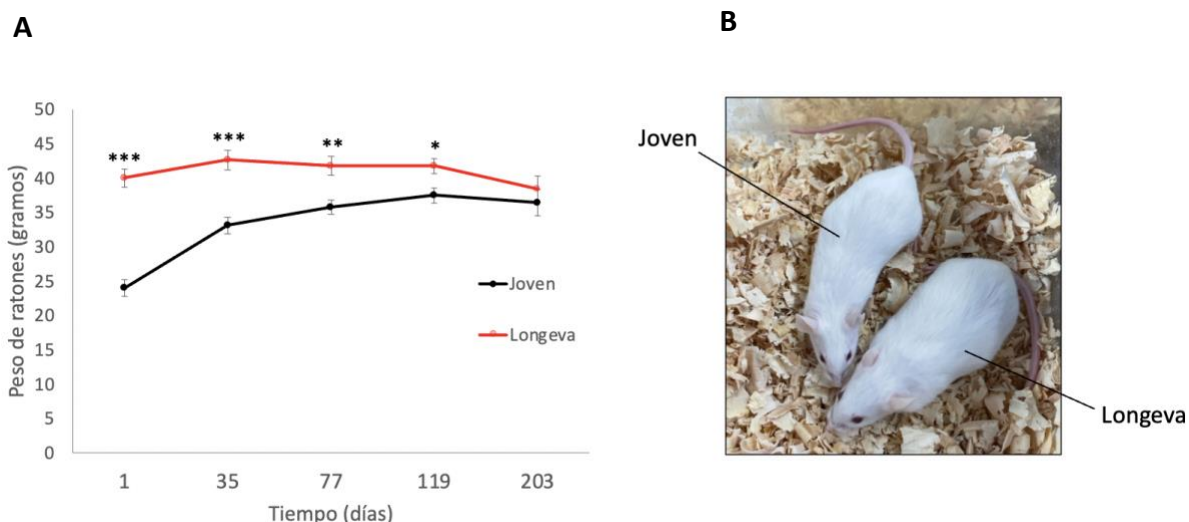


ambos casos, no se registraron diferencias significativas entre los grupos de hembras jóvenes y longevas transgénicas. Por otro lado, se observó una diferencia significativa en la incidencia tumoral al comparar jóvenes transgénicas con el grupo control de longevas no transgénicas.

	Joven	Longeva	Longeva
	Ret/MTB	Ret/MTB	-/-
	(n=13)	(n=9)	(n=4)
<b>Incidencia tumoral (# de animales con al menos un tumor/ # total de animales)</b>	9/13 (69,23%)	5/9 (55,55%)	0/4 (0%)
	<i>ns</i>		<i>ns</i>
	*		

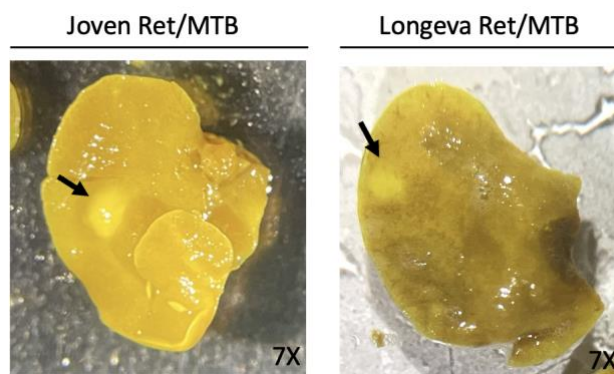
**Tabla R1. Resultados de incidencia tumoral.** Hembras transgénicas (Ret/MTB), o no-transgénicas (-/-), jóvenes (2-4 meses) y longevas (8-12 meses), se trataron con DOX durante 7 meses. Pasados los 7 meses, se autopsiaron todos los animales y se registró la incidencia tumoral de cada grupo. La estadística se evaluó mediante la prueba de Fisher. \*p-val<0,05. *ns*: no significativo.

A lo largo del experimento, mediante la utilización de una balanza, se registró el peso total corporal de los animales utilizados, transgénicos y no transgénicos. Al inicio del experimento, los ratones hembra longevos tienen un peso promedio que duplica al de las hembras jóvenes y es significativamente mayor (**Figura R4 A-B**). Durante la experimentación, mientras se observó un aumento paulatino significativo del peso corporal de las hembras jóvenes lo largo de los meses, el peso de las hembras longevas se mantuvo constante (**Figura R4 A**). Estos resultados sugieren que el aumento de peso registrado podría ser consecuencia del efecto del envejecimiento natural de los animales utilizados. Al cabo de los 7 meses, no se registraron diferencias significativas entre los grupos en el peso promedio. Si bien en este trabajo no exploramos las consecuencias de esta observación, sería interesante en un futuro evaluar la relación entre la obesidad y el desarrollo de tumores inducidos por RET.



**Figura R4. Registro de peso de ratones hembra longevas y jóvenes a lo largo del experimento de inducción en el sistema Ret/MTB.** A. Medidas del peso total promedio de ratones hembra jóvenes y longevas (transgénicas Ret/MTB o no transgénicas -/-) a lo largo del experimento. Los p-valores fueron calculados mediante prueba t de *Student*. \*\*\*p-val<0,001; \*\*p-val<0,01; \*p-val<0,05. B. Foto representativa de ratón hembra joven y longeva.

Dado que el pulmón es uno de los sitios principales blancos de metástasis en el cáncer de mama (*Jin et al., 2018; Medeiros & Allan, 2019*), los pulmones de cada uno de los animales fueron escindidos y conservados en solución de Bouin, la cual permite la sencilla visualización de focos metastásicos (blancos) sobre la superficie de los lóbulos pulmonares teñida en amarillo. Posteriormente, por observación bajo lupa se registró la presencia de focos metastásicos (**Figura R5 y Tabla R2**). El modelo de tumores Ret/MTB no ha sido reportado como metastásico (*Gattelli et al., 2018*) y, en esta instancia, no encontramos aumento de la incidencia metastásica con la longevidad de las hembras portadoras de tumores.



**Figura R5. Evaluación de focos metastásicos en el experimento de inducción en el sistema Ret/MTB.** Se muestran fotos representativas de focos metastásicos (flechas negras) sobre uno de los lóbulos de pulmón de animales bitransgénicos (Ret/MTB) hembras jóvenes y longevas. Luego de transcurridos los 7 meses de inducción con DOX y efectuadas las autopsias, el pulmón fue fijado con solución de Bouin (amarillo) y observado bajo lupa para la detección de potenciales focos metastásicos (puntos blancos).

	Joven Ret/MTB (n=9)	Longeva Ret/MTB (n=4)
<b>Incidencia de metástasis (# de animales con al menos un foco metastásico en pulmón/ # de animales con al menos un tumor)</b>	4/9 (44,44%)	1/4 (25%)
	<hr/> <i>ns</i>	

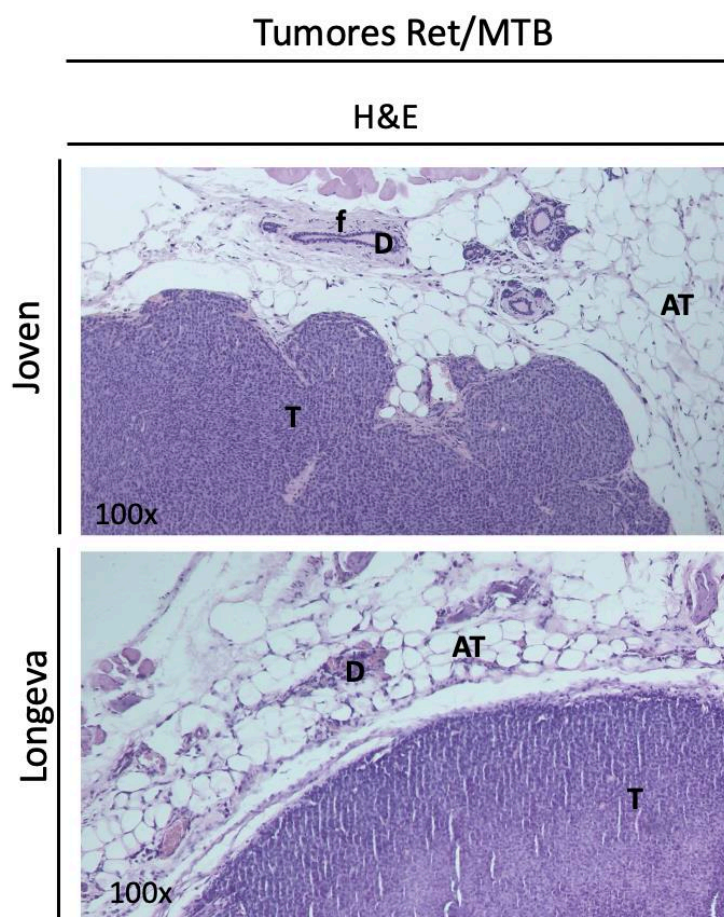
**Tabla R2. Resultados de incidencia de metástasis.** Hembras transgénicas (Ret/MTB), o no transgénicas (-/-), jóvenes (2-4 meses) y longevas (8-12 meses), se trataron con DOX durante 7 meses. Pasados los 7 meses, se autopsiaron todos los animales y se registró la presencia de metástasis en pulmón en cada grupo. La incidencia de metástasis se calculó como el número de animales con al menos un foco metastásico, sobre el número de animales con al menos un tumor. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Fisher. Aclaración: en el grupo de longevas Ret/MTB, si bien hubieron 5 animales que desarrollaron tumor, solo se pudo evaluar la incidencia de metástasis en 4 de ellos, dado que un animal se extravió en el transcurso del experimento. *ns*: no significativo.



### I. III. Análisis de las características de los tumores Ret/MTB generados en hembras jóvenes respecto de hembras longevas.

En esta sección presentaremos únicamente los resultados obtenidos en la primera réplica del experimento en el modelo transgénico Ret/MTB, sin incluir los de su repetición posterior. Debido a la larga duración que implica la realización de cada experimento (7 meses), las muestras de la segunda réplica experimental aún no han sido analizadas.

Primero, para observar las características morfológicas generales, se realizó una tinción de H&E sobre cortes de los tumores proveniente tanto de ratones hembra transgénicas jóvenes como longevas. Los tumores muestran una histopatología similar para ambos grupos: tumores sólidos, con regiones de fibrosis (f) mayormente en los conductos adyacentes o bien en los límites del tumor, y tejidos adiposo adyacente (AT) ligeramente modificado (**Figura R6**).



