



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

# **Receptores $\beta$ -adrenérgicos y su señalización en morfogénesis mamaria y progresión tumoral**

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

**Lucía Gargiulo**

Director de tesis: Dra. Ariana Bruzzone

Consejero de Estudios: Dr. Martín Monte

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)

Buenos Aires, 2018

## **Receptores $\beta$ -adrenérgicos y su señalización en morfogénesis mamaria y progresión tumoral**

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -RA) median la respuesta al estrés a través de su unión a las catecolaminas endógenas. Se ha descrito a los  $\beta$ -RA como reguladores de numerosos procesos asociados a la progresión tumoral.

En el presente trabajo de Tesis se demostró que no solo la activación sino también los niveles de expresión de los  $\beta_2$ -RA determinan el comportamiento benigno de las células mamarias, lo cual explica el comportamiento diferencial entre las células tumorales y no tumorales ante la catecolamina endógena, epinefrina. Se demostró que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica regula el desarrollo normal de la glándula mamaria, conduciendo a un fenotipo diferenciado. Se estudiaron mecanismos dependientes del receptor de estradiol e independientes del mismo, y se describieron posibles mediadores moleculares. Además, el efecto diferenciante observado en la glándula mamaria normal resultó ser trasladable a modelos tumorales.

Se demostró que el antagonista propranolol se comporta como agonista, regulando procesos celulares como los de adhesión y proliferación. Se profundizó en las vías de señalización que regulan la adhesión celular inducida por el isoproterenol (agonista) y el propranolol (antagonista).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan nuevas perspectivas en el estudio del estrés y el cáncer de mama. Comprender cómo los  $\beta$ -RA inciden sobre el desarrollo de la glándula mamaria es prometedor y relevante en la investigación del cáncer.

Palabras claves: receptores beta-adrenérgicos, isoproterenol, cáncer de mama, desarrollo mamario, receptor de estrógenos, propranolol, epinefrina.

## **$\beta$ -adrenergic receptors in mammary branching morphogenesis and tumor progression**

$\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) are targets of endogenous catecholamines and mediate the stress response. Over the past few decades,  $\beta$ -AR have gained great importance in the context of cancer biology.

In the present work, we demonstrated that the expression levels of  $\beta_2$ -AR not only determine a benign phenotype but are also responsible for the differential behavior observed between tumor and non-tumorigenic breast cell lines. We also demonstrated that  $\beta$ -adrenergic stimulation regulates normal mammary gland development, leading to a terminal stage phenotype. Estrogen receptor (ER)-dependent and independent mechanisms were studied and the potential molecular mediators were described. Interestingly, the differentiating effect observed in the mammary gland can be translated to tumor models.

We confirmed that the antagonist propranolol behaves as a agonist, regulating cellular processes, such as adhesion and proliferation. We focused on the signaling pathway triggered by both isoproterenol (agonist) and propranolol (antagonist).

Our results contribute to new perspectives in the study of stress and breast cancer. Understanding how  $\beta$ -ARs influence normal mammary gland development is crucial to elucidating their role in breast cancer.

Keywords: beta-adrenergic receptors, isoproterenol, breast cancer, mammary gland development, estrogen receptors, propranolol, epinephrine

Parte de los resultados de esta tesis dieron origen a las siguientes publicaciones:

**A novel effect for  $\beta$ -adrenergic receptor in mammary branching morphogenesis and its possible implications in breast cancer.** Gargiulo L, May M, Rivero EM, Copsel S, Lamb C, Lydon J, Davio C, Lanari C, Lüthy IA, Bruzzone A. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 22 (1): 43-57, 2017. (ISSN: 1573-7039)

**$\beta_2$ -adrenergic receptor regulates proliferation, adhesion and migration of tumor and non tumor breast cell lines.** Gargiulo L, Copsel S, Rivero E, Galés C, Senard J-M Lüthy, IA, Davio C, Bruzzone A. *Oncotarget* 5 (20): 10058-69, 2014. (ISSN: 1949-2553)

Asimismo, durante el desarrollo del trabajo que dio lugar a esta tesis se han publicado los siguientes manuscritos con resultados no incluidos en la misma:

**The  $\beta_2$ -adrenergic agonist salbutamol inhibits migration, invasion and metastasis of the human breast cancer MDA-MB-231 cell line.** Rivero EM\*, Pérez Piñero C\*, Gargiulo L, Entschladen F, Zänker F, Bruzzone A, Lüthy IA. *Current Cancer Drug Targets*, 17 (8): 756-766, 2017. (pISSN: 1568-0096)

**Synthesis and biological evaluation of salpichrolide analogs as antiestrogenic agents.** Sonego JM, Rivero EM, Gargiulo L, Lüthy IA, Alvarez LD, Veleiro AS, Burton G. *European Journal of Medicinal Chemistry* 82: 233-241, 2014. (pISSN: 0223-5234).

Los resultados de esta tesis fueron presentados en 6 Congresos Nacionales y 1 Congreso internacional, en el cual se recibió el premio *Scholar-in-Training* de la American Association for Cancer Research.

## Agradecimientos

A Ari, por absolutamente todo. Pero casi que lo académico podría quedar de lado. Sos mi buda personal. No puedo estar más agradecida de haberte encontrado. Siempre te digo que sos la mejor jefa que me podría haber tocado! Porque solo vos me devolvés la tesis con comentarios como "jaja sos una punga"... "la maestra de cuarto grado de chicho te diría esfuérzate más"... Porque podemos llorar de la risa sólo haciendo cuentas a ver quién lo logra, pensando mil teorías y chateando por Gmail. Porque estás siempre, en todo, atenta, paciente... cuidándome y ayudándome a crecer pero no solo en lo académico, sino en lo personal y por eso te adoro y te voy a estar agradecida eternamente!

A Isa por su generosidad incondicional. Por dejarnos hacer todo lo que se nos ocurre y por ponerse contenta con cada resultado, al igual que con el primer western que hice. Por mimarnos y estar siempre atenta a nosotros. Porque si estás mal se le caen las lágrimas con vos, por tener un corazón enorme y querer lo mejor para nosotros siempre!

Al We Make Tetas!! A eme, por esos audios que tengo en favoritos y no quiero perder nunca jaja. Por todo lo que intentás enseñarnos aunque veamos agujeritos rosas, por todo el tiempo que le dedicaste a este proyecto! Por tus mil ideas y ese empuje contagioso que es lo mejor! Gracias Eme porque esta tesis es parte tuya también! Ah, y gracias por contarnos tus sueños que no tienen desperdicio!

A Eze, porque a pesar de nuestro historial de amor/odio (por el que fuiste declarado culpable y yo inocente) nunca dejamos de ayudarnos y estar juntos. Porque aunque me digas que Mara es tu compañera ideal, sé que el posdoc fue solo para seguir compartiendo el escritorio conmigo. No hubiese sido igual sin vos (ahora sí, llorá si podes).

A Leo por ser mi raro favorito aún en las etapas de agotamiento. Por compartir todo conmigo hasta las locuras más impensadas (que por las dudas no las contamos, a ver si al otro se le pegan). Te adoro aunque sepa que en una emergencia no pueda llamarte! A Meli por ser única, sos mi otra buda personal. Por acompañarme cada día y compartir tu sabiduría conmigo. Sos la persona más generosa, agradecida y detallista que conozco... Gracias por ser un ejemplo a seguir, te adoro!

A Ani, por tu compañía cuando más la necesitaba, por tus mimos de siempre y tu locura absoluta... por poner en riesgo tu vida donando sangre solo por mi jaja.

A Marti, por tus ganas de siempre, por compartir tus recetas, por entender mi delay en responder (hasta la hora) de estos meses y sobre todo por querernos a pesar de que te tocó nuestro peor momento jaja.

A Cami por ser tan buena, generosa y amorosa con todos nosotros día a día, siempre con una sonrisa. A Fran, por ser mi stalker personal y llevarme a comprar comida siempre. A Deivid, por no habernos matado a todos jaja y por tus ganas de cambiar el mundo para todos nosotros. A Majin por no dejarme ser la más rara del pasillo en la escala Leo y compartir el primer puesto conmigo. A Mari por estar siempre atenta a como estamos y aconsejarnos. A Mai, Mari y Lu por su compañía de todos los días. A Judith por las anécdotas de autoexigencia con las que me siento identificada en el almuerzo. A Sabri, por haber cambiado ese celular y ser mi compa de doctorado, de cultivo y de matrigel! A Pauli, por subirnos la autoestima en el pasillo mutuamente.

A los jefes, Lucre y JC, y a Ale. A JC por su cariño constante y sus chistes infaltables. A Lucre por sus clases de cultura general del mediodía. A Ale por sus pilas de siempre, sus frases inolvidables y por contratar becarios raros que podamos disfrutar.

A Claudia, Caro y Ani por sus consejos y generosidad. A todos los Lanari, por la ayuda, la buena onda y los préstamos constantes. A Tomy, que todavía se lo extraña.

A Mariano, por su ayuda en el mundo de las GTPasas y los numerosos préstamos.

A Davio y Sabri, por toda la ayuda, la buena predisposición y las ideas.

A Aldu por compartir conmigo desde Aldana Banana hasta el día de hoy... e ir juntas a la par.

A Caca y Agus por las sesiones de autoayuda y por estar siempre, no sé qué hubiese hecho sin uds estos últimos años. Gracias por hacer más divertidos mis días rompiendo vasos! A Mai por su hermosa personalidad, porque aunque el futuro te alejó de nosotras, seguís siempre atenta con una palabra dulce para tus hijas de grupo, extrañarte es poco! A Vale por acompañarme a todos los cursos y olvidarte lo aprendido al segundo al igual que yo. Simplemente gracias a todas por crecer conmigo... Las amo!

A Santi, por tu paciencia y compañía. Por entender hasta lo que no entendés, no juzgarlo y ayudarme. Por ser reflexivo... Por decir, al igual que yo, "respeto tu opinión" cada 5 minutos. Por sentarte en la cama y levantarte al segundo al grito de "Ay, qué hice mal?". Gracias por haber sido parte de Titi y de mí todo este último tiempo que tanto lo necesitamos.

A mis abus, por los genes, el amor al tute y al salamin. A Chuky, la bebé de la familia, y a mi ratita Vale por ser mis primas más lindas.

A Titi, por ser mi todo, a mamá porque es amor totaaal y a papá por aprenderse de memoria "receptores adrenérgicos" e intentar entender cada noche en la cena que hice en el día y que es un western. Por ayudarnos en todo siempre! Gracias por darme hasta lo imposible, por haber hecho que llegara hasta acá. Los amo hoy y siempre, son parte de mí.

*"Hasta el infinito... y si el infinito se termina  
ida y vuelta infinitas veces"*

*A mamá, papá y Jime*

# Índice

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA .....	13
CÁNCER DE MAMA .....	17
FACTORES DE RIESGO .....	20
ESTRÉS Y CÁNCER .....	22
RECEPTORES ADRENÉRGICOS .....	23
<i>Típos de receptores.....</i>	<i>23</i>
<i>Farmacología de los GPCRs .....</i>	<i>25</i>
<i>Receptores adrenérgicos en mama normal y tumoral .....</i>	<i>26</i>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO.....	35
SILENCIAMIENTO Y SOBREENPRESIÓN DE RECEPTORES .....	35
ENSAYO DE <i>BINDING</i> EN CÉLULAS TRANSFECTADAS .....	36
MEDICIÓN DE AMPc.....	36
PROLIFERACIÓN CELULAR .....	37
ADHESIÓN .....	38
MIGRACIÓN .....	38
INMUNOCITOQUÍMICA .....	39
ESTUDIO DE SUSTRATOS ( <i>COATING</i> ) .....	39
CULTIVO TRIDIMENSIONAL Y MARCACIÓN .....	40
WESTERN BLOT.....	40
SEPARACIÓN DE ACTINA FIBRILAR Y GLOBULAR.....	41
ANIMALES Y TRATAMIENTOS.....	42
<i>WHOLE MOUNT</i> DE GLÁNDULA MAMARIA .....	43



INMUNOHISTOQUÍMICA.....	44
FUNCIONALIDAD DE LAS GLÁNDULAS MAMARIAS - ESTUDIO DE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS .....	44
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	45
DROGAS Y REACTIVOS .....	45
ESTADÍSTICA.....	46
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
CAPÍTULO I .....	48
ROL DE LOS B-RA EN MODELOS NO TUMORALES Y TUMORALES DE MAMA .....	48
<i>Rol de los <math>\beta</math>-RA sobre proliferación, adhesión y migración de células no tumorales y tumorales de mama humana</i> .....	49
Modulación de la expresión del $\beta_2$ -RA y su efecto en células no tumorales y tumorales de mama humana .....	49
<i>Efecto de la activación <math>\beta</math>-adrenérgica en mama no tumoral</i> .....	55
Modelo <i>in vitro</i> - Cultivo celular en 3D .....	55
Modelo <i>in vivo</i> - Glándula mamaria murina .....	58
Mecanismo de acción .....	64
Estudio <i>in silico</i> de la expresión génica de los $\beta$ -RA en la glándula mamaria .....	74
<i>Efecto de la activación <math>\beta</math>-adrenérgica en modelos tumorales de mama</i> .....	74
Modelo <i>in vitro</i> - Cultivo celular en 3D .....	74
Modelo <i>in vivo</i> - Tumores murinos .....	77
Estudio <i>in silico</i> . Comparación de la expresión génica de los $\beta$ -RA en glándula mamaria y tumores murinos .....	79
CAPÍTULO II .....	81
MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN B-ADRENÉRGICA EN CÉLULAS NO TUMORALES .....	81
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>94</b>
CAPÍTULO I .....	95
CAPÍTULO II .....	112
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>122</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>124</b>

## Abreviaturas

AC: adenilil ciclasa

AMPC: adenosina monofosfato-3',5' cíclico

$\alpha_2$ -RA: receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos

BA: brotes alveolares

$\beta$ -RA: receptores  $\beta$ -adrenérgicos

$\beta_2$ -RA: receptores  $\beta$ -adrenérgicos del subtipo  $\beta_2$

BSA: seroalbúmina bovina

CREB: proteína de unión a elemento de respuesta del AMPC

DB: dibutilil adenosina-3',5'-monofosfato

DMEM/F12: medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Ham-F12 (1:1)

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EPAC: proteína intercambiadora activada por AMPC

Epi: epinefrina o adrenalina

ER: receptor de estrógenos

ER $\alpha$ : receptor de estrógenos  $\alpha$

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

FK: forskolina

FULV: fulvestrant

GPCR: receptores acoplados a proteína G

H&E: hematoxilina y eosina

HPA: eje hipotalámico-hipofisiario

ICI: ICI-118,551, antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico

IHQ: inmunohistoquímica

Iso: isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico)

KO: *knock-out*

MIX: 3-Isobutil-metil-xantina (inhibidor de fosfodiesterasas)

NE: norepinefrina

PBS: buffer fosfato salino

PFA: paraformaldehído

PKA: proteína quinasa A

PR: receptor de progesterona

PRKO: ratones *knock-out* para el PR

PROP: propranolol

RA: receptores adrenérgicos

RU: mifepristona o RU486

SALB: salbutamol

SFB: suero fetal bovino

SNS: sistema nervioso simpático

TBS: buffer tris salino

TEB: brote terminal

TDLU: unidad lóbulo-ductal terminal

TELA: telapristona

3D: tridimensional

8Br: 8 bromoadenosina-3',5'-monofosfato

Páginas 12 a 46 eliminadas a pedido del autor.