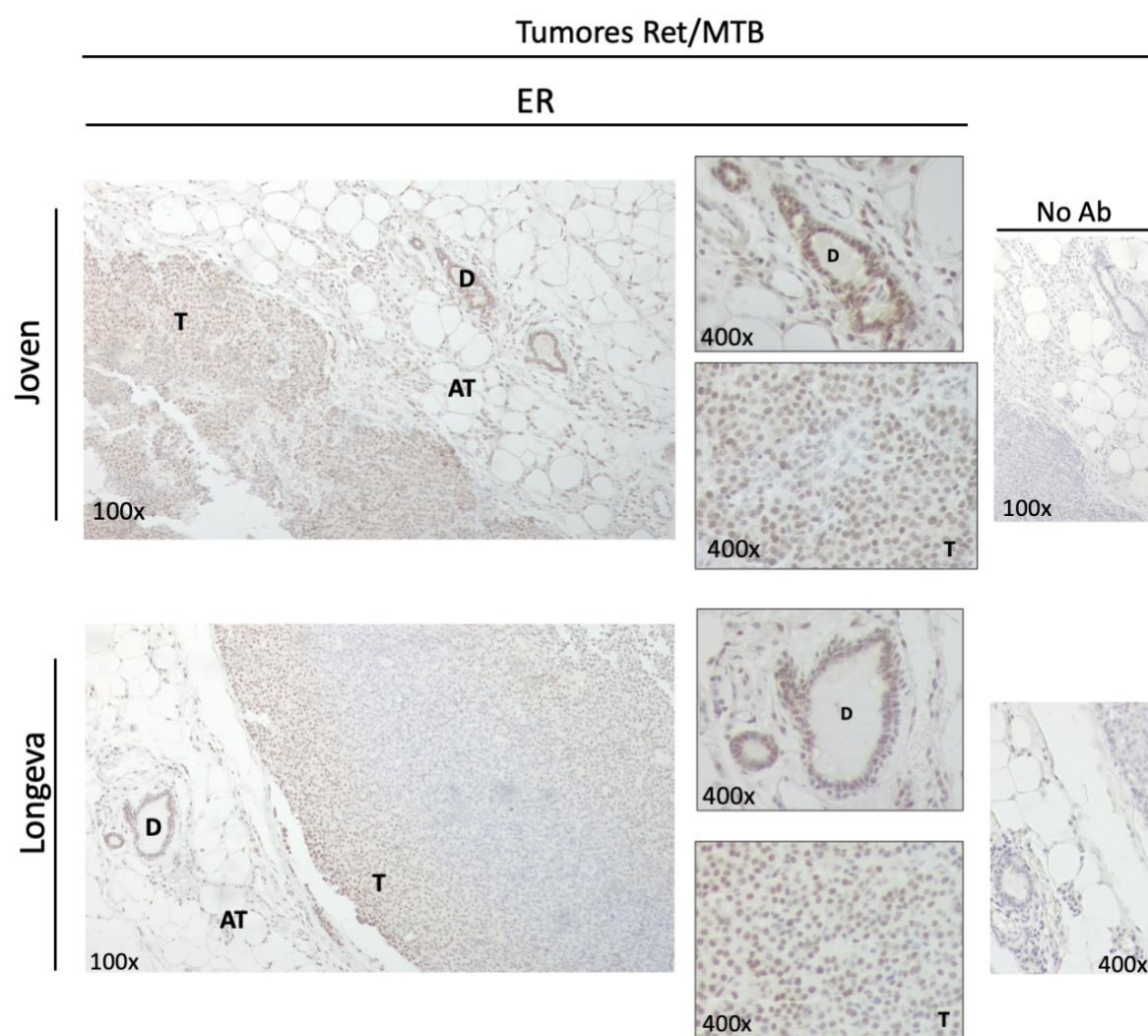
**Figura R6. Morfología de los tumores generados en el sistema Ret/MTB.** Se muestran fotos representativas de tinción de H&E sobre cortes histológicos de tumor mamario y tejido adyacente



proveniente de ratones hembra Ret/MTB jóvenes y longevas que fueron tratadas con DOX por 7 meses. T: Tumor, AT: *Adipose tissue*, D: conducto, f: fibrosis.

Luego, para estimar el subtipo de los tumores, se realizaron ensayos de IHC sobre cortes de los tumores de ambos grupos con anticuerpos específicos para evaluar la expresión de los receptores hormonales ER y PR (**Figura R7 A-B**). Como control positivo de la expresión de ambos receptores, se incluyeron regiones con presencia de conductos mamarios adyacentes al tumor, en dónde se observan núcleos positivos para ER y PR. Como control negativo y determinación de la tinción inespecífica del anticuerpo secundario (*background*), se realizó un ensayo en las mismas condiciones, pero sin anticuerpo primario (**Figura R7 A**).

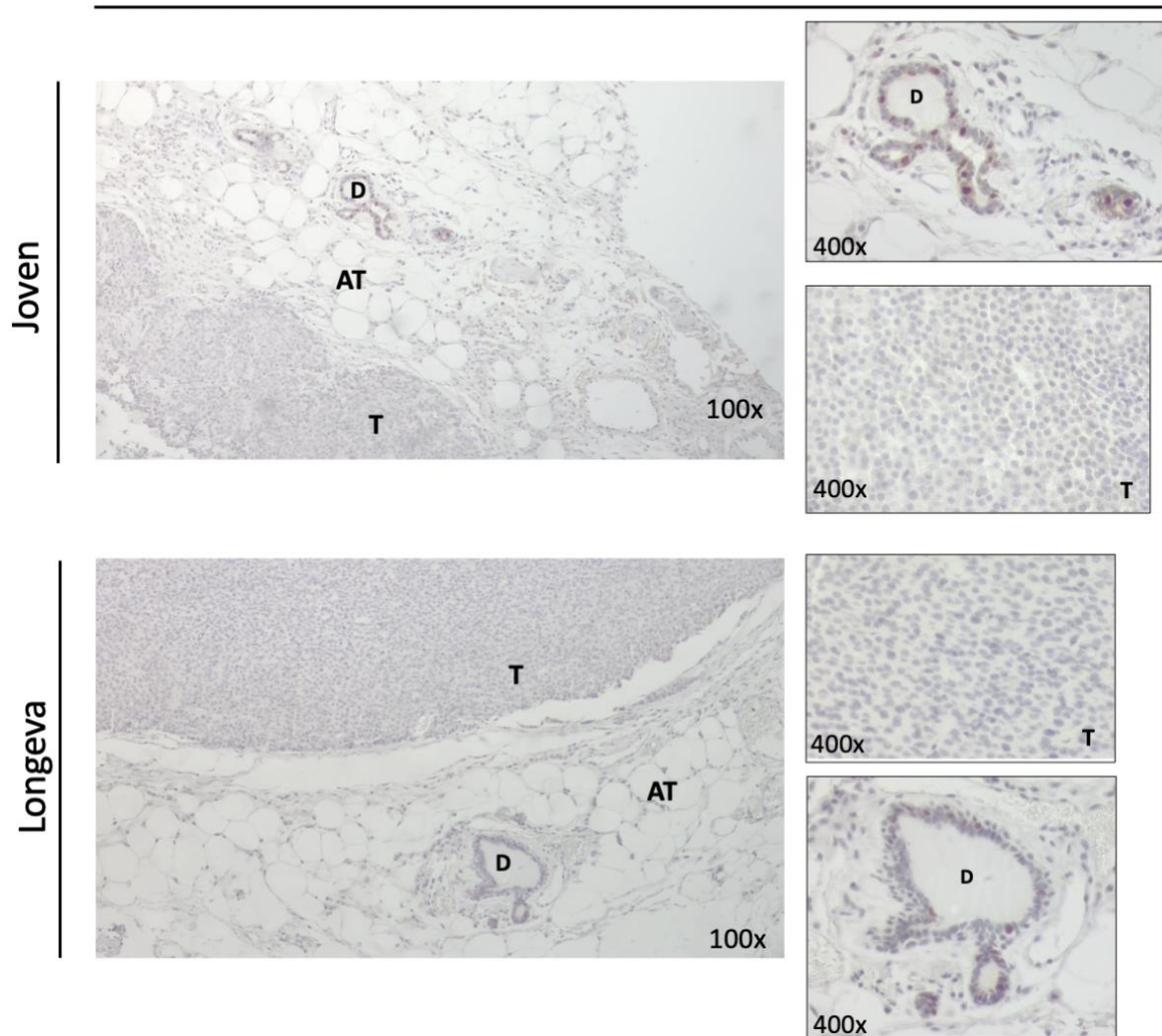
A



B

## Tumores Ret/MTB

PR



**Figura R7. Caracterización de subtipo tumoral mamario de los tumores generados en el sistema Ret/MTB. A-B.** Se muestran fotos representativas correspondientes a ensayos de IHC específicos para ER y PR sobre cortes histológicos de tumor mamario y tejido adyacente proveniente de ratones hembra Ret/MTB jóvenes y longevas que fueron tratadas con DOX por 7 meses. No Ab: sin anticuerpo primario (control), T: Tumor, AT: *Adipose tissue*, D: conducto, f: fibrosis.

Como se describió previamente, la inducción de la expresión de RET en el sistema de ratón bitransgénico Ret/MTB genera tumores luminales de tipo ER+PR- (*Gattelli et al., 2018*). A través de las inmunotinciones específicas, se comprobó que tanto las hembras jóvenes como longevas desarrollaron tumores del tipo luminal ER+PR-. La presencia de la tinción nuclear de

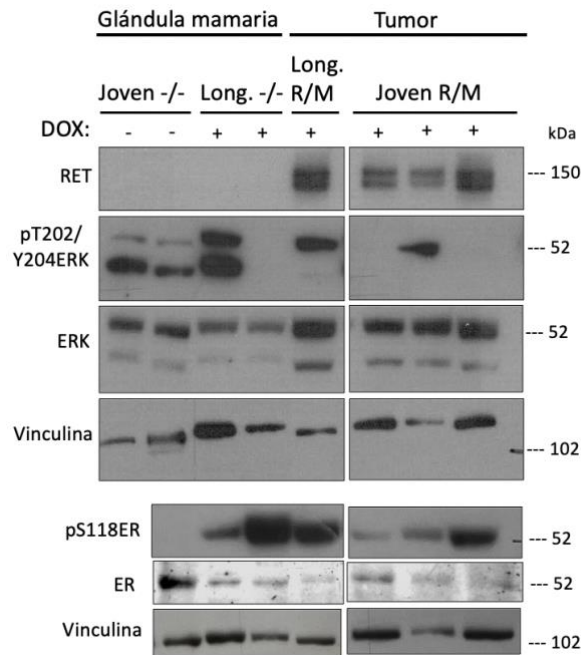


ER sugiere la potencial fosforilación de este receptor, pero pone en duda su actividad debido a la tinción negativa observada para PR.

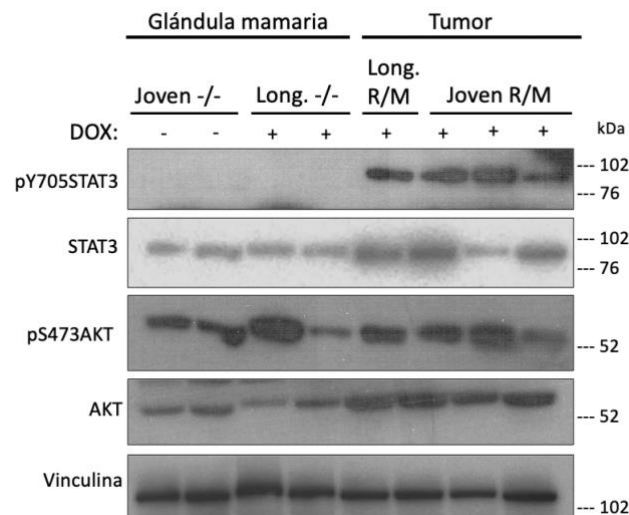
Para profundizar el análisis de las características de los tumores, se realizaron ensayos de WB sobre lisados de tejido tumoral provenientes de hembras jóvenes y longevas (**Figura R8**). En este ensayo, se analizó tanto la expresión de RET, para comprobar su sobre-expresión, así como también los niveles de efectores río abajo de su vía de señalización. Para ello, se utilizaron anticuerpos específicos para detectar las proteínas en sus formas fosforiladas y en sus formas totales. Como control de carga de los WB, se utilizó la detección de proteínas como tubulina o vinculina. Además, como control, se compararon los tumores con lisados de glándula mamaria proveniente de hembras longevas no transgénicas (-/-) también bajo tratamiento con DOX, y otras muestras provenientes de hembras jóvenes -/- sin tratar, es decir que no fueron tratadas con DOX.

En todos los tumores analizados se pudo corroborar la alta expresión del transgén RET (**Figura R8 A**), indicando el funcionamiento del sistema Ret/MTB. Además, en los tumores se observó una activación de STAT3, evidenciada por aumento en la fosforilación de la tirosina 705 (pY705STAT3), en comparación a las muestras de glándulas mamarias de los grupos control (**Figura R8 B**), consistente con la activación de RET. También se analizó la activación de la vía de ERK y de AKT en los sitios de fosforilación indicados. Se analizaron los niveles de fosforilación en S118 del ER (pS118ER) y la expresión de ER total (**Figura R8 A**). No se encontraron diferencias distinguibles sobre estos marcadores entre los distintos grupos de tumores analizados. De este modo, los tumores provenientes de hembras jóvenes y longevas presentaron características similares respecto a la expresión de las proteínas de señalización analizadas, lo que sugiere que no hay diferencias entre los tumores desarrollados por ambos grupos. Cabe destacar que, al momento del análisis, se incluyó una muestra de tumor de una única hembra longeva, siendo el único obtenido en la primera réplica del experimento. Con el objetivo de aumentar el número de muestras analizadas y permitir un análisis más completo de las características de los tumores en ambos grupos, en un futuro, se incorporarán las muestras de los tumores de las hembras longevas adicionales que surgieron en la segunda réplica del experimento.

**A**



**B**

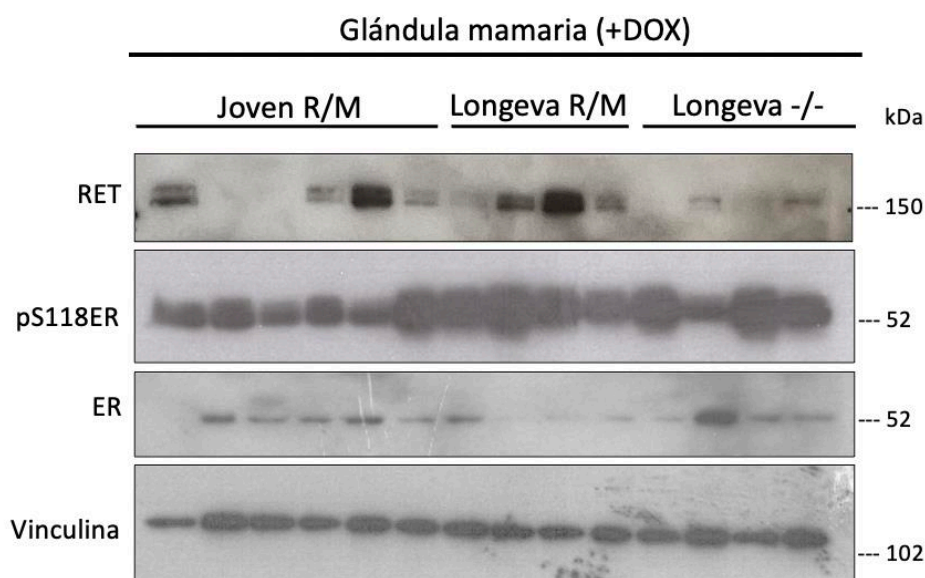


**Figura R8. Análisis de proteínas de señalización río debajo de RET en tumores generados en hembras jóvenes y longevas en el sistema Ret/MTB.** A-B. Lisados proteicos de muestras de tumores provenientes de hembras transgénicas (Ret/MTB) jóvenes (Joven) o longevas (Long.) tratadas con DOX durante 7 meses fueron analizados por WB. Como control, se analizaron lisados de glándulas mamarias provenientes de hembras longevas no transgénicas (-/-) también tratadas con DOX durante 7 meses (+), y hembras jóvenes -/- que no fueron tratadas con DOX (-). Se evaluaron los niveles de RET en todas las muestras, así como también los niveles de efectores río abajo de su vía de señalización (ER /STAT3 / ERK / AKT). Vinculina fue utilizada como control de carga. Se indican los pesos moleculares en kDa.



Por último, observamos que las muestras de tejido de glándulas mamarias longevas exhiben niveles altos de pS118ER comparables a los tumores (**Figura R8 A**). Debido a las observaciones respecto del ER, decidimos llevar a cabo un análisis adicional de WB sobre el tejido mamario murino.

Se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de las muestras de las glándulas mamarias provenientes de las hembras de cada uno de los grupos indicados. Se corroboró la presencia del transgén RET en los animales bitransgénicos Ret/MTB (**Figura R9**). Así, los animales transgénicos mostraron una alta expresión de RET en los lisados de glándula mamaria, en comparación a los animales no transgénicos. Estos resultados nos permiten corroborar el buen funcionamiento del sistema transgénico Ret/MTB utilizado, el cual indica una expresión de RET inducible por DOX en glándulas mamarias de los ratones transgénicos, tanto en hembras jóvenes como longevas.



**Figura R9. Análisis de la activación de ER en glándulas mamarias de hembras jóvenes y longevas en el sistema Ret/MTB.** Particularmente, se realizó el análisis de la activación de ER mediante ensayo de WB sobre lisados de glándulas mamarias provenientes de hembras vírgenes bitransgénicas (R/M), o no transgénicas (-/-), jóvenes y longevas, luego de su tratamiento por 7 meses con DOX (+). Vinculina fue usada como control de carga. Se indican los pesos moleculares en kDa.



Resultó llamativa la ausencia de RET en 2 muestras de tejido mamario proveniente de las hembras jóvenes transgénicas. Sin embargo, ya lo hemos observado en estudios previos. Debido a la heterogeneidad del tejido mamario, esta ausencia es probable que se deba a un bajo contenido de células epiteliales (células que expresan RET) en la muestra de tejido glandular analizado (tejido epitelial inmerso en abundante tejido estromal, mayormente adiposo). Por otro lado, observamos que las hembras longevas no transgénicas presentaron niveles bajos pero detectables de RET, sugiriendo, una cierta expresión de RET endógeno en estos tejidos. Este punto será evaluado con más profundidad en la siguiente sección de la tesis.

Al analizar el grado de fosforilación de la pS118ER en las glándulas mamarias de los 3 grupos experimentales (**Figura R9**), interesantemente, se observó que las hembras longevas (tanto transgénicas como no transgénicas) mostraron un mayor nivel de fosforilación del ER que las hembras jóvenes. Este resultado nos despertó especial interés, con lo que decidimos profundizar el análisis de tejido mamario en etapa de longevidad.



# Parte II

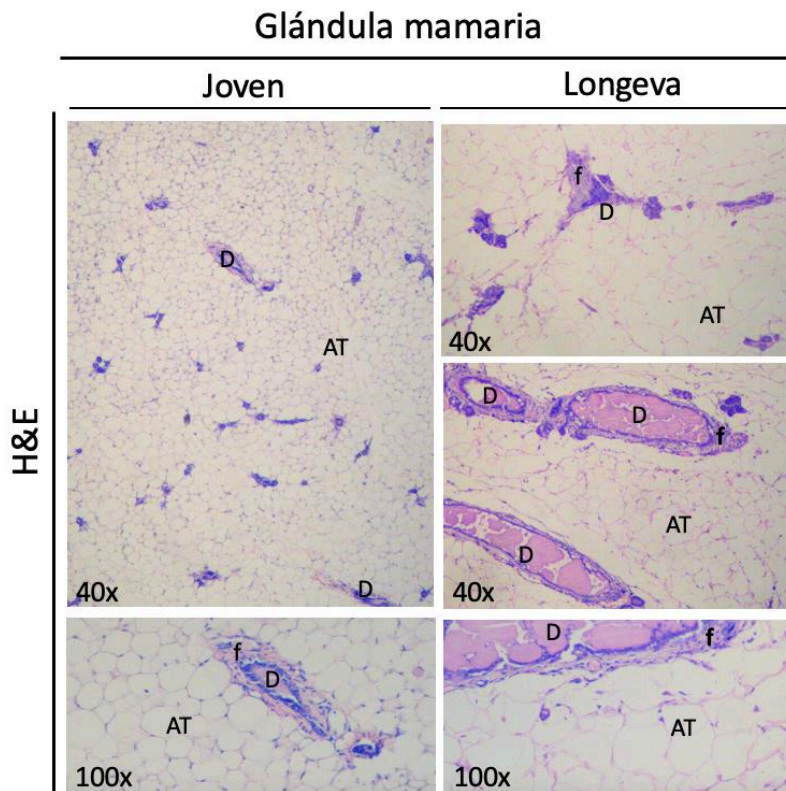
Estudio de las características del tejido  
mamario en longevidad:  
RET y sus vías de señalización.