# Resultados

# Capítulo I

## **Rol de los $\beta$ -RA en modelos no tumorales y tumorales de mama**

### **Rol de los $\beta$ -RA sobre proliferación, adhesión y migración de células no tumorales y tumorales de mama humana**

Resultados previos del laboratorio demuestran que existe una respuesta diferencial ante la epinefrina (Epi) entre las células mamarias no tumorales y tumorales. La Epi provoca un comportamiento benigno en las líneas no tumorales mientras que induce un fenotipo maligno en las tumorales. En relación a esto, se encontró mayor expresión del  $\beta$ -RA en los modelos normales con respecto a los tumorales. Estos resultados fueron determinantes para el estudio de los  $\beta$ -RA y su mecanismo de señalización en el comportamiento de las células mamarias ante la Epi. En particular, se ha descrito que el principal subtipo de  $\beta$ -RA expresado en glándula mamaria es el  $\beta_2$  (Inderwies *et al.*, 2003b; Roets *et al.*, 1984), por lo que en el presente trabajo se profundizó en el rol de este subtipo.

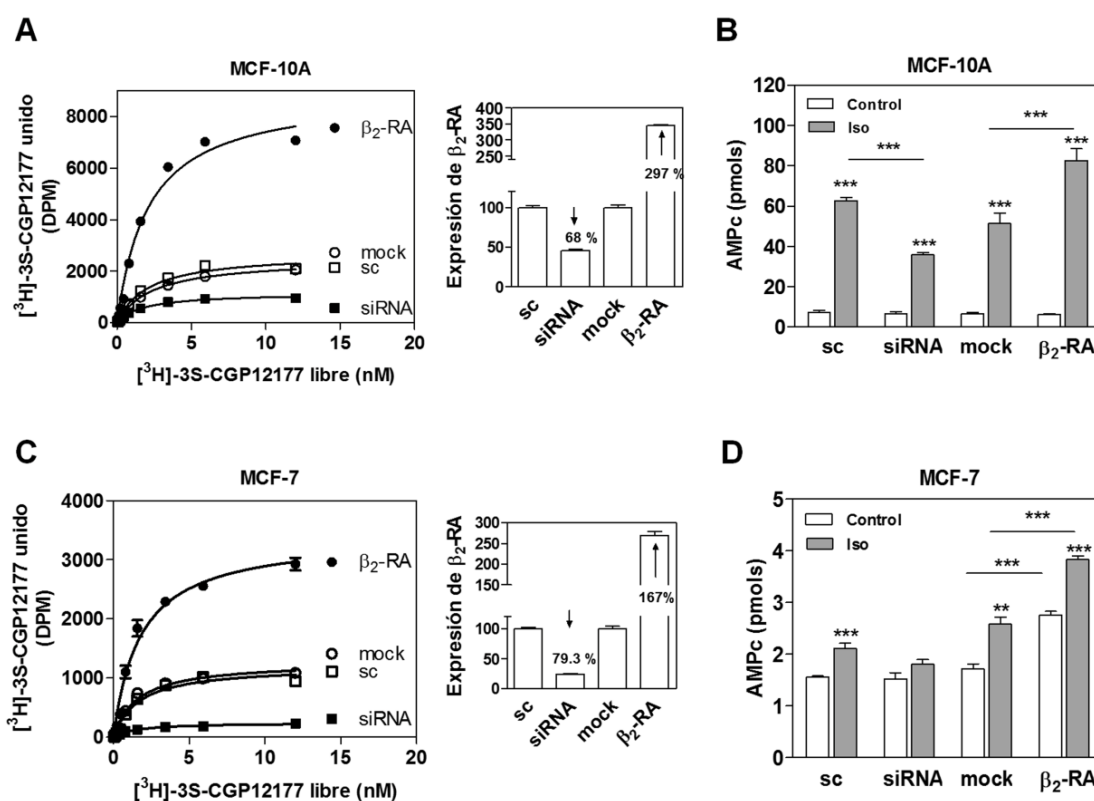
### **Modulación de la expresión del $\beta_2$ -RA y su efecto en células no tumorales y tumorales de mama humana**

Como modelo tumoral se utilizó la línea MCF-7, un modelo celular clásico de estudio del cáncer de mama hormono-dependiente. Esta línea representa a los tumores luminales, que son el 70% de los tumores de mama observados en pacientes (Neve *et al.*, 2006). Por otro lado, existen pocas líneas provenientes de mama humana consideradas no tumorales, entre ellas las MCF-10A y HBL-100, y son las que se utilizan como referencia de lo que ocurre en la mama normal. Las células MCF-10A tienen características similares al epitelio mamario normal (Soule *et al.*, 1973). La línea HBL-100, descrita como no tumoral en pasajes bajos, exhibe ciertas características de transformación desde el principio y se desarrolla hasta volverse tumorigénica (Gaffney, 1982). Por estos motivos, utilizamos como modelo no tumoral a la línea MCF-10A.

Se transfectaron las células con el fin de sobreexpresar o silenciar el  $\beta_2$ -RA. Los niveles de  $\beta_2$ -RA fueron evaluados 48 a 72 hs luego de la transfección por la técnica de *binding*. La funcionalidad de los receptores fue evaluada midiendo los niveles de AMPc, ya que es la vía de señalización clásica de los mismos.

Se observó que el silenciamiento disminuye la expresión del receptor en un 68% en la línea MCF-10A y un 79,3% en la línea tumoral MCF-7 (Fig. 1A). La sobreexpresión produce un aumento de 297% para la línea MCF-10A y un 167% para las MCF-7 (Fig. 1C).

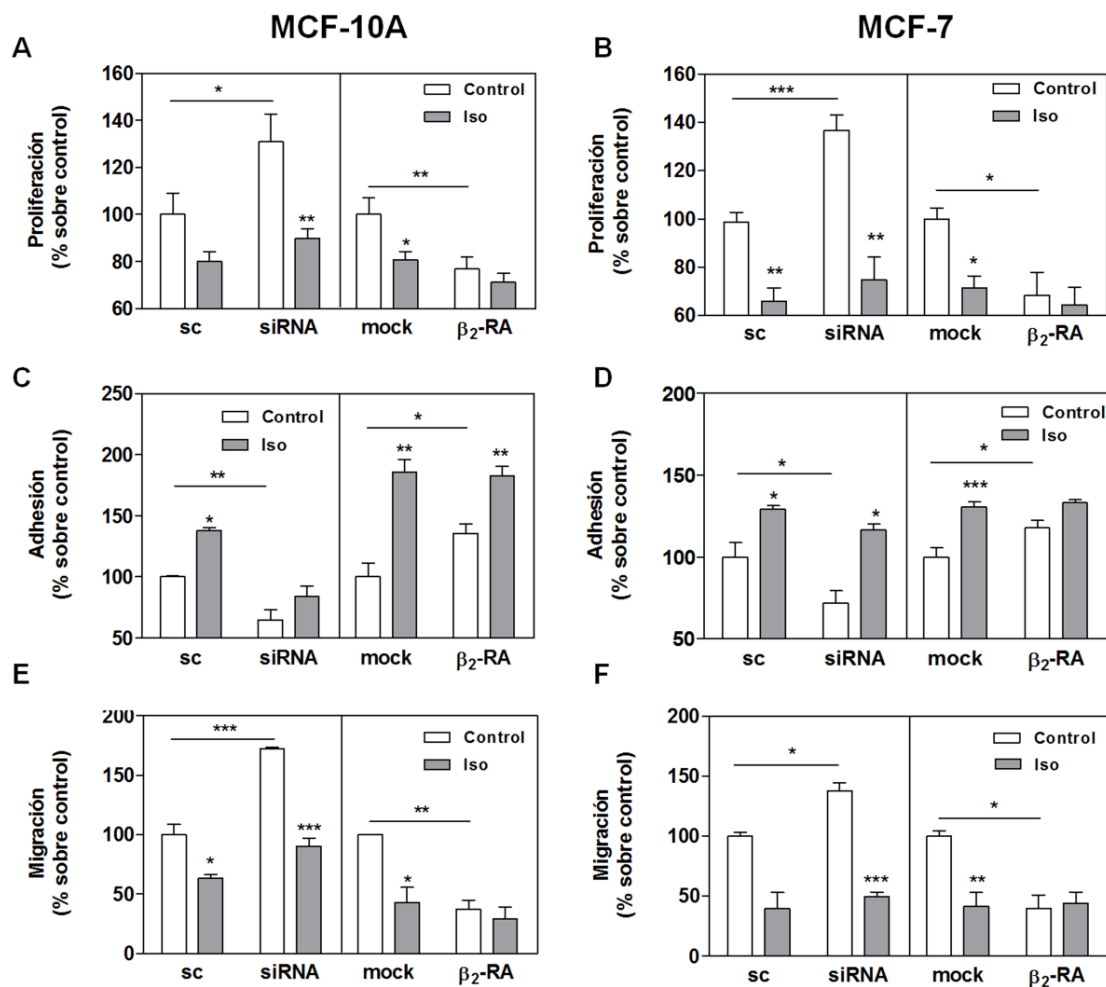
Cuando se modularon las concentraciones del  $\beta_2$ -RA en la línea MCF-10A los niveles basales de AMPc no se modificaron. Sin embargo, los niveles de AMPc luego de la estimulación con el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol (Iso) demostraron ser dependientes de los niveles de expresión del receptor (Fig. 1B y D). En la línea MCF-7, la sobreexpresión del  $\beta_2$ -RA causó un aumento del AMPc tanto en condiciones basales como luego de la estimulación con Iso, corroborando la actividad basal de dicho receptor en esta línea.



**Figura 1.** Cuantificación de sitios  $\beta$ -adrenérgicos en las líneas MCF-10A (A) y MCF-7 (C) transfectadas con la secuencia scrambled (sc), siRNA para el  $\beta_2$ -RA, el plásmido vacío (mock) o el plásmido codificante para el  $\beta_2$ -RA. A la derecha la cuantificación de los sitios  $\beta$ -adrenérgicos expresada como porcentaje con respecto al sc y al mock respectivamente. B y D. Cuantificación de los niveles de AMPc en estado basal y luego de la estimulación con isoproterenol (Iso) 1  $\mu\text{M}$  en las líneas MCF-10A y MCF-7 respectivamente. Estadística: ANOVA seguido del test de Bonferroni \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



En estas células transfectadas se midieron parámetros asociados a la progresión tumoral como proliferación, adhesión y migración celular (Fig. 2). Como control del silenciamiento, se utilizó un siRNA con una secuencia irrelevante (sc) y como control de la sobreexpresión, un plásmido vacío (mock). El silenciamiento del receptor tanto en la línea MCF-10A como en la MCF-7 provoca un aumento basal de la proliferación y la migración y una disminución de la adhesión (barras sc vs barras siRNA). Por el contrario, al sobreexpresar el receptor se observó una disminución de la proliferación y la migración, y un aumento en la adhesión en ambas líneas (barras mock vs  $\beta_2$ -RA). La estimulación con Iso causó en todos los casos una disminución de la proliferación y migración celular, y un aumento en la adhesión. Estos resultados demuestran que ***no solo la activación sino también los niveles de expresión del  $\beta_2$ -RA regulan procesos como proliferación, migración y adhesión celular. En particular la disminución de este receptor estaría asociada con un comportamiento celular más maligno.***

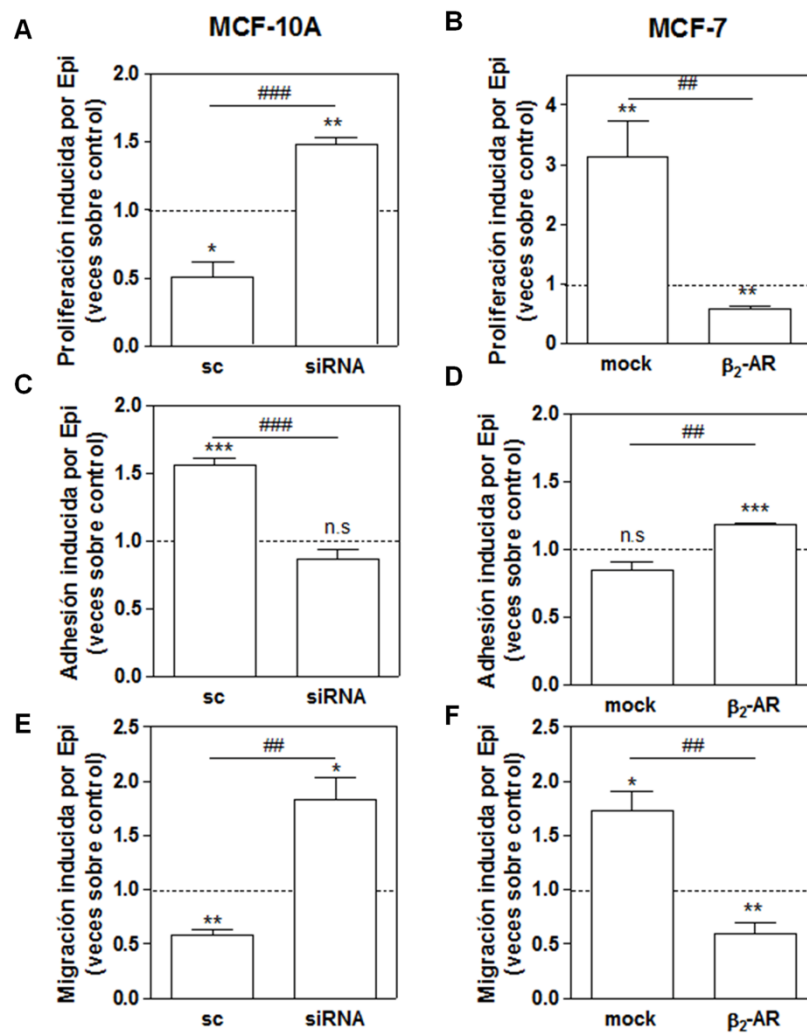


**Figura 2.** Efecto del silenciamiento y la sobreexpresión sobre la proliferación (A y B), la adhesión (C y D) y la migración (E y F) en células MCF-10A (A, C y E) y MCF-7 (B, D y F). Las células se transfectaron con la secuencia scramble (sc), siRNA  $\beta_2$ , el plásmido vacío (mock) y el plásmido codificante para el  $\beta_2$ -RA. Los parámetros se midieron en condiciones basales (barras control) y luego del tratamiento con isoproterenol  $1\mu\text{M}$  (barras Iso). Estadística: ANOVA seguido del test de Bonferroni \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Para corroborar la hipótesis de que el nivel de expresión del receptor es responsable del comportamiento de las células frente a la Epi, se silenció el  $\beta_2$ -RA en las MCF-10A (línea con gran expresión endógena de  $\beta$ -RA) y se sobreexpresó el mismo en las MCF-7 (las cuales presentan endógenamente baja expresión del mismo). Con esta estrategia, la línea no tumoral imitaría los niveles de expresión de una tumoral y viceversa. Estas líneas transfectadas fueron incubadas con el ligando endógeno Epi 1

$\mu\text{M}$ . Tanto la línea MCF-10A transfectada con la secuencia sc como la línea MCF-7 transfectada con el plásmido vacío (mock) se comportaron frente a la Epi como las líneas sin transfectar (Fig. 3 barras sc y mock, comparación con la barra punteada). Así, en la línea MCF-10A transfectada con el siRNA irrelevante o sc, la Epi disminuyó significativamente la proliferación y la migración, y aumentó la adhesión con respecto al control. Al silenciar el receptor, la Epi revirtió el efecto, aumentando la proliferación y la migración, y anulando el efecto sobre la adhesión celular. El silenciamiento del  $\beta_2$ -RA en la línea no tumoral induciría un comportamiento frente a la Epi semejante al observado en la línea tumoral.