Utilizando el sistema de ratón transgénico Ret/MTB, estudiamos las consecuencias de inducir la expresión del oncogén RET en la glándula mamaria de ratones hembra longevos en comparación con ratones hembra jóvenes. Hasta el momento del análisis, no hemos encontrado diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, el análisis del tejido mamario en longevidad arrojó ciertas características que abordaremos en esta segunda parte (Parte II).

## II. I. Cambios en la morfología de las glándulas mamarias en longevidad.

La glándula mamaria atraviesa múltiples cambios conforme avanza la edad del organismo. Contamos en el laboratorio con una colección previamente generada de tejido mamario de ratones hembra no transgénicos (WT) de la cepa FVB/N en distintos estadios del desarrollo. Con el fin de evaluar la morfología de las glándulas mamarias de hembras longevas (8-12 meses) en comparación con hembras jóvenes (2-4 meses), se analizaron cortes histológicos del tejido mamario. Dichos cortes fueron teñidos con de H&E y se los observó al microscopio óptico (**Figura R10**).



**Figura R10. Morfología de glándulas mamarias de hembras longevas y jóvenes FVB/N WT.** Se muestran imágenes representativas de cortes histológicos de tejido mamario proveniente de



hembras FVB/N no transgénicas teñidos con H&E. Vírgenes jóvenes (2-4 meses) y longevas (10-12 meses). D: conducto, f: fibrosis, AT: *adipose tissue*.

Se observó que las glándulas mamarias provenientes de las hembras longevas presentaban características distintivas comparadas a las provenientes de hembras jóvenes. Entre estas observaciones destacamos un agrandamiento de los ductos mamarios, fenómeno conocido como ectasia ductal, exhibiendo un alto contenido de fibrosis circundante a los mismos. Además, en el estroma, observamos un aumento en el tamaño de los adipocitos mamarios y/o pérdida de integridad de la membrana de estas células en las glándulas mamarias de las hembras longevas (**Figura R10**). La ectasia ductal, el aumento de la fibrosis y el incremento en el tamaño de los adipocitos son características comúnmente reportadas en la bibliografía asociadas al envejecimiento de la glándula mamaria en mujeres (*Iyengar et al., 2015; Haagensen, 1951*).

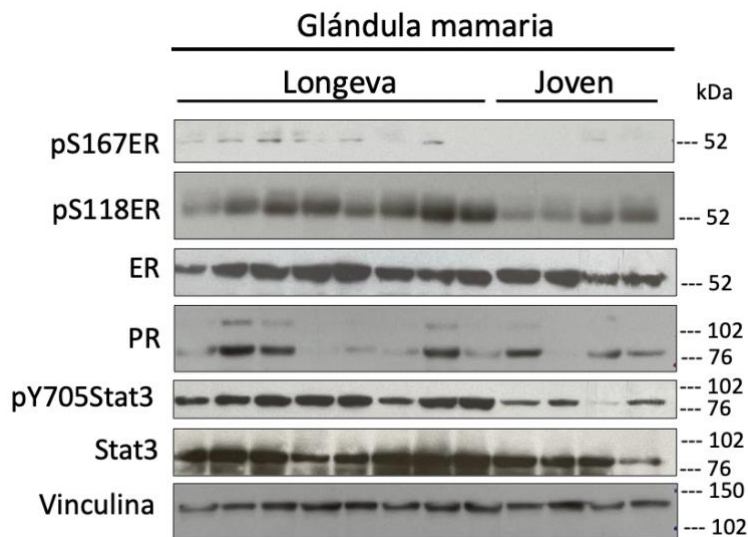
## **II. II. Cambios en los niveles de fosforilación del ER y otros efectores de la vía de señalización de RET en tejido mamario en longevidad.**

Debido a que niveles altos de pS118ER fueron detectados en las glándulas mamarias de hembras longevas transgénicas del sistema Ret/MTB (**Figura R9**), analizamos tejido glandular en mayor profundidad de hembras FVB/N no transgénicas. Para ello, se realizaron ensayos de WB con anticuerpos específicos para detectar la fosforilación de S118 y S167 del ER sobre lisado proteico de tejido mamario proveniente de hembras longevas (10-12 meses) y jóvenes (2-4 meses) (**Figura R11 A**). Mientras no se observaron diferencias claras en los niveles de expresión de las proteínas totales ER y PR, las glándulas mamarias longevas presentaron un aumento significativo en los niveles de fosforilación en S118 del ER, así como también incremento en los niveles de fosforilación de S167 del ER (**Figura R11 A-B**), como lo indican sus respectivas cuantificaciones, sugiriendo la activación de ER aún en animales con defectos en su ciclo estral.

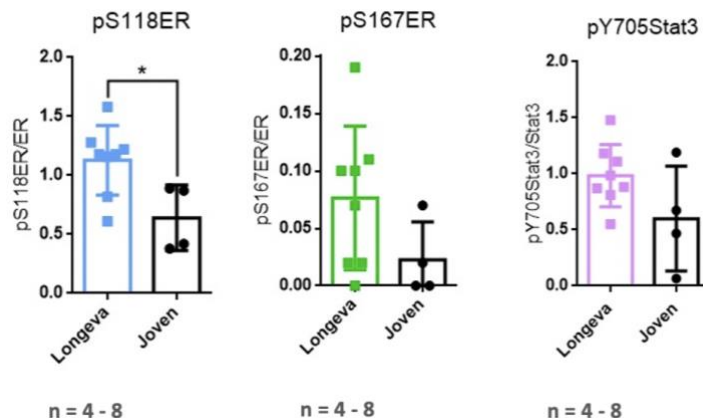
Como se describió previamente, la activación de RET lleva a la activación por fosforilación en sitios específicos de diversas proteínas río abajo, incluyendo ER y STAT3 (*Gattelli et al., 2018; Gattelli et al., 2013; Plaza-Menacho et al., 2011*). Se analizaron

adicionalmente los niveles de fosforilación de STAT3; los cuales mostraron un aumento en los tejidos longevos (**Figura R11, A-B**).

**A**



**B**

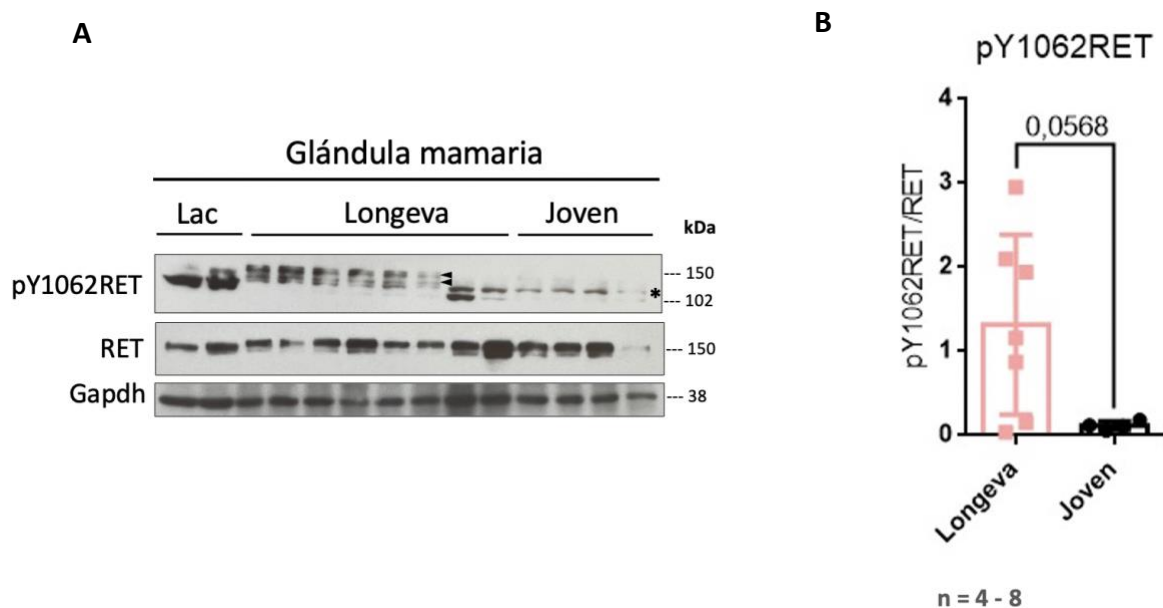


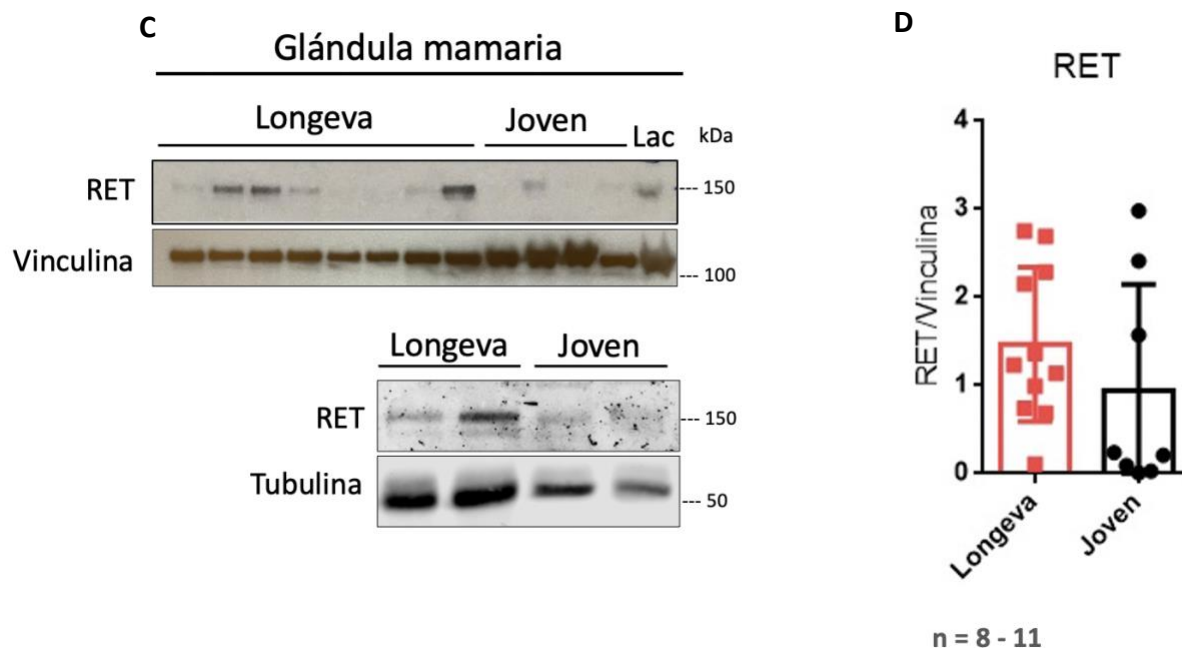
**Figura R11. Análisis de la activación de proteínas de señalización río abajo de RET en glándulas mamarias de hembras jóvenes y longevas FVB/N WT.** **A.** Se analizaron por WB las proteínas indicadas sobre lisados obtenidos de tejido mamario de hembras vírgenes FVB/N jóvenes (2-4 meses) y longevas (10-12 meses), utilizando anticuerpos específicos. Se evaluaron los niveles de pS167/pS118 ER y pY705 Stat3 como efectores río abajo de la activación de RET. Vinculina fue usada como control de carga. Se indican los pesos moleculares en kDa. **B.** Se muestra en gráficos de barra la cuantificación correspondiente a la expresión de pS118ER/ER, pS167ER/ER y pY705Stat3/Stat3 mediante *ImageJ*. Las diferencias se evaluaron estadísticamente mediante la prueba t de *Student*. \*p-val<0,05



Resultados previos de nuestro grupo demostraron que los niveles de expresión de RET endógeno de las glándulas mamarias de hembras vírgenes jóvenes suelen ser bajos, mientras que, por otro lado, las glándulas mamarias lactantes tienen niveles altos de este receptor y en su forma activa fosforilada (*Vallone et al., 2022*).

Interesantemente, al analizar la fosforilación del receptor RET respecto su proteína total, se observó una diferencia significativa entre ambos grupos estudiados. Las glándulas mamarias provenientes de hembras longevas presentan un aumento en la fosforilación de la isoforma completamente glicosilada de RET (reportada por la banda de aproximadamente 175 KDa; siendo la banda de aproximadamente 150 KDa la forma parcialmente glicosilada (*Richardson et al., 2012*)), en comparación a las glándulas mamarias de hembras jóvenes (**Figura R12 A-B**). Esta isoforma completamente glicosilada es la que se encuentra en la membrana de las células, y, por ende, su fosforilación indicaría que se encuentra en un estado de señalización activa. Por otro lado, el análisis de la expresión de RET endógeno en los tejidos mamarios de hembras vírgenes longevas reveló que algunas muestras presentaron un incremento en los niveles del receptor (**Figura R12 C-D**).





**Figura R12. Análisis de la expresión/activación de RET en glándulas mamarias de hembras jóvenes y longevas FVB/N WT.** A. Mediante ensayo de WB sobre lisados de glándulas mamarias provenientes de hembras vírgenes FVB/N jóvenes (2-4 meses) y longevas (10-12 meses) se evaluó la expresión de pY1062RET y RET endógeno utilizando anticuerpos específicos. En este caso Gapdh fue utilizada como control de carga y tejido proveniente de glándula mamaria lactante (Lac) fue usado como control positivo de la expresión de RET (*Vallone et al., 2022*). Las flechas negras señalan las isoformas completamente glicosiladas (aproximadamente 175kDa) y parcialmente glicosilada (aproximadamente 150kDa) (*Richarson et al., 2012*) y activas de RET, y el \* indica la banda inespecífica reportada (*Gattelli et al., 2013*). B. Los gráficos de barra muestran la cuantificación de la expresión de pY1062RET/RET. C. Se muestra la evaluación de la expresión de RET endógeno en las glándulas mamarias de hembras jóvenes y longevas mediante WB, tomando un mayor número de muestras. Se utilizó Vinculina o Tubulina como control de carga. D. Se muestra la cuantificación de la expresión de RET/Vinculina. Todas las cuantificaciones sobre los blots se realizaron mediante *ImageJ*. Se indican los pesos moleculares en kDa. Las diferencias fueron evaluadas estadísticamente mediante la prueba t de *Student*.

En resumen, los tejidos de glándulas mamarias de ratones hembra longevas presentaron un aumento significativo en los niveles de fosforilación ER, así como también un aumento de los niveles de fosforilación de STAT3, ambos efectores río debajo de RET, lo cual es consistente con el aumento de la actividad de RET observada en los tejidos mamarios longevos. Estos resultados, sugieren que las glándulas mamarias provenientes de hembras longevas presentan mayor activación de la vía de señalización de RET, abriendo así un nuevo campo de investigación.



Impacto de la longevidad del tejido  
de la glándula mamaria en las lesiones  
neoplásicas inducidas por el receptor RET  
M. Clara de los Santos

# Conclusiones y Discusión





La mayoría de los cánceres se manifiestan en personas mayores de 60 años. En consecuencia, a medida que la población global envejece, el cáncer se está convirtiendo en un problema relevante para la salud pública. Sin embargo, en las investigaciones se ha ignorado en gran medida la contribución del envejecimiento a las señales oncogénicas, y la mayoría de los estudios preclínicos se realizan en ratones adultos jóvenes, esto es ratones que tienen en general entre 2 a 4 meses de edad, en lugar de utilizar ratones mayores que reflejen una edad adecuada para modelar esta enfermedad. El laboratorio de investigación en dónde se realizó este trabajo de tesis estudia el cáncer de mama. La incidencia de cáncer de mama correlaciona positivamente con la edad de las mujeres que lo padecen, siendo más frecuente en postmenopausia, esto es en mujeres mayores de 50 años. Desde hace varios años, utilizando tanto cultivo celular como modelos preclínicos, nuestro grupo ha estudiado en particular la función del receptor RET como oncogén en células epiteliales mamarias. En esta tesis, exploramos el impacto del envejecimiento en tumores mamarios inducidos por RET.

El primer desafío en este trabajo fue establecer el grupo experimental de ratones hembra de edad avanzada que sea representativo de envejecimiento. Los cambios relacionados con la edad en la mama humana ocurren durante la perimenopausia (*Mori et al., 2018*). En este trabajo utilizamos ratones hembra de *background* genético FVB/N de entre 8 y 12 meses de edad, longevos en condiciones naturales, que corresponderían al estado de perimenopausia en la mujer (45-55 años) (*Diaz Brinton, 2012; Flurkey et al., 2007; Finch et al., 1984*). Este fue definido como el grupo longevo en contraposición con el grupo control de hembras jóvenes (de 2-4 meses de edad), el cual correspondería a la etapa de adultez temprana en el humano (20-30 años) (*Flurkey et al., 2007*). Igualmente, resulta importante destacar que el hecho de que los roedores longevos, aunque presenten disminución de los niveles de estrógenos circulantes, pueden continuar ovulando y ciclando, limita a los investigadores a la hora de modelar las condiciones peri y postmenopáusicas (*Finch et al., 1984; Nelson et al., 1982*). Una alternativa es utilizar la menopausia inducida por cirugía y tratamientos químicos en ratones. Por ejemplo, un procedimiento podría ser la remoción de los ovarios, ovariectomía (OVX) (*Finch et al., 1984*), que reduce rápidamente los niveles de 17 $\beta$ -estradiol (estrógenos) y detiene el ciclo sexual.





Si bien muchos estudios sobre envejecimiento se basan en inducir envejecimiento artificialmente (mediante OVX, por ejemplo), se ha postulado que este enfoque podría no reflejar lo que ocurre en un organismo envejecido de manera natural, ya que los factores secretados, por ejemplo, por las células senescentes, inducidas o naturales, varían considerablemente (*Fane and Weeraratna, 2020*). Una de las ventajas de nuestro modelo es que, aunque requiere más tiempo para recolectar animales de edad avanzada, el microambiente envejecido se desarrolla de forma natural, lo que podría representar más adecuadamente los cambios del proceso de envejecimiento.

Es relevante señalar que, en este trabajo, la disminución de los niveles circulantes de estrógenos no fue corroborada. Sin embargo, el análisis de la tipología de las células del epitelio vaginal permitió verificar el detenimiento o aletargamiento del ciclo estral en el grupo longevo (**Figura R2**). En estudios futuros sería necesario confirmar los niveles de estrógenos circulantes, pero también locales, ya que investigaciones han sugerido que, aunque los niveles circulantes disminuyen, el microambiente mamario envejecido podría presentar un aumento en la producción local de estrógenos dado por un aumento tisular de la enzima responsable de su biosíntesis denominada aromatasa (*Yiang et al., 2022; Iyengar et al., 2015*).

A lo largo de todo el trabajo de tesis se compararon los resultados entre los grupos de hembras FVB/N longevas y jóvenes (no transgénicas y transgénicas). En un futuro podría extrapolarse el estudio a otras cepas murinas, ya que existen algunas variaciones reportadas entre las cepas respecto del ciclo estral (*Mori et al., 2018*).