Por otro lado, cuando se sobreexpresó el  $\beta_2$ -RA en MCF-7, la Epi disminuyó la proliferación y la migración celular y aumentó la adhesión, imitando la respuesta de las líneas no tumorales frente a la Epi (Fig. 3). Estos resultados demuestran ***que los niveles de expresión del  $\beta_2$ -RA son determinantes en la respuesta celular ante la catecolamina endógena Epi en estas líneas celulares.***



**Figura 3.** Silenciamiento del  $\beta_2$ -RA (siRNA) en la línea MCF-10A (A, C y E) y sobreexpresión del  $\beta_2$ -RA ( $\beta_2$ -RA) en la línea MCF-7 (B, D y F). Efecto de la epinefrina 1  $\mu$ M (Epi) sobre proliferación (A y B), adhesión (C y D) y migración (E y F). Los valores se expresan como efecto provocado por la Epi con respecto a las células sin tratar (vehículo, líneas punteadas). Estadística: ANOVA seguido del test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  entre las células tratadas con Epi y las no tratadas. ##  $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  la respuesta ante la Epi entre sc vs siRNA o mock vs  $\beta_2$ -RA. n.s: diferencias no significativas.

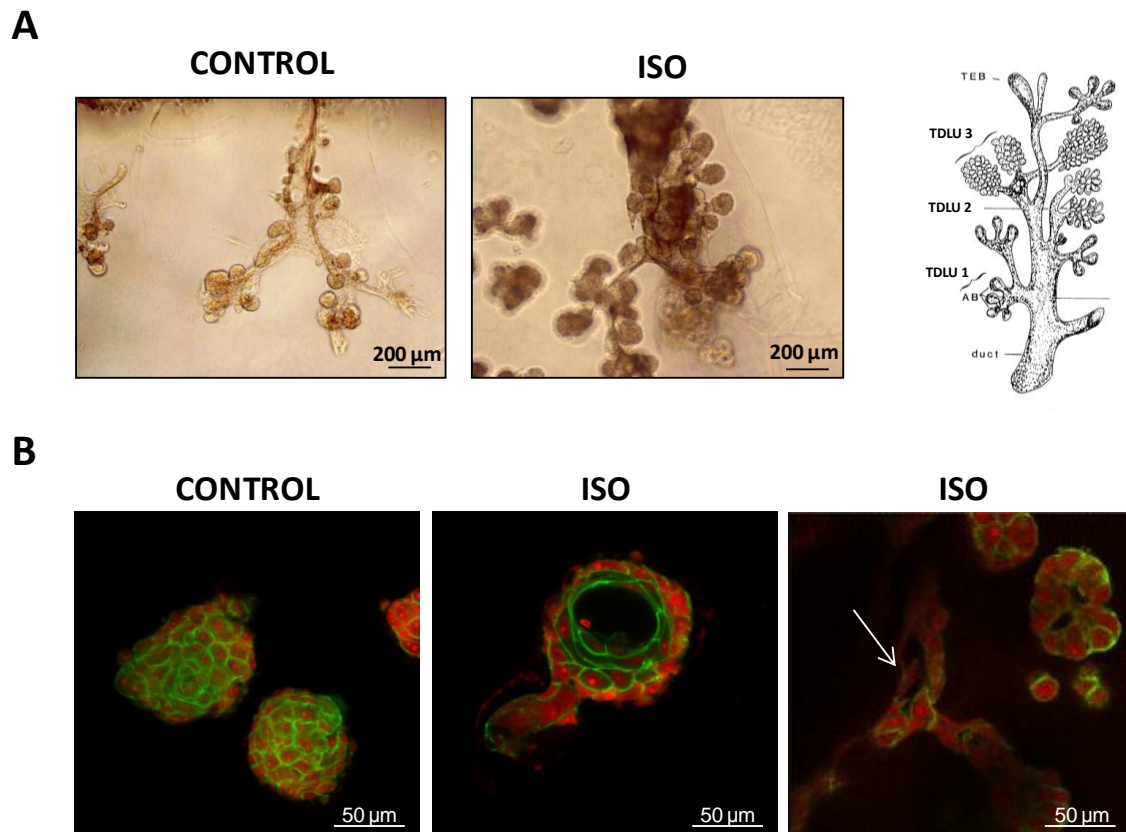
## **Efecto de la activación $\beta$ -adrenérgica en mama no tumoral**

### **Modelo *in vitro* - Cultivo celular en 3D**

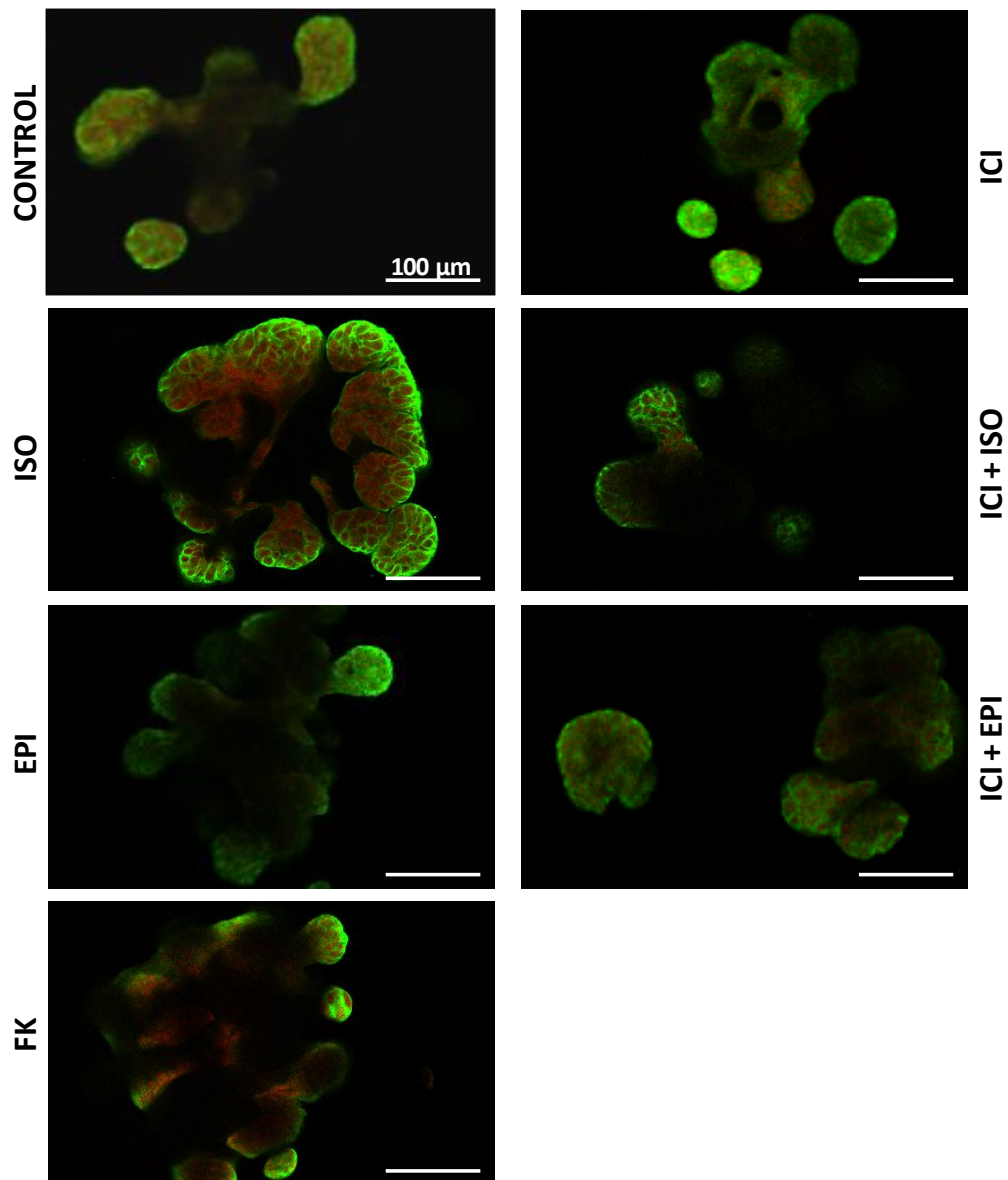
Para comprender aun más el rol de estos receptores en la biología mamaria, se evaluó el efecto de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica en células creciendo en cultivo en tres dimensiones (3D). El modelo de cultivo 3D permite a las células organizarse en estructuras que se asemejan a la disposición celular *in vivo* (Shamir *et al.*, 2014).

Las células MCF-10A luego de 15 días en cultivo 3D, formaron estructuras tubulares sólidas o con lúmenes incipientes semejantes a ductos mamarios con ramas secundarias y pocas ramas terciarias (Fig. 4A). Estas estructuras se corresponden a los TDLU de tipo 1 según la descripción de Hovey y Russo (esquema de la descripción en Fig. 4B) (Hovey *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2004). La incubación con Iso causó el desarrollo de estructuras más diferenciadas, con un incremento en el número de brotes alveolares (BA), correspondiéndose con los TDLU de tipo 2 (Iso:  $45 \pm 3$  BA vs control:  $12 \pm 3$  BA,  $p < 0.001$  (Fig. 4A). Además, el tratamiento con Iso indujo el desarrollo de lúmenes bien constituidos, tanto en las estructuras acinares como en las estructuras tubulares (Fig. 4C flecha). Esto demuestra un aumento en el grado de diferenciación de dichas estructuras.

Al igual que el Iso, la Epi provocó un aumento del grado de diferenciación de estas estructuras (Fig. 5). La incubación con el antagonista específico  $\beta_2$  ICI-118551 (ICI) revirtió el efecto en la diferenciación del Iso y de la Epi. El tratamiento con forskolina 10  $\mu$ M (FK), compuesto que activa constitutivamente la AC elevando los niveles de AMPc, sugiere que el efecto diferenciante es mediado vía la producción de este segundo mensajero (Fig. 5). Por ende, ***la activación del  $\beta_2$ -RA, posiblemente a través de su mecanismo clásico de señalización, posee un efecto diferenciante en las células no tumorales mamarias MCF-10A creciendo en cultivo 3D.***



**Figura 4.** Células MCF-10A creciendo en cultivo tridimensional. **A.** Imágenes de campo claro de células tratadas con medio base (control) o con isoproterenol  $1\mu\text{M}$  (Iso). A la derecha, diagrama de la glándula mamaria modificado de Russo & Russo 2004. **B.** Imágenes de microscopía confocal. Marcación del citoesqueleto de actina (verde) y marcación con yoduro de propidio para los núcleos (rojo). La flecha indica la presencia de lumen en las estructuras ductales.



**Figura 5.** Imágenes de microscopía confocal de células MCF-10A creciendo en cultivo tridimensional. Las células fueron tratadas durante 15 días con medio base (control), con isoproterenol 1 μM (Iso), epinefrina 1 μM (Epi), forskolina 10 μM (FK) en presencia o ausencia de ICI-118551 10 μM (ICI). Marcación de citoesqueleto de actina con faloidina (verde) y marcación de los núcleos con yoduro de propidio.

### Modelo *in vivo* - Glándula mamaria murina

Como se mencionó en la introducción, la glándula mamaria al nacimiento está compuesta de un sistema ductal rudimentario. Ésta crece isométricamente hasta la pubertad (Hovey *et al.*, 2002). En ese momento aparecen los TEBS y comienza a partir de ellos el proceso de elongación ductal.

Para determinar el efecto de la activación de los  $\beta$ -RA en la glándula mamaria murina normal, ratones hembra de distintas edades fueron inoculados durante 15 días con solución fisiológica (control) o con Iso 1mg/Kg/día de manera subcutánea. Al sacrificio se extrajo la cuarta mama de los ratones y mediante la técnica de *whole mount* se estudió la morfología mamaria. El tratamiento con Iso aumentó significativamente la ramificación de los ductos mamarios con respecto a los ratones control, tanto en ratones de destete (3 semanas) como en ratones de 6-8 semanas (púberes) (ratones destete: Iso  $150 \pm 32$  ductos/campo vs Control  $57 \pm 21$  ductos/campo; ratones púberes: Iso  $150 \pm 14$  ductos/campo vs Control  $73 \pm 24$  ductos/campo,  $p < 0.05$ , Fig. 6A y B). En el caso de los ratones de 20 semanas (adultos), el tratamiento con Iso no tuvo efecto en la ramificación ductal (Iso  $130 \pm 12$  ductos/campo vs Control  $133 \pm 26$  ductos/campo, Fig. 6A y B). El tratamiento con Iso indujo la ramificación ductal en ratones de destete y púberes. La cantidad de ductos totales en los ratones de destete y púberes luego del tratamiento es semejante al número de ductos de los ratones adultos, lo que sugeriría que el Iso podría estar acelerando la ramificación ductal normal.

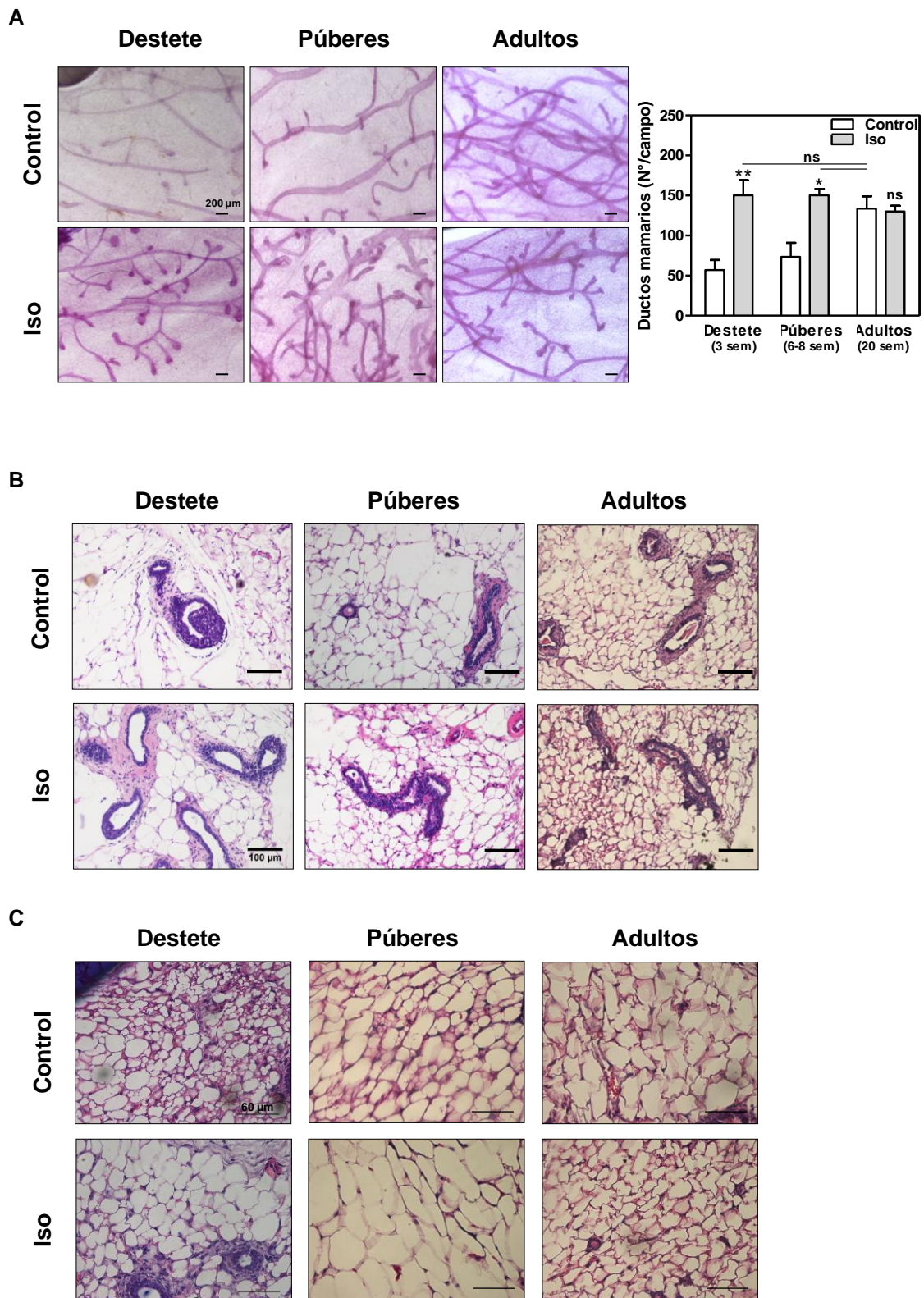
Las glándulas mamarias de los ratones de destete están compuestas aproximadamente por un 90% de tejido adiposo y un 10% de estructuras propiamente glandulares que componen los ductos. La mayoría de estos ductos presentan un epitelio estratificado con lúmenes pequeños, fenestrados e irregulares, lo que concuerda con el estado madurativo de estos ratones (Fig. 6B). El tejido adiposo que comprende la mayoría de la mama, presenta adipocitos multivacuolados, característicos de un estado inmaduro (Fig. 6C). Esto concuerda con la descripción del tejido adiposo pardo, característico de la glándula mamaria de ratones recién nacidos (Gouon-Evans *et al.*, 2002). El tratamiento con Iso, acelera la maduración del tejido



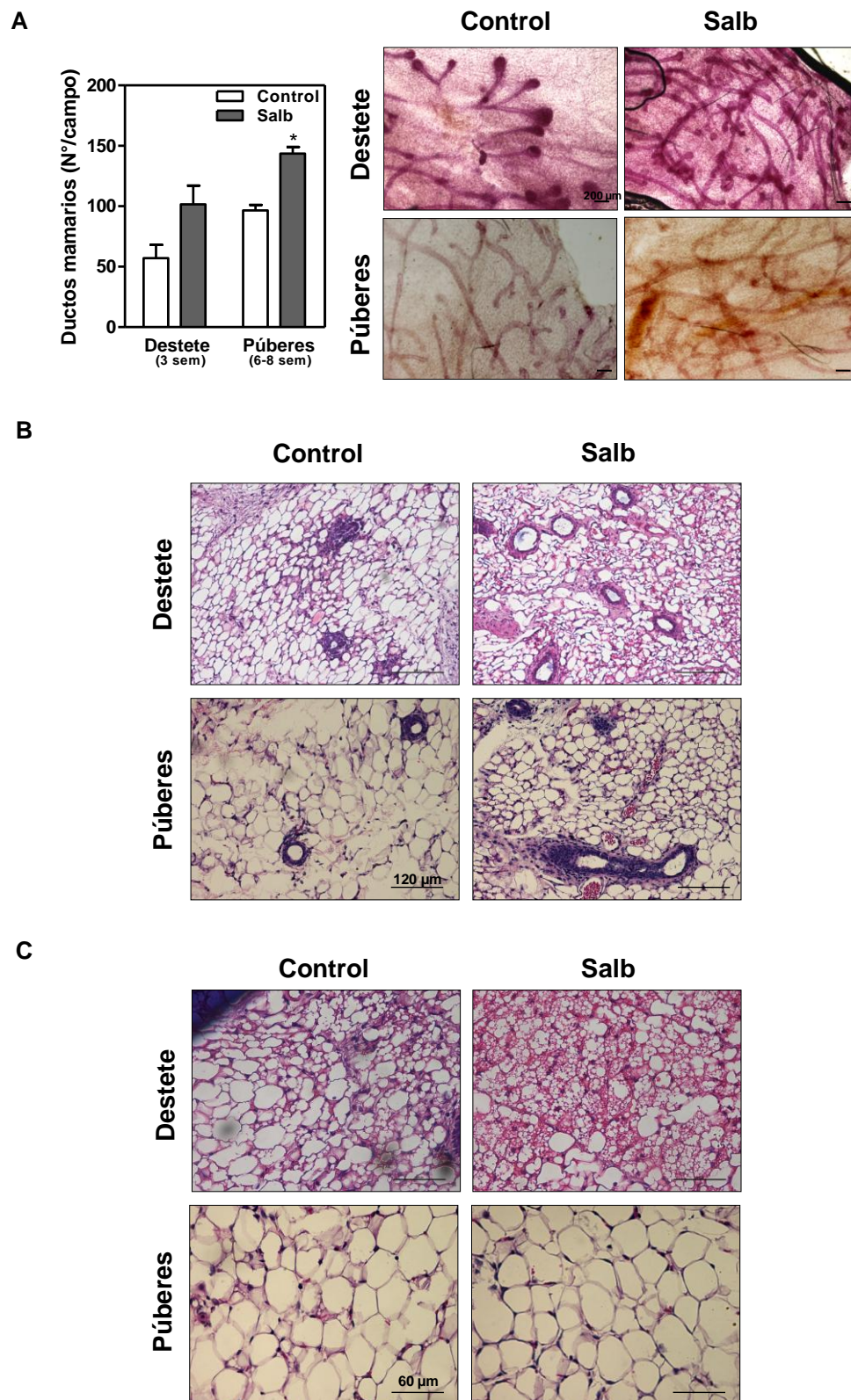
adiposo. Se observaron adipocitos con vacuolas únicas y núcleos pequeños. En las estructuras ductales, se observó una disminución en el número de capas de células epiteliales y un engrosamiento del tejido peri ductal con un reclutamiento evidente de fibroblastos. Estos resultados sugieren que ***bajo el estímulo  $\beta$ -adrenérgico, los ductos aceleran su maduración, transformando los TEB en estructuras terminales menos activas.***

En las glándulas mamarias de los ratones púberes control, se observaron ductos compuestos por una monocapa epitelial rodeada de una capa celular mioepitelial y un estroma adiposo univacuolado (maduro) (Fig. 6C). A pesar que el Iso aumentó significativamente el *branching* mamario, no se observaron cambios histológicos evidentes en las glándulas mamarias de ratones de 6-8 tratados. En el caso de los ratones adultos, si bien no se observó un aumento en el *branching* luego del tratamiento con Iso, se observó la aparición de nuevas estructuras ductales (Fig. 6C).

Si bien el receptor  $\beta_2$  es el subtipo  $\beta$ -RA mayormente expresado en glándula mamaria bovina, también se han encontrado niveles importantes de RNAm para el receptor  $\beta_3$ , el cual se encuentra presente en el tejido adiposo (Inderwies *et al.*, 2003b; Roets *et al.*, 1984). En base a los efectos observados sobre el tejido epitelial y adiposo mamario, y debido a que el Iso es capaz de unirse a los tres subtipos  $\beta$ -RA, se estudió el efecto de un agonista específico  $\beta_2$ -RA, el salbutamol (Salb). La administración de Salb provocó también un aumento del *branching* de glándulas mamarias (Fig. 7A). Este aumento es estadísticamente significativo en ratones púberes ( $p < 0.05$ ). Al igual que el Iso, la estimulación con Salb no provocó cambios histológicos visibles en ratones de 6-8 semanas (Fig. 7B). Contrariamente, el Salb no tuvo ningún efecto sobre el tejido adiposo de los animales de destete. Este hallazgo podría sugerir un rol protagónico del  $\beta_3$ -RA, presente en tejido adiposo, en la maduración de los adipocitos inducida por Iso (Fig. 7C).

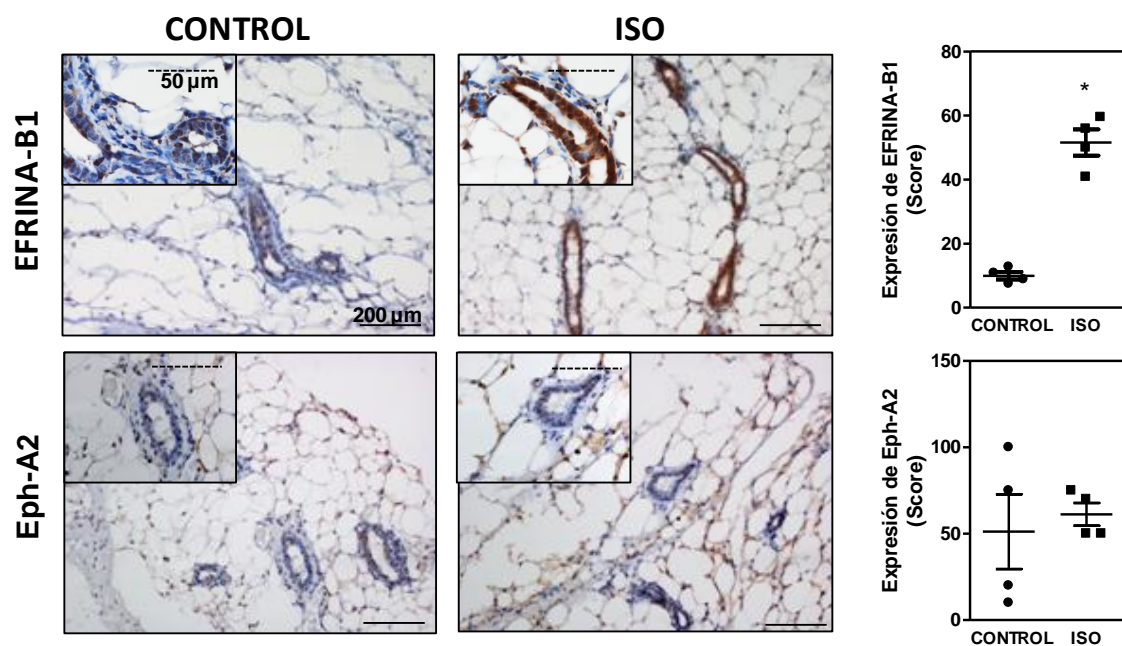


**Figura 6.** A. Whole mounts de glándulas mamarias de ratones de destete, púberes y adultos tratadas con solución fisiológica (Control) o con isoproterenol 1mg/Kg\*día (Iso) y su cuantificación. B. Cortes histológicos de dichas mamas con tinción H&E. C. Detalle del tejido adiposo de las mamas. Estadística: ANOVA-Bonferroni. ns: diferencias no significativas, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Figura 7. A.** Whole mounts de glándulas mamarias de ratones de destete y púberes tratadas con solución fisiológica (Control) o con salbutamol 1mg/Kg/día (Salb) y su cuantificación. **B.** Cortes histológicos de glándulas mamarias. Tinción H&E. **C.** Detalle del tejido adiposo. Estadística: ANOVA seguido del test de Bonferroni, \* $p < 0.05$ .

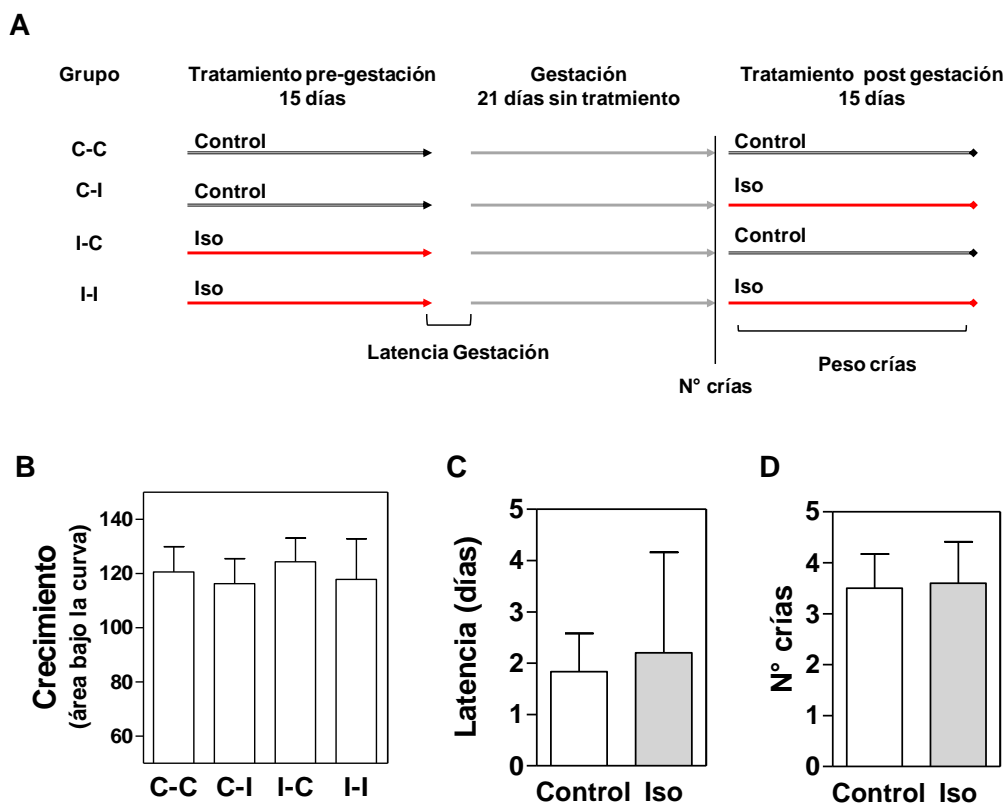
En un trabajo previo, se identificaron numerosos genes que podrían estar regulando la maduración de los ductos mamarios (Kouros-Mehr *et al.*, 2006). Entre ellos, se describió que los genes de EFRINA-B1 y EphA2 se expresan diferencialmente en la glándula mamaria madura. Se evaluó mediante inmunohistoquímica (IHQ) la expresión de estas proteínas en la glándula mamaria de ratones de 6-8 semanas tratados o no con Iso. El tratamiento indujo un aumento significativo en la expresión de EFRINA-B1 tanto en el epitelio como en el estroma ( $p < 0.05$ ), sin embargo no modificó la expresión de Eph-A2 (Fig. 8). El aumento de EFRINA-B1 concuerda con los resultados obtenidos, indicando la presencia de ductos maduros luego del tratamiento con el agonista  $\beta$ -adrenérgico.



**Figura 8.** Expresión mediante inmunohistoquímica de las proteínas EFRINA-B1 y Eph-A2 en glándula mamaria de ratones púberes tratados con solución fisiológica (Control) o con isoproterenol (Iso). A su derecha la correspondiente cuantificación. Barras continuas 200  $\mu$ m, punteadas: 50  $\mu$ m. Estadística: Test no paramétrico de Mann Whitney,  $*p < 0.05$ .