En el modelo transgénico Ret/MTB, la inducción del transgén RET en el tejido mamario fue similar entre los grupos de hembras longevas y jóvenes, validando nuestro modelo de estudio para este trabajo (**Figura R3 B**). Previo al comienzo de la inducción del sistema transgénico Ret/MTB se registró que las hembras longevas tenían un peso corporal promedio que duplicaba al de hembras jóvenes. A lo largo del tiempo experimental, el peso promedio de las hembras jóvenes aumentó hasta igualarse con el peso inicial de las hembras longevas (**Figura R4**). El análisis histopatológico posterior en cortes de glándulas mamarias teñidos con H&E reveló un aumento en tamaño (hipertrofia) de los adipocitos en el tejido adiposo mamario de hembras longevas (**Figura R10**). La obesidad es una condición en la cual hay una acumulación excesiva de tejido adiposo en diversos órganos que puede afectar negativamente



la salud (Purnell, 2023), y puede estar acompañada tanto de adipogénesis como de hipertrofia de los adipocitos blancos (Suárez-Carmona *et al.*, 2017). Además, esta se caracteriza por una inflamación crónica del tejido adiposo, lo que conduce a su disfunción. Los factores inflamatorios presentes en las mamas de mujeres obesas promueven la señalización local estrogénica, principalmente aumentando la expresión de aromatasa (Gerard and Brown, 2018). La obesidad se ha establecido como un factor de riesgo para el cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, especialmente para el subtipo luminal (Crespi *et al.*, 2016). Si bien excede los objetivos de estudio de este trabajo, sería interesante evaluar la relación entre la obesidad y el envejecimiento, en el contexto de la activación de RET; considerando que la señalización de RET en cáncer de mama implica el incremento de expresión de factores pro-inflamatorios como IL6 (Morandi and Isacke, 2014).

### **Los tumores generados por la sobre-expresión de RET en hembras longevas y hembras jóvenes en el sistema transgénico Ret/MTB muestran características similares.**

Si bien los tejidos envejecidos suelen ser más propensos al desarrollo de tumores (Turrell *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2022; Bahcecioglu *et al.*, 2021), nuestros resultados demostraron que la incidencia y frecuencia de tumores mamarios generados por expresión crónica de RET en el sistema Ret/MTB fue similar en las glándulas mamarias de hembras longevas en comparación con el grupo de hembras jóvenes (**Figura R3 D, Tabla R1**). Algunos trabajos, que utilizan otros modelos experimentales de cáncer de mama, demostraron que, si bien el crecimiento tumoral era independiente de la edad, las hembras longevas presentaban un aumento significativo en la incidencia de focos metastásicos en pulmón (Turrell *et al.*, 2023). Esta observación se contrapone con nuestros resultados, en donde no se encontraron variaciones respecto de la capacidad metastásica en pulmón entre los grupos de hembras longevas y jóvenes (**Figura R5, Tabla R2**). Más aun, las características histológicas y moleculares analizadas hasta el momento de los tumores de ambos grupos son similares (**Figuras R6-8**). Una posible explicación es que la presencia de niveles de fosforilación/activación de RET altos en los tejidos mamarios longevos, lo que implica un entorno de saturación respecto de la señalización mediada por RET (**Figura R12**), situación en la cual, la inducción de expresión adicional de RET por el sistema transgénico no resulta



sinérgica respecto de la tumorigénesis. Otra posibilidad es que los tejidos glandulares mamarios de nuestro grupo de hembras longevas no presenten las características pro-tumorigénicas del envejecimiento. Algunos estudios, por ejemplo, utilizan ratones mayores de 12 meses de edad (*Turrell et al., 2023; Yanai and Endo, 2021; Lessard-Beaudoin et al., 2015*).

En los últimos años, se ha avanzado considerablemente en la caracterización del microambiente envejecido como un entorno propicio para el desarrollo del cáncer. En particular, la glándula mamaria envejecida presenta un aumento en la rigidez de la matriz extracelular y en los niveles de factores pro-inflamatorios, lo que favorece la invasión y agresividad de las células cancerosas (*Jiang et al., 2022; Bahcecioglu et al., 2021*). Otra de las principales características del microambiente envejecido es la presencia de células senescentes. Sin embargo, se ha visto que el envejecimiento puede tener características tanto facilitadoras como también supresoras de tumores. Por un lado, la senescencia celular puede prevenir la proliferación de células cancerosas incipientes y reducir el riesgo de cáncer en organismos jóvenes, pero, por otro lado, las células senescentes también secretan moléculas que pueden estimular la proliferación de células pre-cancerosas (*Yang et al., 2021*). Así como se podrían medir factores inflamatorios y cuantificar la fibrosis glandular, la proporción diferencial de células senescentes en los tejidos mamarios provenientes de hembras longevas y vírgenes de nuestros grupos experimentales y controles debe ser determinada por ensayos específicos (*Rojas-Vázquez et al., 2024; Martinez, M., 2009*). La determinación de este balance entre las características facilitadoras y supresoras del cáncer en el envejecimiento podría explicar, en parte, por qué en nuestro modelo no se observó un aumento significativo en el desarrollo tumoral en hembras longevas comparado con jóvenes.

Por otra parte, se ha establecido que la activación de oncogenes específicos, que inicialmente promueven señales de proliferación, culmina en la senescencia celular y un estado de detención proliferativa, un fenómeno denominado senescencia inducida por oncogenes (OIS). En diversos modelos de cáncer, la evidencia sugiere que la OIS puede ser eludida cuando la activación oncogénica se mantiene, lo que finalmente conduce a mayor proliferación celular. En un sistema de ratón transgénico similar al nuestro pero específico de cáncer de tiroides, se ha demostrado que RET puede producir OIS (*Bellelli et al., 2018*). Para determinar si las lesiones neoplásicas tempranas inducidas por RET pueden eludir la senescencia inducida OIS



y avanzar hacia la formación de tumores, podrían realizarse experimentos de inducción del sistema Ret/MTB durante períodos más cortos (1-2 meses); en dónde seguidamente se evaluarían marcadores de senescencia en ambos grupos, hembras longevas *versus* jóvenes.

Todos los tumores inducidos por la expresión de RET del modelo Ret/MTB, ya sea en hembras longevas o jóvenes, expresan el transgén y mostraron fosforilación/activación de algunos de los efectores descritos río abajo de la activación de RET (**Figura R8**); esto es, altos niveles de pY705STAT3/STAT3 y pS118ER/ER; aunque estos últimos se detectaron también altos en el tejido glandular no tumoral de hembras longevas (**Figura R9**), observación que se discutirá más adelante. Si bien nuestro análisis molecular preliminar (sólo se analizó el primer experimento de los dos llevados a cabo) parecería indicar que no existen diferencias en cuanto a la expresión de proteínas de los tumores provenientes de hembras jóvenes y longevas, se completará el análisis de las muestras de la segunda réplica experimental. Además, creemos que varias características interesantes restan por explorar: por ejemplo, marcadores de agresividad como la pluripotencialidad (*stemness*) y/o marcadores de transición epitelio mesenquimal (EMT) (*Nairuz et al., 2023; Kalluri et al., 2009; Jaenisch et al., 2008*), o bien marcadores de proliferación (como marcación de Ki-67 y/o pS10H3) (*Elmaci et al., 2018; Dowsett et al., 2011; Hans and Dimitrov, 2001*), se medirán para completar el análisis.

Respecto del subtipo tumoral, tanto los tumores generados en hembras transgénicas jóvenes como longevas resultaron ER+ y negativos para PR (**Figura R7-8**). En estudios previos de nuestro grupo se reportó que los tumores inducidos por la expresión crónica de RET representan al subgrupo luminal de tumores ER+PR- y se comprobó que éstos son resistentes a terapia endócrina, no son susceptibles a la OVX ni responden a agentes terapéuticos endócrinos (*Gattelli et al., 2018*). Además, estudios de otros grupos indican un mayor porcentaje de tumores positivos para RET en pacientes con cáncer de mama que no respondieron a terapia endocrina (*Plaza-Menacho I et al., 2010*). Nuestros hallazgos sugieren que RET induce tumores endócrino resistentes en tejido mamario, sin importar la edad del hospedador. Contando con la experiencia del grupo en la generación de líneas tumorales *in vivo* (*Gattelli et al., 2018; Gattelli et al., 2013*), en dónde los tumores primarios (en nuestro caso los provenientes de hembras longevas *versus* jóvenes) pueden ser pasados y mantenidos en grupos



de hembras hospedadoras, podría evaluarse la potencial diferencia en la progresión tumoral y la respuesta a tratamientos de interés (agentes como tamoxifeno y/o inhibidores de RET).

**Elevados niveles de fosforilación de ER se encuentran presentes tanto en tumores mamarios Ret/MTB como en tejido glandular mamario longevo, lo cual correlaciona con mayores niveles de expresión/activación de RET.**

Como observamos en la primera parte y demostramos en la segunda parte de este trabajo, existe un aumento en los niveles de fosforilación del ER (pS167ER/ER y/o pS118ER/ER) en las glándulas mamarias de hembras longevas en comparación a hembras jóvenes (**Figuras R9 y R11**). En parte, esto podría explicarse por el potencial aumento local de producción de estrógenos consecuente de la inflamación del tejido adiposo envejecido (fenotípicamente de tipo obeso) (*Jiang et al., 2022; Iyengar et al., 2015*). Para corroborar esto último, no sólo habría que evaluar los niveles de expresión de la enzima aromatasa en las glándulas mamarias longevas en comparación a las jóvenes, sino también los factores inflamatorios locales, como las citoquinas IL6 y/o IL $\beta$ 1, ambos factores inflamatorios río abajo de la activación de RET (*Gattelli et al., 2013; Plaza-Menacho et al., 2011*).

La fosforilación en S118 del ER es activadora, e induce la transcripción de distintos genes blancos del ER (*Dutertre and Smith, 2003; Leo and Chen, 2000*), como por ejemplo PR. Resulta interesante destacar que, mientras que en la glándula mamaria longeva encontramos expresión pS118ER y expresión de PR (**Figuras R9 y R11**), en los tumores que también se expresan niveles altos del pS118ER (**Figura R8**) hay ausencia de PR (**Figura R7**). La ausencia de PR en los tumores inducidos por RET podría indicar que, en el tejido tumoral, existen otros factores (como por ejemplo, alguna mutación en ER o cierta combinación de co-factores de transcripción presentes en la célula tumoral) que interfieren con actividad canónica de ER, mientras que el ER sería activo transcripcionalmente en el tejido mamario longevo.