Dado el efecto observado sobre los ductos mamarios, se evaluó si el tratamiento con Iso provocaba cambios funcionales de las glándulas mamarias. Para ello evaluamos el crecimiento de las crías durante el período de lactancia, como una medida de la funcionalidad de las glándulas. El diseño experimental se basó en el tratamiento de hembras durante 15 días con solución fisiológica o con Iso (Fig. 9A). Pasado este tiempo, se realizó el apareo de las mismas y se midió el tiempo de la aparición del tapón mucoso, como indicador de preñez (latencia gestación). Durante la gestación ningún grupo de ratones fue inoculado. Luego del nacimiento, se separó cada grupo en dos, uno recibió solución fisiológica y el otro Iso durante todo el período de lactancia, evaluando el peso de las crías en ese tiempo. El tratamiento con Iso pre y/o post gestación no afectó el peso de las crías, lo que indica que el ***Iso no estaría afectando la funcionalidad mamaria*** (Fig. 9B). Otros parámetros reproductivos estudiados, como el número de crías y el tiempo de latencia al embarazo tampoco se vieron afectados (Fig. 9C y D).

Los resultados presentados hasta el momento demuestran que ***la estimulación  $\beta$ -adrenérgica induce la diferenciación de células mamarias creciendo en cultivo 3D como así también el aumento en el branching y la diferenciación de la glándula mamaria in vivo.***



**Figura 9.** Efecto del isoproterenol (Iso) sobre parámetros reproductivos y funcionalidad de la glándula mamaria. **A.** Esquema de tratamiento. Se trató a los ratones con solución fisiológica (Control) o con Iso por 15 días previos al apareo y luego se repitieron ambos tratamientos post parto, determinando cuatro grupos. **B.** Crecimiento de las crías durante el tiempo de lactancia. **C.** Latencia al embarazo. **D.** Número de crías.

### Mecanismo de acción

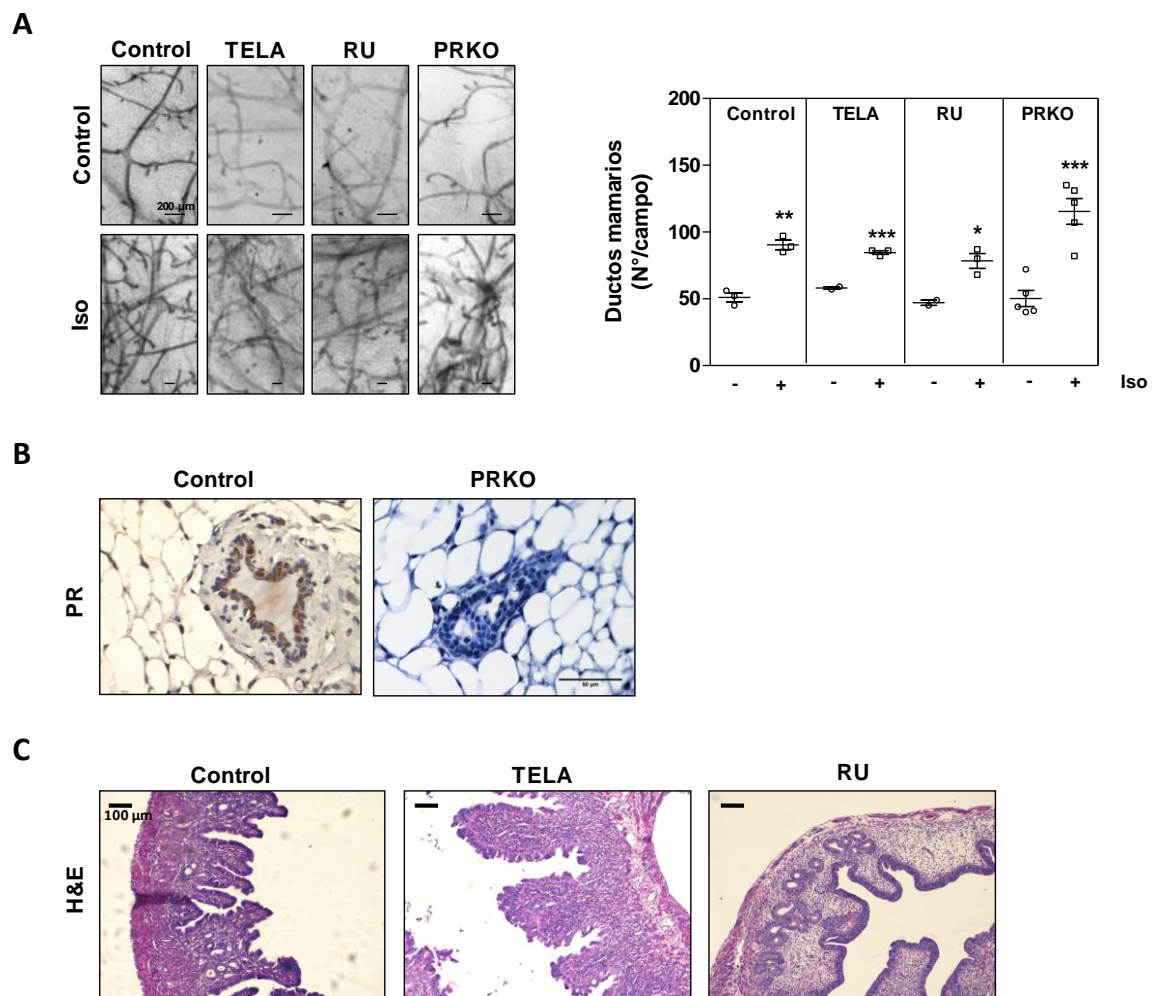
El desarrollo mamario ocurre principalmente durante la vida postnatal bajo la influencia de las hormonas reproductivas. En base a esto, evaluamos si el efecto del Iso se encontraba mediado por receptores hormonales claves en el desarrollo mamario, como el receptor de progesterona (PR) y/o el receptor de estrógenos (ER) (Briskin *et al.*, 1998; Mallepell *et al.*, 2006).

Para estudiar el posible rol del PR, utilizamos ratones tratados con mifepristona (RU-486, antagonista no selectivo de PR), telapristona (TELA, modulador selectivo del PR) y ratones hembra *knock-out* para el PR (PRKO). El tratamiento con Iso durante 15 días fue capaz de inducir el aumento del *branching* mamario en todos los grupos

( $p < 0.05$ , Fig. 10A). Se verificó la ausencia de expresión del PR en los ratones PRKO (Fig. 10B) y que las dosis y concentraciones utilizadas de TELA y RU fueran efectivas para lograr otros efectos fisiológicos (Fig. 10C) (Sahores *et al.*, 2013). Tanto la TELA como el RU producen la clásica reducción del componente glandular producto de la inhibición del PR. Además, el RU debido a su efecto en el receptor de glucocorticoides, causó edema en el estroma. Este resultado demuestra que las drogas inhiben de manera eficiente al receptor. Por lo tanto, el PR no estaría mediando el efecto del Iso sobre el *branching* mamario en este momento del desarrollo.

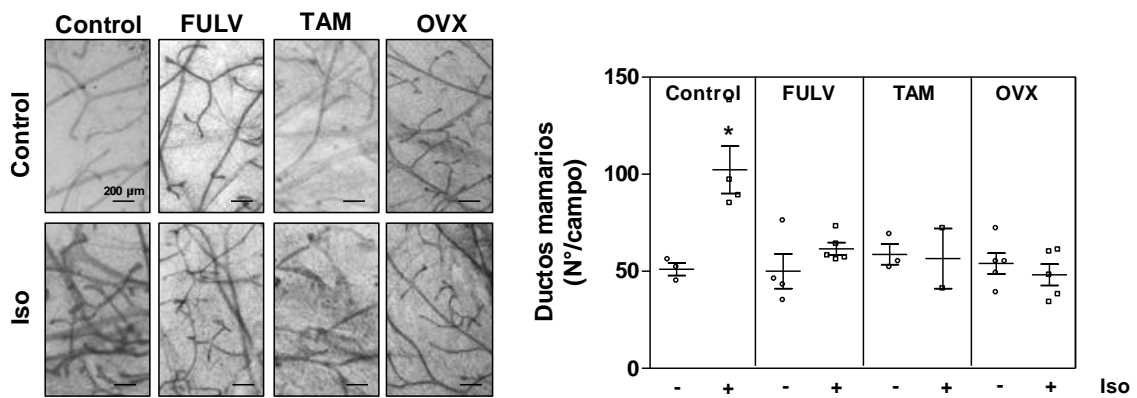
Para estudiar el rol del ER, se evaluó el efecto del Iso en ratones tratados con tamoxifeno (TAM, modulador selectivo del ER), con Fulvestrant (FULV, antagonista del ER y regulador negativo de su expresión) y en ratones ovariectomizados (OVX). Es sabido que cuando la señalización del ER se encuentra disminuida, la glándula mamaria se atrofia, mostrando escasos y pequeños ductos, con lúmenes casi imperceptibles (Silberstein *et al.*, 1984). En estas condiciones, el tratamiento con Iso no logró aumentar el *branching* mamario, sugiriendo que la presencia del ER y su mecanismo de señalización es indispensable para el efecto  $\beta$ -adrenérgico sobre el *branching* mamario en este momento del desarrollo (Fig. 11).

Sin embargo, en el análisis histológico de cortes teñidos con H&E se observó un efecto del Iso en la arquitectura ductal independiente de la presencia del ER. El Iso restableció el número de células por ducto como así también el área del lumen (Fig. 12A, B y C). En los cortes histológicos de glándulas mamarias tratadas con Iso se observó un aumento en la condensación de la cromatina de las células epiteliales con respecto al control (Fig. 12D). Dicho efecto no se observó en los ratones PRKO ni en los OVX. Por el contrario los ratones tratados con FULV mostraron un estado más laxo de la cromatina, que fue revertido por la administración del Iso. La presencia del contenido proteico en el lumen no se vio modificada (Fig. 12E). Esto último concuerda con el estadio del desarrollo estudiado, ya que la producción de proteínas de la leche se encuentra regulada posteriormente en el desarrollo mamario, bajo el control de hormonas específicas que controlan el fin del embarazo y la lactancia (Weaver *et al.*, 2016).

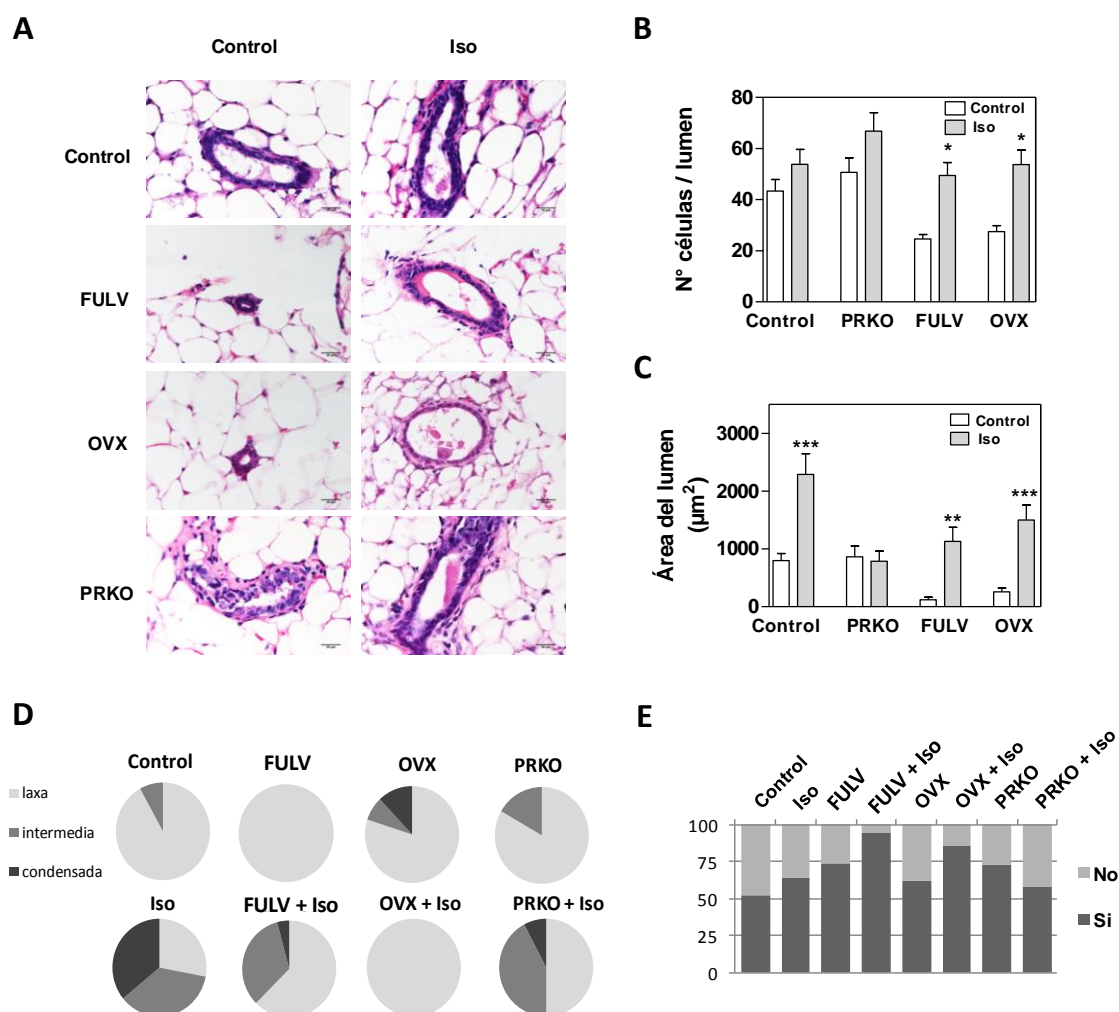


**Figura 10. A.** Efecto del isoproterenol (Iso) sobre glándulas mamarias de ratones tratados con telapristona (TELA), mifepristona (RU) y en ratones knock-out para el receptor de progesterona (PRKO). A la izquierda los whole mounts de las glándulas mamarias y a su derecha la cuantificación del branching. **B.** Inmunohistoquímica para el receptor de progesterona (PR) en ratones controles y ratones PRKO. Regla: 50  $\mu$ m. **C.** Tinción con hematoxilina-eosina (H&E) de úteros de ratones controles, tratados con TELA y con RU como control de la funcionalidad de dichas drogas sobre órganos blanco conocidos. Regla: 100  $\mu$ m. Estadística. ANOVA seguido del test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .





**Figura 11.** Efecto del isoproterenol (Iso) en ratones tratados con fulvestrant (FULV), tamoxifeno (TAM) o en ratones ovariectomizados (OVX). A la izquierda los whole mounts de las glándulas mamarias y a la derecha la cuantificación del branching. Estadística. ANOVA seguido del test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ .



**Figura 12.** A. Cortes histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de las mamas de ratones tratados con fulvestrant (FULV), ratones knock-out para el receptor de progesterona (PRKO) y ovariectomizados (OVX) tratados a su vez con solución fisiológica (Control) o con isoproterenol (Iso). Aumento 600X. B. Cuantificación del número de células/ducto. C. Área del lumen en  $\mu\text{m}^2$ . D. Estado de la cromatina de los ductos mamarios. E. Presencia de contenido en el lumen (%). Estadística. ANOVA seguido del test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Los resultados hasta aquí revelan que **el efecto del Iso sobre el branching mamario depende de la presencia del ER. Sin embargo existe un efecto del Iso sobre la arquitectura ductal y del lumen independiente del ER.**

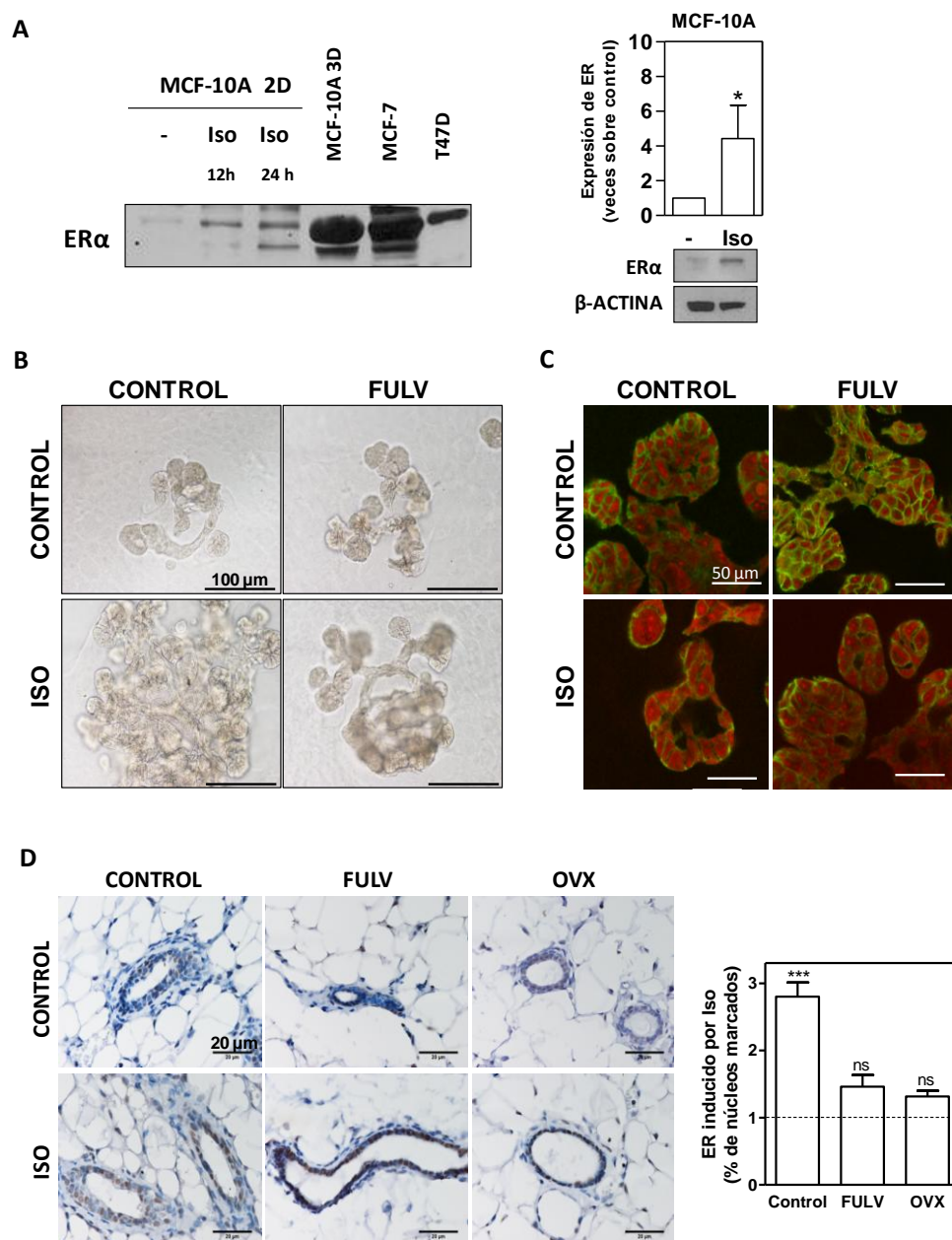
Existen dos receptores de estrógenos, el ER $\beta$  y el ER $\alpha$ . Dichos receptores no son isoformas sino distintas proteínas (Mosselman *et al.*, 1996). Se han descrito

numerosas y diversas funciones biológicas para estos receptores. Particularmente, se ha descrito al ER $\alpha$  como mediador de la acción de los estrógenos en la elongación de los ductos mamarios, siendo indispensable para que el desarrollo mamario ocurra. Por el contrario, los ratones adultos KO para el ER $\beta$  exhiben un fenotipo normal de la glándula mamaria (Bocchinfuso *et al.*, 1997).

Los resultados presentados demuestran que el Iso posee un efecto sobre el *branching* mamario *in vivo* dependiente de la presencia del ER y un efecto diferenciante *in vitro* en las células MCF-10A creciendo en cultivo 3D (Fig. 4). Sin embargo, se ha descrito que esta línea celular no expresa el ER $\alpha$  (Liu *et al.*, 2004). En base a esto, evaluamos la expresión de ER $\alpha$  en esta línea en cultivo tradicional (2D) luego de la incubación con Iso y en condiciones de cultivo 3D. Tanto la incubación durante 12 y 24 hs con Iso, como la condición de cultivo 3D, aumentaron la expresión del ER $\alpha$  (Fig. 13A). El aumento observado a las 24 hs resultó ser significativo ( $p < 0.05$ ). Esto sugiere que el ER $\alpha$  podría también estar mediando, por lo menos en parte, el efecto *in vitro* del Iso sobre el cultivo 3D.

A fin de corroborar esta hipótesis, se realizó cultivo 3D de las células MCF-10A en presencia o ausencia de FULV. Se observó que efectivamente la inhibición de la señalización del ER con FULV fue capaz de revertir parcialmente el desarrollo de estructuras más diferenciadas inducido por Iso (Fig. 13B). Sin embargo, el Iso fue capaz de inducir la formación de pequeños lúmenes aún en presencia de FULV (Fig. 13C). Estos hallazgos refuerzan lo observado *in vivo*, donde el ER es requerido para que el Iso provoque el aumento en el *branching* mamario, pero no en el efecto sobre la arquitectura ductal.

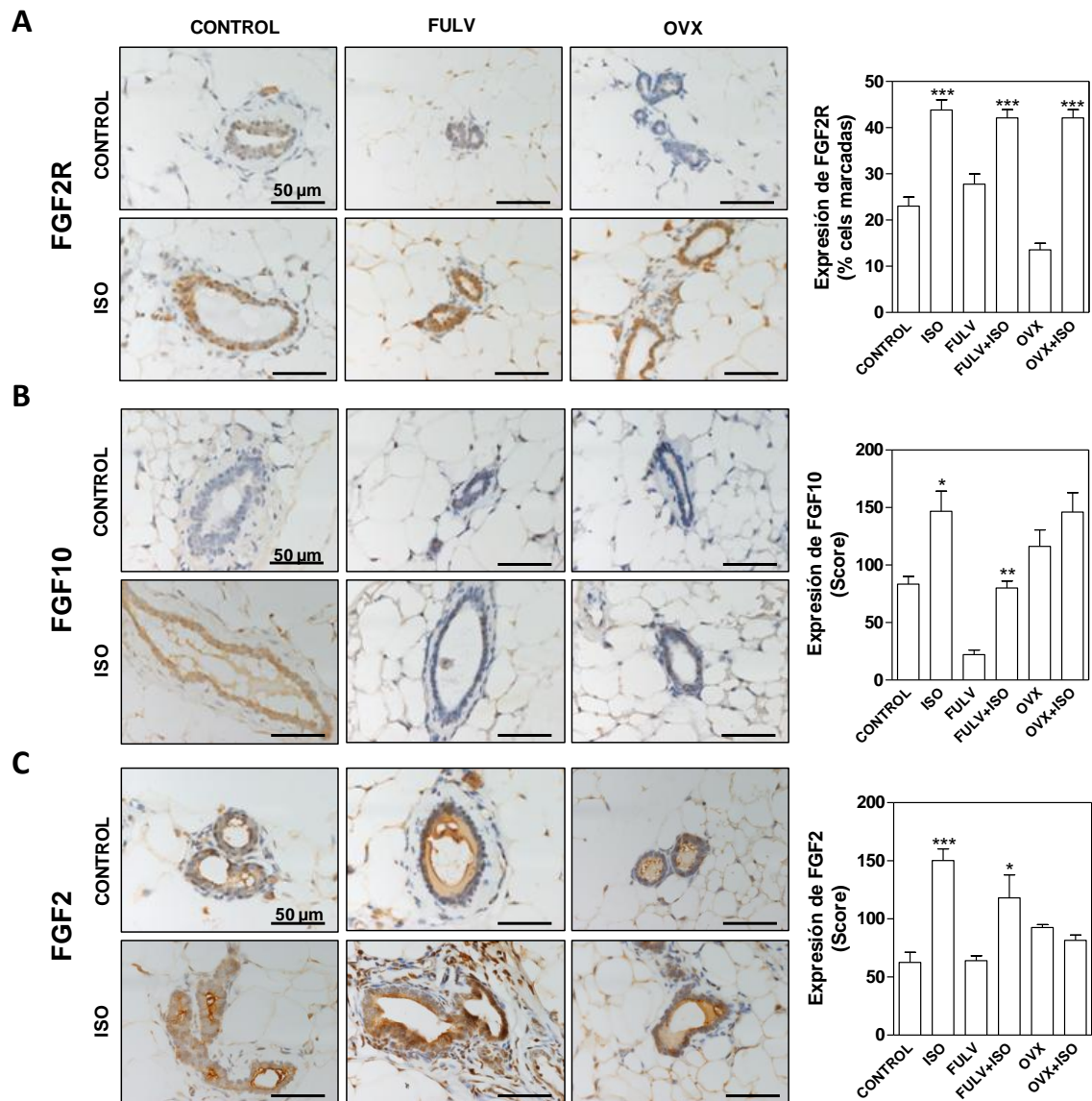
Debido al aumento observado en la expresión del ER $\alpha$  luego del tratamiento con Iso *in vitro*, se evaluó por IHQ su expresión en las glándulas mamarias. La expresión del receptor luego del tratamiento con Iso se relativizó con el valor de expresión en condiciones control (línea punteada). El Iso aumentó significativamente la expresión del ER $\alpha$  en comparación al control ( $p < 0.001$ , Fig. 13D). En el caso de glándulas mamarias de ratones tratados con FULV u OVX, se anuló el aumento en la expresión del receptor inducido por Iso.



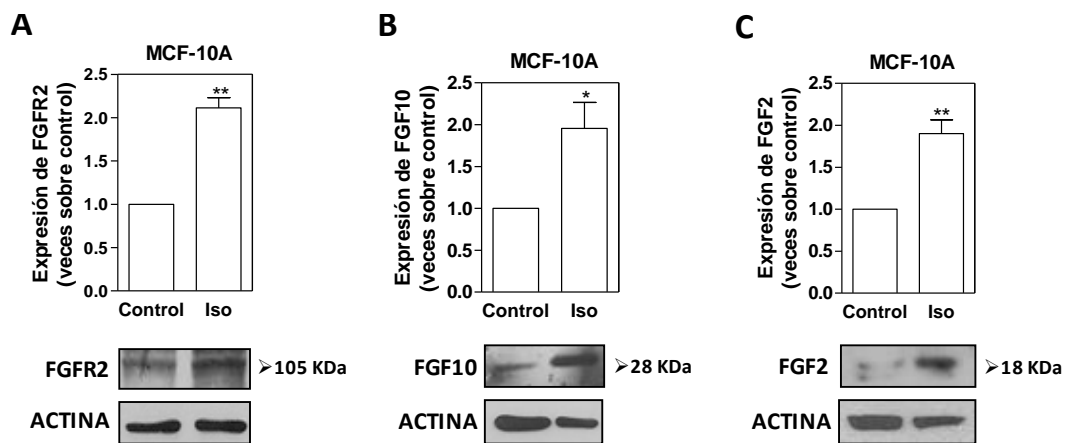
**Figura 13.** **A.** Western blot para el receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) en la línea MCF-10A en cultivo tradicional (2D) y en cultivo 3D en presencia o ausencia (-) de isoproterenol (Iso 1 $\mu$ M). Se sembraron 10  $\mu$ g de proteína para todas las condiciones y como controles positivos se utilizaron las líneas MCF-7 y T47D. A la derecha, la cuantificación del ER $\alpha$  a 24 hs de tratamiento con Iso en la línea MCF-10A. Como control de carga se utilizó  $\beta$ -ACTINA. **B** y **C.** Microscopía de células en campo claro (**B**) y fluorescencia con marcación de citoesqueleto de actina (verde) y núcleos con yoduro de propidio (**C**) de células MCF-10A creciendo en cultivo 3D en presencia o ausencia de fulvestrant (FULV) y de Iso. **D.** Inmunohistoquímica para ER $\alpha$  en cortes de glándulas mamarias de ratones control, tratados con FULV u ovariectomizados (OVX), tratados o no con Iso. Los valores se expresan como veces sobre el control (vehículo, líneas punteadas). Estadística: test t de Student. \* $p < 0.05$  (**A**) y test no paramétrico de Kruskal Wallis seguido del Test de Dunns (**D**), ns: diferencias no significativas, \*\*\* $p < 0.001$ .