Interesantemente, al analizar los niveles de fosforilación del receptor RET, se observó una diferencia cercana a la significancia entre ambos grupos, indicando niveles más altos de fosforilación de RET (pY1062RET) en las glándulas mamarias longevas en comparación a las jóvenes (**Figura R12**). La fosforilación de RET es indicativa de su activación (*Mulligan et al., 2014*), por lo que este resultado sugiere un aumento en la actividad de sus vías de señalización



rió abajo en tejido mamario envejecido. En concordancia con el aumento en los niveles de fosforilación de RET en los tejidos longevos, se observó que estos también muestran un aumento en los niveles de pS118ER, pS167ER y pY705STAT3 (**Figura R9 y R11**).

La fosforilación del receptor RET es causada por la activación de sus dominios quinasa intracelulares, luego de la unión de los ligandos y sus co-receptores al dominio extracelular del receptor o bien por autofosforilación independiente de ligando (*Morandi et al., 2011*). Nuestro grupo ha reportado que varios ligandos y co-receptores se expresan a lo largo del desarrollo de la glándula mamaria murina (*Vallone et al., 2022*), con lo cual especulamos que los mismos estarían presentes en la glándula longeva. Realizando un análisis en datos publicados y de uso libre, pudimos corroborar que existe una mayor expresión del ligando NRTN y su co-receptor GFR $\alpha$ 2 en muestras de glándulas mamarias de hembras longevas, en comparación a hembras jóvenes, particularmente proveniente de células alveolares y mioepiteliales (*Li et al., 2020*); con lo cual, proponemos en un futuro analizar la expresión de los ligandos en nuestro sistema.

Morfológicamente, la tinción con H&E sobre cortes de glándulas mamarias de hembras longevas reveló que estas presentan conductos agrandados, un fenómeno denominado ectasia ductal (**Figura R10**). Estos cambios morfológicos han sido observados como asociados a la edad en la glándula mamaria humana (*Rahal et al., 2005; Haagensen, 1951*). Interesantemente, la ectasia ductal ha sido observada en las hiperplasias inducidas por RET en el sistema Ret/MTB (*Vallone et al, DMM, 2022*), con lo cual, podría atribuirse a un cambio inducido por la expresión/activación de RET en el epitelio mamario. Teniendo en cuenta que las glándulas mamarias longevas presentan mayor activación de RET endógeno (**Figura R11-12**), esto podría en parte explicar la ectasia ductal observada (**Figura R10**). En un futuro, nos proponemos repetir este análisis en un mayor número de hembras, dado que los niveles de RET total endógeno parecen variar en gran medida (**Figura R12 C-D**), lo que atribuimos a la heterogeneidad respecto de la edad de las hembras y quizás del momento del ciclo estral, el cual no fue corroborado al momento de las autopsias.

Tanto RET como el ER activan vías de señalización relacionadas con un aumento en la proliferación y diferenciación celular. Por ende, especulamos que el aumento observado en la activación de ambos receptores mencionados en las glándulas mamarias longevas podría indicar una mayor predisposición al desarrollo de cáncer. Si bien está demostrada una



correlación positiva de RET con tumores ER+, hasta el día de hoy, no existen estudios específicos respecto de la expresión de RET y su correlación con la edad de las pacientes. Utilizando datos disponibles de secuenciación masiva (como *RNA-seq*) de biopsias de tejido tumoral y mamario de mamoplastías, planeamos realizar un análisis bioinformático en esta dirección.

Por último, los resultados y observaciones de este estudio plantean nuevos interrogantes. La actividad de RET y su efector ER en las glándulas mamarias envejecidas, su potencial interacción y la relación con una mayor predisposición al cáncer de mama en longevidad podrá abordarse en investigaciones futuras.





Impacto de la longevidad del tejido  
de la glándula mamaria en las lesiones  
neoplásicas inducidas por el receptor RET  
M. Clara de los Santos

# Bibliografía



Anbalagan, M. & Rowan, B. G. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 418 Pt 3, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.016>

Arpino, G. *et al.* (2005). Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(17), 1254–1261. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji249>

Bahcecioglu, G. *et al.* (2021). Aged Breast Extracellular Matrix Drives Mammary Epithelial Cells to an Invasive and Cancer-Like Phenotype. *Advanced science* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 8(22), e2100128. <https://doi.org/10.1002/advs.202100128>

Bellelli, R. *et al.* (2018). Oncogene-induced senescence and its evasion in a mouse model of thyroid neoplasia. *Molecular and cellular endocrinology*, 460, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.023>

Bianco, S., & Gévry, N. (2012). Endocrine resistance in breast cancer: from cellular signaling pathways to epigenetic mechanisms. *Transcription*, 3(4), 165–170. <https://doi.org/10.4161/trns.20496>

Blakely, C. M. *et al.* (2005) 'Developmental stage determines the effects of MYC in the mammary epithelium.', *Development* (Cambridge, England), 132(5), pp. 1147–1160. doi: 10.1242/dev.01655.

Borrello, M. G. *et al.* (2005). Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14825–14830. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503039102>

Boulay, A. *et al.* (2008). The Ret receptor tyrosine kinase pathway functionally interacts with the ERalpha pathway in breast cancer. *Cancer research*, 68(10), 3743–3751. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5100>

Campisi J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*, 75, 685–705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>

Cardiff, R. D., & Wellings, S. R. (1999). The comparative pathology of human and mouse mammary glands. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 4(1), 105–122. <https://doi.org/10.1023/a:1018712905244>

Cardiff, R. D. *et al.* (2018). Mammary Gland. *Comparative Anatomy and Histology*, 487–509. doi:10.1016/b978-0-12-802900-8.00023-3

Chen, M. *et al.* (2013). Phosphorylation of estrogen receptor  $\alpha$  at serine 118 is correlated with breast cancer resistance to tamoxifen. *Oncology letters*, 6(1), 118–124. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1324>

Collado, M. *et al.* (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 130(2), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>



Crespi, E. *et al.* (2016). Role of inflammation in obesity-related breast cancer. *Current opinion in pharmacology*, 31, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.11.004>

De Groot, J. W. *et al.* (2006). RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocrine reviews*, 27(5), 535–560. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0017>

Diaz Brinton R. (2012). Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*, 153(8), 3571–3578. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1340>

Dong, Q. *et al.* (2016). Aging is associated with an expansion of CD49fhi mammary stem cells that show a decline in function and increased transformation potential. *Aging*, 8(11), 2754–2776. <https://doi.org/10.18632/aging.101082>

Dowsett M. *et al.* (2011) Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 103(22):1656– 1664. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr393>

Drilon, A. *et al.* (2018). Targeting RET-driven cancers: lessons from evolving preclinical and clinical landscapes. *Nature reviews. Clinical oncology*, 15(3), 151–167. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.175>

Dutertre, M., & Smith, C. L. (2003). Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 17(7), 1296–1314. <https://doi.org/10.1210/me.2001-0316>

Ellmann, S. *et al.* (2009). Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(15), 2405–2426. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0017-3>

Elmaci, İ. *et al.* (2018). Phosphorylated Histone H3 (PHH3) as a Novel Cell Proliferation Marker and Prognosticator for Meningeal Tumors: A Short Review. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, 26(9), 627–631. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000499>

Esseghir, S. *et al.* (2007) ‘A role for glial cell-derived neurotrophic factor-induced expression by inflammatory cytokines and RET/GFRa1 receptor up-regulation in breast cancer’, *Cancer Research*, 67(24), pp. 11732–11741. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2343.

Fane, M., & Weeraratna, A. T. (2020). How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nature reviews. Cancer*, 20(2), 89–106. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0222-9>

Fielder, G. C. *et al.* (2018). The GDNF Family: A Role in Cancer?. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 20(1), 99–117. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.10.010>



Finch, C. E. *et al.* (1984). Ovarian and steroidal influences on neuroendocrine aging processes in female rodents. *Endocr. Rev.* 5, 467–497. doi: 10.1210/edrv-5-4-467

Flurkey, K. *et al.* (2007). *The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models* Second Edition, Vol- ume 3 (Elsevier).

Gattelli, A. *et al.* (2018). Chronic expression of wild-type Ret receptor in the mammary gland induces luminal tumors that are sensitive to Ret inhibition. *Oncogene*, 37(29), 4046–4054. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0235-y>

Gattelli, A. *et al.* (2020). Ret Receptor Has Distinct Alterations and Functions in Breast Cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 25(1), 13–26. <https://doi.org/10.1007/s10911-020-09445-4>

Gattelli, A. *et al.* (2013). Ret inhibition decreases growth and metastatic potential of estrogen receptor positive breast cancer cells. *EMBO molecular medicine*, 5(9), 1335–1350. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302625>

Gérard, C., & Brown, K. A. (2018). Obesity and breast cancer - Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology*, 466, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.014>

González-Gualda, E. *et al.* (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS journal*, 288(1), 56–80. <https://doi.org/10.1111/febs.15570>

Gorgoulis, V. *et al.* (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>

Gourdy, P. *et al.* (2018). Estrogen receptor subcellular localization and cardiometabolism. *Molecular metabolism*, 15, 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.009>

Grieco, M. *et al.* (1990). PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*, 60(4), 557–563. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90659-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90659-3)

Gunther, E. J. *et al.* (2002). A novel doxycycline-inducible system for the transgenic analysis of mammary gland biology. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(3), 283–292. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0551com>

Haagensen C. D. (1951). Mammary-duct ectasia; a disease that may simulate carcinoma. *Cancer*, 4(4), 749–761. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195107\)4:4<749::aid-cnrcr2820040413>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195107)4:4<749::aid-cnrcr2820040413>3.0.co;2-f)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hans, F., & Dimitrov, S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, 20(24), 3021–3027. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204326>



- Havas, A., Yin, S., & Adams, P. D. (2022). The role of aging in cancer. *Molecular oncology*, 16(18), 3213–3219. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13302>
- Hayflick, L. (1965). The Limited In Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research*, 37, 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25, 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hennighausen, L., & Robinson, G. W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(9), 715–725. <https://doi.org/10.1038/nrm1714>
- Hughes, K. and Watson, C. J. (2012) ‘The spectrum of STAT functions in mammary gland development’, *Jak-Stat*, 1(3), pp. 151–158. doi: 10.4161/jkst.19691.
- Hwang, E. S. *et al.* (2004). Regulation of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT1-dependent genes by RET/PTC (rearranged in transformation/papillary thyroid carcinoma) oncogenic tyrosine kinases. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 18(11), 2672–2684. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0168>
- Ibáñez C. F. (2013). Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(2), a009134. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009134>
- Idda, M. L. *et al.* (2020). Survey of senescent cell markers with age in human tissues. *Aging*, 12(5), 4052–4066. <https://doi.org/10.18632/aging.102903>
- Iyengar, N. M. *et al.* (2015). Obesity and cancer: local and systemic mechanisms. *Annual review of medicine*, 66, 297–309. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050913-022228>
- Iyengar NM. *et al.* (2015) Menopause is a determinant of breast adipose inflammation. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015 May;8(5):349-58. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0243. PMID: 25720743; PMCID: PMC4417434.
- Jaenisch, R., & Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132(4), 567–582. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.015>
- Jiang, X. *et al.* (2022). Recent Advances in the Aging Microenvironment of Breast Cancer. *Cancers*, 14(20), 4990. <https://doi.org/10.3390/cancers14204990>
- Jin, L. *et al.* (2018). Breast cancer lung metastasis: Molecular biology and therapeutic implications. *Cancer biology & therapy*, 19(10), 858–868. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1456599>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kan, Z. *et al.* (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 466(7308), 869–873. <https://doi.org/10.1038/nature09208>



Kang, J. *et al.* (2009) 'Artemin is oncogenic for human mammary carcinoma cells', *Oncogene*, 28(19), pp. 2034–2045. doi: 10.1038/onc.2009.66.