Las señales hormonales regulan el desarrollo del tejido mamario por medio de interacciones recíprocas entre el epitelio y el estroma, a través de cascadas de señalización locales. Se ha descrito a la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos como reguladores locales claves en el *branching* mamario. Entre ellos, los factores FGF10 y FGF2, y el receptor FGFR2 resultan claves para la diferenciación y la elongación de los ductos mamarios (Briskin *et al.*, 2015). Se realizaron ensayos de IHQ para evaluar su expresión en los cortes de glándulas mamarias de ratones control, FULV y OVX tratados o no con Iso. El tratamiento con Iso indujo un aumento significativo de la expresión del FGF10, FGF2 y FGFR2 en las células epiteliales con respecto al grupo control (Fig. 14 A, B y C). El incremento en la expresión del FGFR2 inducido por Iso fue independiente de la presencia del ER, ya que el aumento se observó en los ratones tratados con FULV y OVX ( $p < 0.001$ , Fig. 14A). Para el FGF10 y el FGF2 se conservó el aumento inducido por Iso en los ratones tratados con FULV, pero se anuló el efecto en el grupo OVX (Fig. 14B y C). Por otro lado, el Iso también indujo la expresión de la familia de FGF en células MCF-10A creciendo en cultivo 2D (Fig. 15). Estos resultados sugieren **que los FGFs podrían ser mediadores del efecto  $\beta$ -adrenérgico sobre la glándula mamaria.**

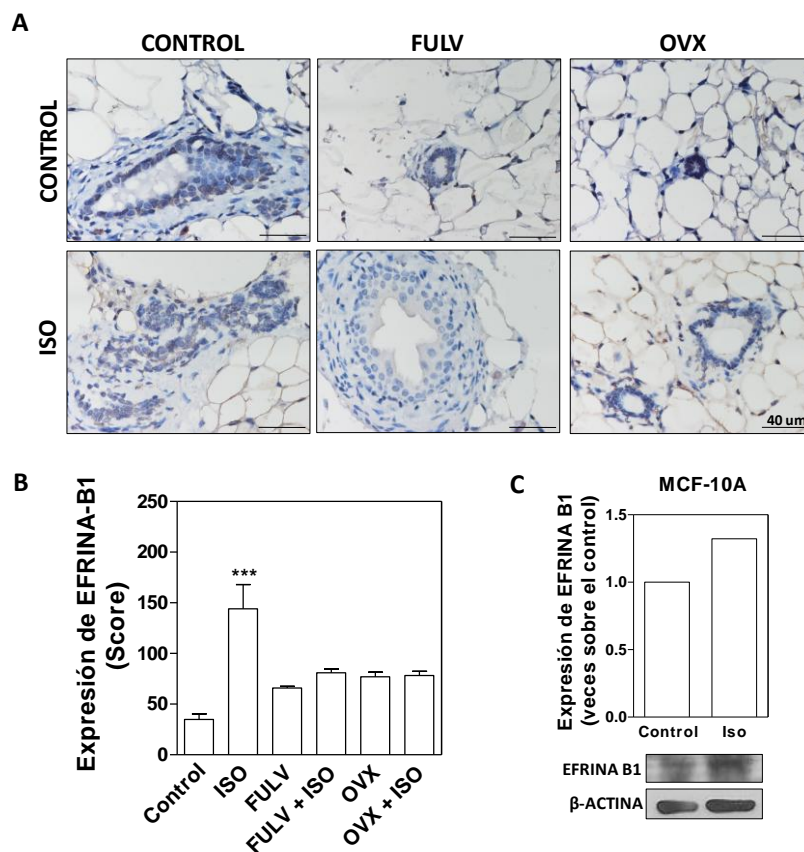
Dado el aumento inducido por Iso en la expresión de la proteína EFRINA-B1 (Fig. 8) se analizó su expresión en los grupos de ratones tratados con FULV y OVX. El tratamiento con FULV, así como también la ovariectomía, inhibieron el aumento en la expresión de EFRINA-B1 inducida por Iso (Fig. 16 A y B). **Por lo tanto, el aumento en la expresión de EFRINA-B1 es dependiente de la presencia y señalización del ER.** Se evaluó también la expresión de esta proteína *in vitro* en la línea no tumoral MCF-10A (Fig. 16C). El Iso indujo la expresión de EFRINA-B1 en células MCF-10A creciendo en cultivo 2D.



**Figura 14.** Inmunohistoquímica de glándulas mamarias para evaluar el efecto del Isoproteronol (Iso) sobre la expresión de FGFR2 (A), FGF-10 (B) y FGF-2 (C) en ratones Control, tratados con fulvestrant (FULV) u ovariectomizados (OVX). A la derecha se observa la cuantificación de la expresión de cada factor. Estadística: ANOVA seguido del test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 15.** Western blot para FGFR2 (A), FGF-10 (B) y FGF-2 (C) de la línea MCF-10A luego de 24 hs de tratamiento con medio base (Control) o con isoproterenol ( $1\mu\text{M}$ , Iso). Como control de carga se utilizó  $\beta$ -ACTINA. Estadística: test t de Student. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

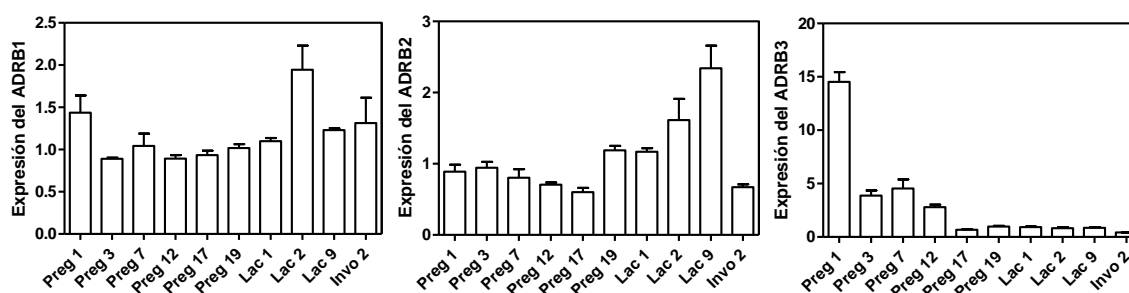


**Figura 16.** A. Inmunohistoquímica para EFRINA-B1 en glándula mamaria de ratones tratados con solución fisiológica (Control), fulvestrant (FULV) y ovariectomizados (OVX), tratados o no con Isoproterenol (Iso). B. Cuantificación de la inmunohistoquímica. C. Western blot para EFRINA-B1 de células MCF-10A luego de 24 hs de tratamiento con medio base (Control) o con Iso. Como control de carga se utilizó  $\beta$ -ACTINA. ANOVA seguido del test de Bonferroni, \*\*\* $p < 0.001$ .

### Estudio *in silico* de la expresión génica de los $\beta$ -RA en la glándula mamaria

Utilizando como herramienta un *dataset* de un *microarray* de glándula mamaria murina público y disponible en Gene Expression Omnibus Database (GSE8191) se evaluó la expresión de los genes que codifican para los tres subtipos de  $\beta$ -RA a distintos días de la preñez, lactancia y de la involución mamaria.

El estudio mostró un aumento progresivo de la expresión génica para el  $\beta_2$ -RA (ADRB2) hacia el fin de la preñez y durante la lactancia comparado con el día 1 de preñez (Fig. 17). En la involución, los valores se reestablecen a los niveles basales, sugiriendo una posible función fisiológica asociada al proceso de lactancia. Por otro lado, no se observaron diferencias en la expresión del gen del  $\beta_1$ -RA (ADRB1) en los diferentes momentos evaluados. El gen que codifica para el subtipo  $\beta_3$ -RA (ADRB3), disminuyó su expresión con el comienzo de la preñez (Fig. 17).



**Figura 17.** Expresión de los genes que codifican para los diferentes subtipos de  $\beta$ -RA a los días 1, 3, 7, 12, 17 y 19 de la preñez (Preg), los días 1, 2 y 9 de la lactancia (Lac) y el día 2 de involución (Invo). Datos extraídos de un *microarray* de glándula mamaria murina público y disponible en Gene Expression Omnibus Database (GSE8191).

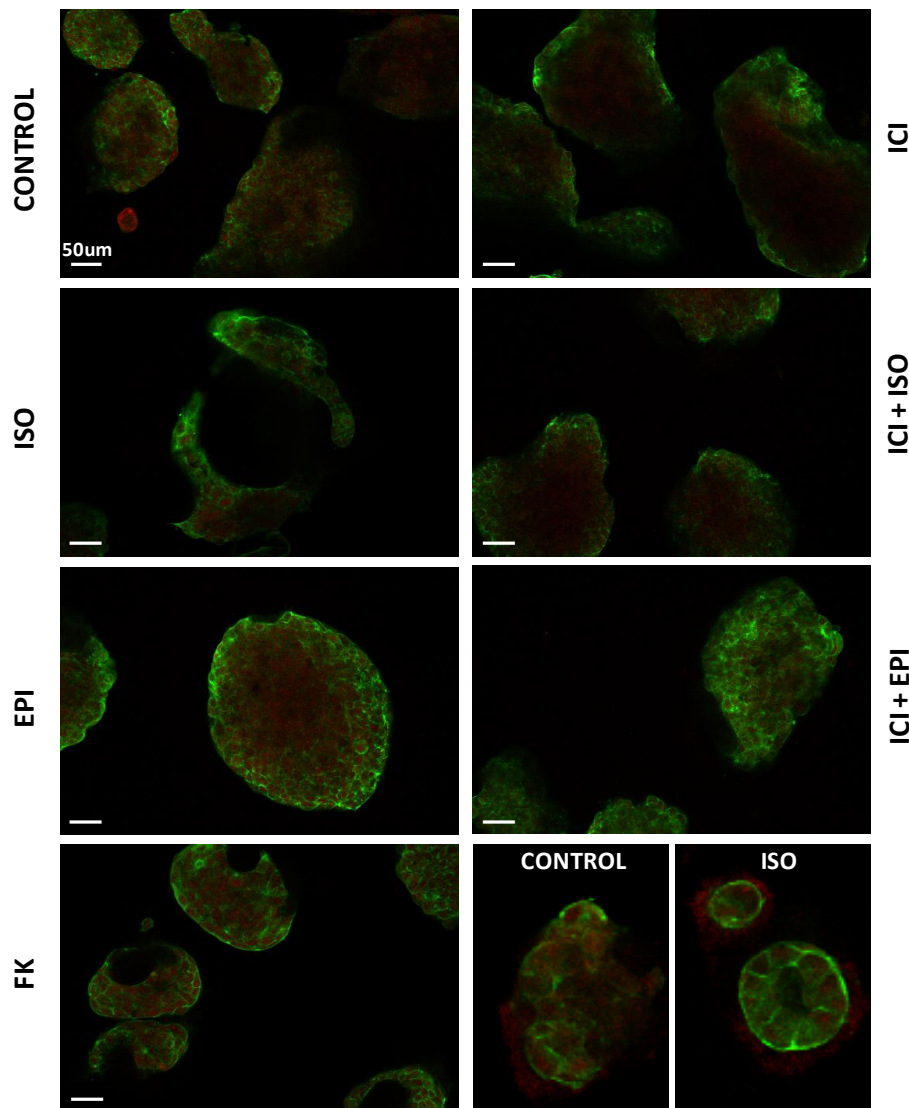
### Efecto de la activación $\beta$ -adrenérgica en modelos tumorales de mama

#### Modelo *in vitro* - Cultivo celular en 3D

Los resultados hasta aquí demuestran un efecto diferenciante mediante la activación de los  $\beta$ -RA en dos modelos normales de glándula mamaria. Con el fin de determinar si este efecto es trasladable a un modelo tumoral, se evaluó el efecto de la activación  $\beta$ -adrenérgica en la línea tumoral de mama humana MCF-7 creciendo en



cultivo 3D (Fig. 18). En condiciones control, las células formaron estructuras esféricas, sólidas y poco organizadas. El tratamiento con Iso durante 15 días indujo la formación de estructuras con un fenotipo polarizado y el desarrollo de un lumen incipiente. Por el contrario, luego de la estimulación con Epi, las células se organizaron en esferoides o *clusters* sólidos no polarizados y de mayor tamaño. Este fenotipo, relacionado con un mayor crecimiento y ausencia de diferenciación, coincide con lo observado anteriormente en 2D, donde la Epi provoca un fenotipo más maligno en esta línea tumoral. Al igual que para las células MCF-10A, el tratamiento con FK provocó el mismo efecto que el Iso. Esto sugiere un efecto del agonista a través de la vía clásica del receptor. El efecto diferenciante del Iso sobre el cultivo 3D se revirtió en presencia del antagonista específico  $\beta_2$ -RA, ICI (Fig. 18). Por el contrario, dicho antagonista no fue capaz de revertir el efecto de la Epi, sugiriendo una acción principalmente vía  $\alpha_2$ -RA de la misma.

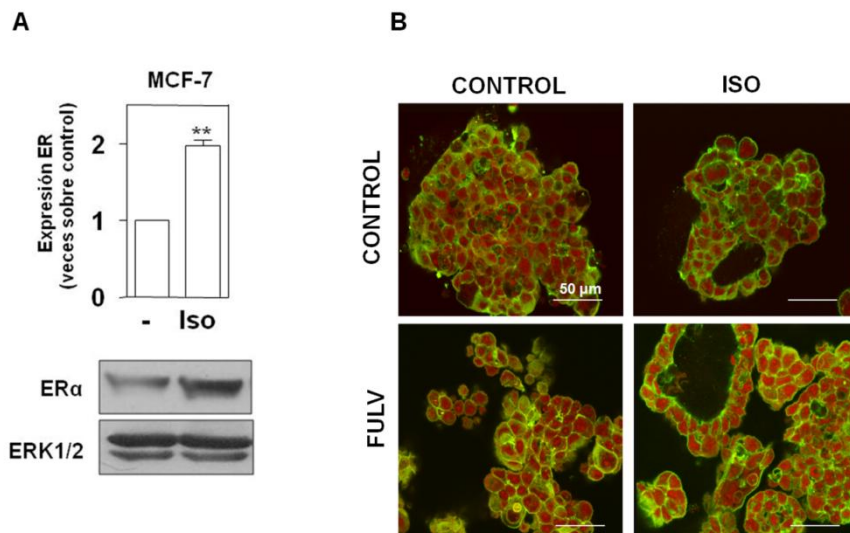


**Figura 18.** Imágenes de microscopía confocal de células MCF-7 creciendo en cultivo 3D. Las células fueron tratadas durante 15 días con medio base (control), con Isoproterenol  $1\mu\text{M}$  (Iso), epinefrina  $1\mu\text{M}$  (Epi), forskolina  $10\mu\text{M}$  (FK) en presencia o ausencia del antagonista ICI-118551  $10\mu\text{M}$  (ICI). Marcación de citoesqueleto de actina con faloidina (verde) y núcleos con yoduro de propidio.

A fin de comprender el mecanismo, y dado lo observado en mama normal, se evaluó mediante *western blot* la expresión del ER $\alpha$  en esta línea luego de la incubación con Iso. El tratamiento aumentó significativamente la expresión del receptor a las 24 hs ( $p < 0.01$ , Fig. 19 A).

Con el fin de determinar si el ER se encontraba mediando el efecto del Iso en cultivo 3D, se incubaron las células en presencia o ausencia de FULV. El Iso indujo el

desarrollo de lúmenes desarrollados aún en presencia de FULV (Fig. 19 B), demostrando el **efecto del Iso sobre la formación del lumen independiente de la presencia del ER también en el modelo tumoral.**



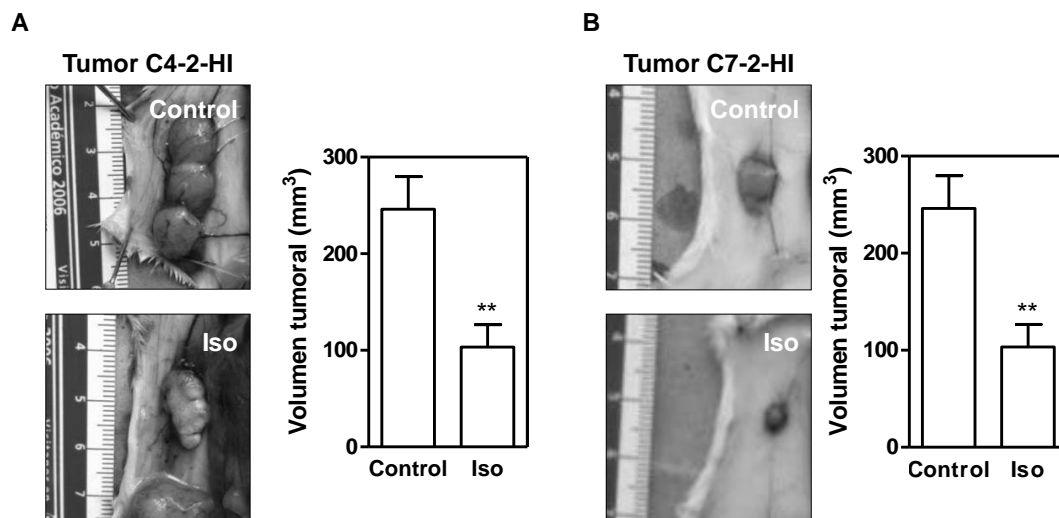
**Figura 19. A.** Western blot para ERα en la línea MCF-7 tratada con medio base (Control) o con isoproterenol (Iso, 1μM) durante 24 hs. Como control de carga se utilizó ERK1/2. **B.** Microscopía confocal de cultivo 3D de células MCF-7 en presencia o no de fulvestrant (FULV) y tratadas o no con Iso durante 15 días. Marcación del citoesqueleto de actina con faloidina (verde) y los núcleos con yoduro de propidio. Estadística: test t de Student. \*\*p<0.01.