Kang, J. *et al.* (2010) 'Artemin is estrogen regulated and mediates antiestrogen resistance in mammary carcinoma', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 29(22), pp. 3228–3240. doi: 10.1038/onc.2010.71.

Kariagina, A. *et al.* (2008). Progesterone receptor isoform functions in normal breast development and breast cancer. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 18(1), 11–33. <https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v18.i1.20>

Kastner, P. *et al.* (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal*, 9(5), 1603–1614. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08280.x>

Khan, Y. S. *et al.* (2023). Anatomy, Thorax, Mammary Gland. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Kim, Y. R. *et al.* (2008). Modulatory role of phospholipase D in the activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 by thyroid oncogenic kinase RET/PTC. *BMC cancer*, 8, 144. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-144>

Kohn, T. *et al.* (2012). KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature medicine*, 18(3), 375–377. <https://doi.org/10.1038/nm.2644>

Kok, M. *et al.* (2009). Estrogen receptor-alpha phosphorylation at serine-118 and tamoxifen response in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(24), 1725–1729. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp412>

Le Rolle, A. F. *et al.* (2016). Oncogenic KRAS activates an embryonic stem cell-like program in human colon cancer initiation. *Oncotarget*, 7(3), 2159–2174. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6818>

Lei, J. T. *et al.* (2019). Endocrine therapy resistance: new insights. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 48 Suppl 1(Suppl 1), S26–S30. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(19\)31118-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(19)31118-X)

Leo, C., & Chen, J. D. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene*, 245(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00024-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00024-x)

Lessard-Beaudoin, M. *et al.* (2015). Characterization of age-associated changes in peripheral organ and brain region weights in C57BL/6 mice. *Experimental gerontology*, 63, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.01.003>

Li, C. M. *et al.* (2020). Aging-Associated Alterations in Mammary Epithelia and Stroma Revealed by Single-Cell RNA Sequencing. *Cell reports*, 33(13), 108566. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108566>





Li, Z. *et al.* (2023). The EstroGene Database Reveals Diverse Temporal, Context-Dependent, and Bidirectional Estrogen Receptor Regulomes in Breast Cancer. *Cancer research*, 83(16), 2656–2674. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-0539>

Li, Z. *et al.* (2022). The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug design, development and therapy*, 16, 305–314. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S336643>

Lin, C. Y. *et al.* (2007). Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS genetics*, 3(6), e87. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030087>

Liu, Y. *et al.* (2022). Low estrogen level in aged mice leads to abnormal oogenesis affecting the quality of surrounded nucleolus-type immature oocytes. *Reproduction, fertility, and development*, 34(15), 991–1001. <https://doi.org/10.1071/RD22120>

López-Otín, C. *et al.* (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

Martínez, Mauricio. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, ISSN 1909-8758, Vol. 11, N°. 2, 2009, pags. 152-166. 11.

McGuire, A. *et al.* (2015). Effects of age on the detection and management of breast cancer. *Cancers*, 7(2), 908–929. <https://doi.org/10.3390/cancers7020815>

McLean, A. C. *et al.* (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (67), e4389. <https://doi.org/10.3791/4389>

Medeiros, B., & Allan, A. L. (2019). Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis to the Lung: Clinical and Experimental Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2272. <https://doi.org/10.3390/ijms20092272>

Missmer, S. A. *et al.* (2004). Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(24), 1856–1865. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh336>

Moody, S. E. *et al.* (2002) ‘Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis’, *Cancer Cell*, 2(6), pp. 451–461. doi: 10.1016/S1535-6108(02)00212-X.

Morandi, A., and Isacke, C. M. (2014). Targeting RET-interleukin-6 crosstalk to impair metastatic dissemination in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 16(1), 301. <https://doi.org/10.1186/bcr3608>

Morandi, A. *et al.* (2013). GDNF-RET signaling in ER-positive breast cancers is a key determinant of response and resistance to aromatase inhibitors. *Cancer research*, 73(12), 3783–3795. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4265>





Morandi, A. *et al.* (2011). RET in breast cancer: functional and therapeutic implications. Trends in molecular medicine, 17(3), 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.12.007>

Mori, H. *et al.* (2018). Aging Mouse Models Reveal Complex Tumor-Microenvironment Interactions in Cancer Progression. Frontiers in cell and developmental biology, 6, 35. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00035>

Mulligan L. M. (2014). RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. Nature reviews. Cancer, 14(3), 173–186. <https://doi.org/10.1038/nrc3680>

Nairuz, T. *et al.* (2023). Cancer stem cells: an insight into the development of metastatic tumors and therapy resistance. Stem cell reviews and reports, 19(6), 1577–1595. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10529-x>

Nelson, J. F. *et al.* (1982). A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. Biology of reproduction, 27(2), 327–339. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.2.327>

Parikh, N. *et al.* (2018). Enhanced inflammation and attenuated tumor suppressor pathways are associated with oncogene-induced lung tumors in aged mice. Aging cell, 17(1), e12691. <https://doi.org/10.1111/accel.12691>

Percie du Sert, N. *et al.* (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. PLoS biology vol. 18,7 e3000410. doi:10.1371/journal.pbio.3000410

Plaza-Menacho, I. *et al.* (2011) Focal adhesion kinase (FAK) binds RET kinase via its FERM domain, priming a direct and reciprocal RET-FAK transactivation mechanism. J Biol Chem ;286(19):17292–302.

Plaza-Menacho, I. *et al.* (2010). Targeting the receptor tyrosine kinase RET sensitizes breast cancer cells to tamoxifen treatment and reveals a role for RET in endocrine resistance. Oncogene, 29(33), 4648–4657. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.209>

Rahal, R. M. *et al.* (2005). Risk factors for duct ectasia. The breast journal, 11(4), 262–265. <https://doi.org/10.1111/j.1075-122X.2005.21684.x>

Richardson, D. S. *et al.* (2012). Alternative splicing results in RET isoforms with distinct trafficking properties. Molecular biology of the cell, 23(19), 3838–3850. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-02-0114>

Rojas-Vázquez, S. *et al.* (2024). A renal clearable fluorogenic probe for in vivo  $\beta$ -galactosidase activity detection during aging and senolysis. Nature communications, 15(1), 775. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44903-1>

Saavedra-Peña, R. D. M. *et al.* (2023). Estradiol cycling drives female obesogenic adipocyte hyperplasia. Cell reports, 42(4), 112390. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112390>



- Schmitt, C. A. *et al.* (2022). Senescence and cancer - role and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Clinical oncology*, 19(10), 619–636. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00668-4>
- Serrano, M., & Blasco, M. A. (2007). Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 715–722. <https://doi.org/10.1038/nrm2242>
- Siegel, R. *et al.* (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(1), 9–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21208>
- Siersbæk, R. *et al.* (2018). Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor  $\alpha$  function in breast cancer. *Genes & development*, 32(17-18), 1141–1154. <https://doi.org/10.1101/gad.316646.118>
- Silberstein, G. B., & Daniel, C. W. (1987). Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor-beta. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4812), 291–293. <https://doi.org/10.1126/science.3474783>
- Sørli, T. (2007). Molecular classification of breast tumors: toward improved diagnostics and treatments. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 360, 91–114. <https://doi.org/10.1385/1-59745-165-7:91>
- Sorlie, T. *et al.* (2003) 'Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), pp. 8418–8423. doi: 10.1073/pnas.0932692100.
- Stransky, N. *et al.* (2014). The landscape of kinase fusions in cancer. *Nature communications*, 5, 4846. <https://doi.org/10.1038/ncomms5846>
- Turrell, F. K. *et al.* (2023). Age-associated microenvironmental changes highlight the role of PDGF-C in ER+ breast cancer metastatic relapse. *Nature cancer*, 4(4), 468–484. <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00525-y>
- Vallone, S. A. *et al.* (2022). Aberrant RET expression affects normal mammary gland post-lactation transition, enhancing cancer potential. *Disease models & mechanisms*, 15(3), dmm049286. <https://doi.org/10.1242/dmm.049286>
- Varešlija, D. *et al.* (2019). Transcriptome Characterization of Matched Primary Breast and Brain Metastatic Tumors to Detect Novel Actionable Targets. *Journal of the National Cancer Institute*, 111(4), 388–398. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy110>
- Wagner, K. D., & Wagner, N. (2022). The Senescence Markers p16INK4A, p14ARF/p19ARF, and p21 in Organ Development and Homeostasis. *Cells*, 11(12), 1966. <https://doi.org/10.3390/cells11121966>
- Yamashita, H. *et al.* (2005). Phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 7(5), R753–R764. <https://doi.org/10.1186/bcr1285>



Yanai, S., & Endo, S. (2021). Functional Aging in Male C57BL/6J Mice Across the Life-Span: A Systematic Behavioral Analysis of Motor, Emotional, and Memory Function to Define an Aging Phenotype. *Frontiers in aging neuroscience*, 13, 697621. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.697621>

Yang, J. *et al.* (2021). The Paradoxical Role of Cellular Senescence in Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 722205. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.722205>

Yaşar, P. *et al.* (2016). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive medicine and biology*, 16(1), 4–20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>