### Modelo *in vivo* - Tumores murinos

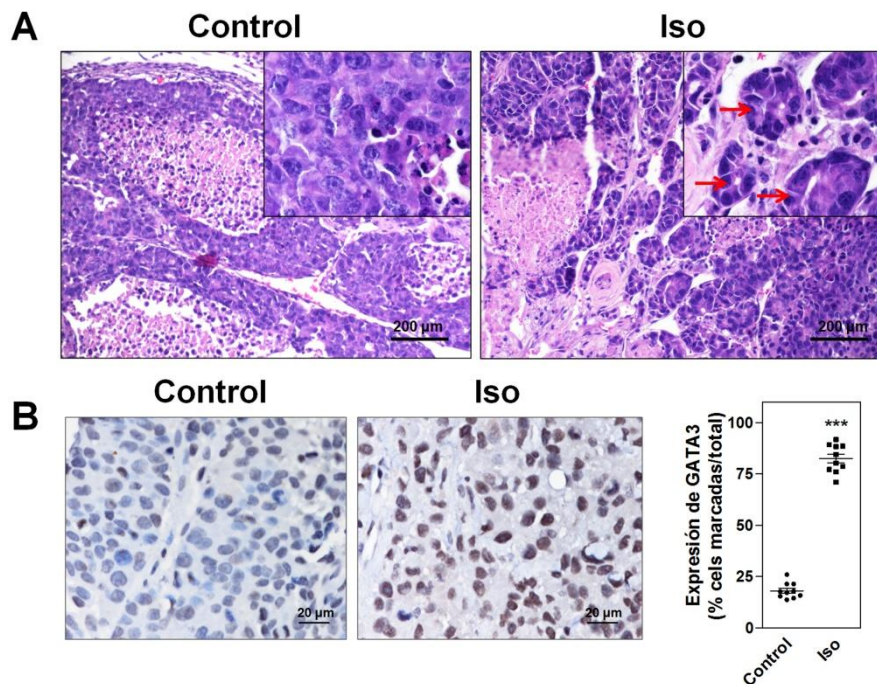
Se evaluó el efecto *in vivo* de la estimulación β-adrenérgica sobre dos modelos murinos tumorales de mama. Se utilizaron dos carcinomas ductales que expresan ER y PR, los tumores C4-2-HI y C7-2HI. El tratamiento con Iso 1mg/Kg/día durante 25 días redujo el volumen tumoral significativamente en ambos tumores (Fig. 20A y B).

En el análisis histológico del tumor C4-2-HI se observó que la estimulación β-adrenérgica indujo la diferenciación del tumor, promoviendo la formación de estructuras ductales bien definidas (Fig. 21 A, Flechas). Se evaluó además la expresión del factor de transcripción GATA3, involucrado en el desarrollo mamario. Se ha

descrito que su expresión se pierde con la progresión tumoral (Chou *et al.*, 2010). El tratamiento con Iso aumentó significativamente la expresión de GATA3 nuclear ( $p < 0.001$ ) (Fig. 21 B). Al evaluar el corte del tumor C7-2-HI no se encontraron diferencias histológicas luego del tratamiento con respecto al control (datos no mostrados).



**Figura 20.** Efecto del tratamiento con Isoproterenol (Iso) sobre el volumen tumoral de los tumores mamarios murinos C4-2-HI (A) y C7-2-HI (B). Los valores corresponden al volumen tumoral a los 25 días de tratamiento. Estadística: test t de Student. \*\* $p < 0.01$ .



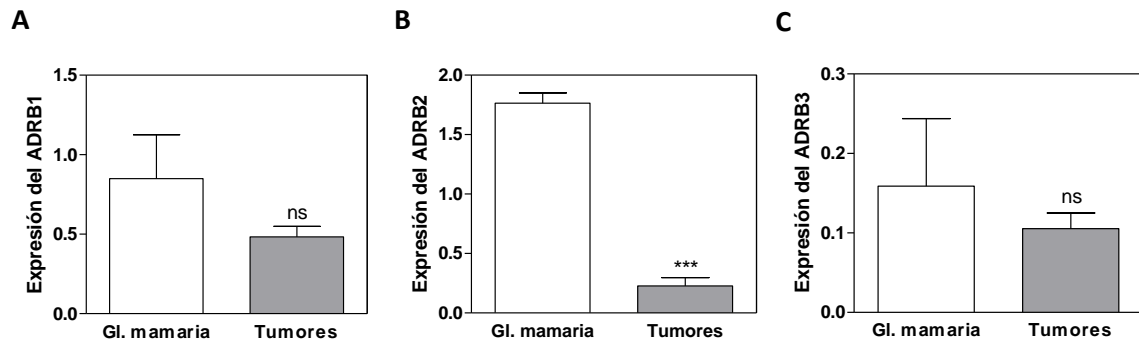
**Figura 21. A.** Cortes histológicos del tumor C4-2-HI teñidos con hematoxilina-eosina de ratones tratados con solución fisiológica (Control) y tratados con isoproterenol (Iso). Las flechas rojas marcan los esbozos ductales inducidos por el tratamiento. **B.** Expresión por inmunohistoquímica del factor de transcripción GATA3 en este tumor y a la derecha su cuantificación. Estadística: test t de Student, \*\*\* $p < 0.001$ .

### Estudio *in silico*. Comparación de la expresión génica de los $\beta$ -RA en glándula mamaria y tumores murinos

Con el fin de complementar los resultados anteriores, se estudió la expresión de los genes que codifican para los tres tipos de  $\beta$ -RA en glándula mamaria murina con respecto a tumores murinos. En este caso se utilizó un *dataset* de un *microarray* de muestras de glándula mamaria murina de dos cepas de ratones BALB/c y FVB y de distintos tumores murinos de estas mismas cepas. Estos datos públicos se encuentran disponibles en Gene Expression Omnibus Database (GSE3165).

Se observó una disminución significativa para el gen que codifica para el  $\beta_2$ -RA ADRB2 en los tumores respecto al tejido mamario normal (Fig. 22 B,  $p < 0.001$ ). No se

observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del ADRB1 y ADRB3 entre la glándula mamaria normal y los tumores (Fig. 22 A y C).



**Figura 22.** Niveles de expresión de ADRB1 (A), ADRB2 (B) y ADRB3 (C) en glándula mamaria normal murina y en distintos tumores mamarios murinos. Datos extraídos de un microarray público y disponible en Gene Expression Omnibus Database (GSE3165). Estadística. Test t de Student o Test no paramétrico de Mann Whitney. \*\*\* $p < 0.001$ .

Los resultados mostrados hasta aquí indican **un efecto diferenciante del Iso también en un contexto tumoral, tanto en células MCF-7 en cultivo como en el tumor mamario murino C4-2-HI**. Asimismo, **los resultados in silico refuerzan la hipótesis del rol del receptor  $\beta_2$ , asociando una baja expresión del mismo a un fenotipo tumoral**.

Páginas 81 a 93 eliminadas a pedido del autor.

# Discusión



## Capítulo I

En respuesta a desafíos ambientales, psicológicos o fisiológicos que alteran la homeostasis del organismo, se liberan concentraciones micromolares de NE en tejidos blanco y Epi al torrente sanguíneo (Cole *et al.*, 2012; Daly *et al.*, 2011). Estas catecolaminas, a través de su unión a los RA expresados en la mayoría de los tejidos, regulan funciones celulares básicas como proliferación, diferenciación, contacto célula-célula, liberación de mediadores solubles e inmunes (Hein, 2006; Tang *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la liberación de Epi y NE tiene un severo impacto en las vías asociadas a la progresión tumoral y la metástasis en diversos modelos, a través de un efecto directo sobre el tumor o sobre el microambiente tumoral (Antoni *et al.*, 2006; Armaiz-Pena *et al.*, 2009; Entschladen *et al.*, 2004; Goodwin *et al.*, 2010; Lutgendorf *et al.*, 2010; Thaker *et al.*, 2007).

La presencia de RA ha sido descrita en los tumores más frecuentes de la población, como es mama, próstata, colon y pulmón (Al-Wadei *et al.*, 2006; Palm *et al.*, 2006; Vandewalle *et al.*, 1990; Vazquez *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007). El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres y se encuentra entre las primeras causas de defunción por esta enfermedad (Ferlay *et al.*, 2015).

Existen numerosos trabajos que sugieren que eventos traumáticos o estresantes pueden incrementar el riesgo de padecer cáncer de mama. Si bien no existe evidencia robusta de una asociación independiente entre dichos eventos y el cáncer de mama, numerosos estudios sugieren que el apoyo social y eventos calificados como “amenazantes” interaccionan aumentando el riesgo del desarrollo de la enfermedad. Se ha descrito que las mujeres que experimentan estos eventos estresantes sin apoyo social poseen nueve veces mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Price *et al.*, 2001). Chida *et al.*, en un trabajo de revisión usando meta-análisis, encuentran que el estrés, como así factores psico-sociales relacionados a éste, influyen en la incidencia, sobrevida y mortalidad por cáncer. Sugieren también que estos factores tienen un impacto lento pero acumulativo sobre el cáncer. Entre los factores se encuentran, muerte del conyugue o pariente cercano, personalidades propensas al estrés o aquellas con dificultad para afrontar situaciones problemáticas, angustia

emocional y depresión. Todas se asociaron con la incidencia, la sobrevida y la mortalidad por cáncer (Chida *et al.*, 2008). Particularmente en mama, un trabajo reciente describe que eventos estresantes de los últimos 5 años tienen un efecto negativo en el riesgo de cáncer de mama y sugiere que el apoyo social podría no sólo ser de suma importancia antes del diagnóstico, sino también en el período posterior al mismo (Yildirim *et al.*, 2018). Sin embargo, muchos de estos factores psicosociales se encuentran asociadas con conductas que se cree están asociadas al riesgo de cáncer de mama, sumando confusión y complejidad a este tipo de estudios. Así, la depresión lleva a conductas como tabaquismo, dieta inadecuada, falta de ejercicio, obesidad, alcoholismo, insomnio, o poca adherencia a los tratamientos.

A pesar de que en los últimos años se han estudiado ampliamente los RA como mediadores de la respuesta al estrés y la evolución del cáncer de mama, el rol específico de éstos en cáncer no ha sido dilucidado completamente. Nuestro laboratorio ha contribuido de manera significativa en la descripción de los RA en diferentes modelos de cáncer de mama (Bruzzone *et al.*, 2011; Bruzzone *et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2012; Rivero *et al.*, 2017; Vazquez *et al.*, 2006; Vazquez *et al.*, 1999). En dichos trabajos demostramos que la estimulación de los  $\alpha_2$ -RA provoca un aumento de la proliferación celular *in vitro* y un aumento del crecimiento tumoral *in vivo*. Sin embargo, el rol de los  $\beta$ -RA en cáncer de mama ha sido más controversial, ya que algunos autores han demostrado que la estimulación de los  $\beta$ -RA puede inhibir la proliferación celular (Carie *et al.*, 2007; Slotkin *et al.*, 2000) mientras que otros describen efectos proliferativos (Cakir *et al.*, 2002; Re *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 2011; Thaker *et al.*, 2006). En nuestros resultados siempre encontramos una asociación entre la estimulación de los  $\beta$ -RA y la disminución de la proliferación celular y del crecimiento tumoral (Gargiulo *et al.*, 2014; Perez *et al.*, 2012).

En relación a esto, se ha demostrado que las diferencias entre los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos utilizados podrían contribuir a la heterogeneidad de respuestas encontradas en las células mamarias (Madden *et al.*, 2011; Pon *et al.*, 2016). Por otro lado, es también posible que el efecto directo de la señalización  $\beta$ -RA sobre el

microambiente tumoral explique las diferencias encontradas entre los estudios *in vivo* e *in vitro* (Sloan *et al.*, 2010).

La inervación adrenérgica de la glándula mamaria normal ha sido descrita en ratas y cerdos (Morales *et al.*, 2001), como así también en bovinos, en este caso por el interés farmacológico de los mismos en la regulación de la producción y extracción de leche (Gow *et al.*, 2003; Hammon *et al.*, 1994; Roets *et al.*, 1985a). En cerdos, esta inervación alcanza principalmente la zona del pezón, tejido subcutáneo, vasos sanguíneos, fibras musculares, como así también tejido glandular (Franke-Radowiecka *et al.*, 2002). Con respecto a modelos tumorales de mama, se ha descrito una inervación de fibras nerviosas simpáticas en tumores ortotópicos y espontáneos murinos (Szpunar *et al.*, 2016). A diferencia de lo que ocurre para otros tumores sólidos, esta inervación en tumores de mama presenta una distribución limitada a la región periférica, sugiriendo que la liberación de NE podría estar regulando también la entrada de células estromales en el tumor más allá de la actividad tumoral en un área altamente localizada. Estos autores sugieren que en humanos existiría un mecanismo similar de inervación periférica en tumores de mama, ya que en biopsias no lograron detectar fibras en el interior de los tumores. En modelos murinos, se observó que esta inervación es la fuente del 50% de la NE de los tumores mamarios y se sugiere que es el microambiente tumoral el que regula la liberación y disponibilidad de catecolaminas inducida por el estrés (Szpunar *et al.*, 2016).

Dada la inervación de la glándula mamaria y de los tumores, y la presencia de RA en estos modelos, resulta tentador especular sobre un rol del sistema adrenérgico como regulador de procesos fisiológicos y tumorales. Las células tumorales y no tumorales expresan tanto receptores  $\alpha_2$  como  $\beta$ -RA adrenérgicos. La Epi liberada durante el estrés, se une a estos receptores con la misma afinidad (Xhaard *et al.*, 2006). En este trabajo se utilizó como catecolamina endógena Epi, ya que se une preferencialmente al  $\beta_2$ -RA, siendo el principal subtipo de los  $\beta$ -RA expresado en células tumorales y no tumorales de mama. La NE se une preferencialmente al subtipo  $\beta_1$  (Alexander *et al.*, 2017; Luthy *et al.*, 2009; Vandewalle *et al.*, 1990). En resultados previos a esta tesis, observamos una respuesta diferencial a la Epi entre las líneas

tumorales y no tumorales de mama humana. En las células no tumorales, MCF-10A y HBL-100, la Epi indujo un fenotipo benigno incrementando la adhesión y disminuyendo la proliferación y migración. En cambio, en los modelos tumorales, MCF-7 y MDA-MB-231, la Epi provocó un comportamiento más agresivo, aumentando la migración y proliferación celular. En relación a esto, demostramos que la expresión del  $\beta$ -RA en las MCF-7 es modesta en relación a la alta expresión encontrada en la línea MCF-10A (Gargiulo *et al.*, 2014).

Las líneas celulares de cáncer de mama humana son el modelo más utilizado para el estudio de la fisiopatología de muchos tipos de cáncer (Lacroix *et al.*, 2004). Han brindado información sobre el comportamiento biológico celular, de los genes y de los mecanismos de señalización involucrados en la oncogénesis. También han sido utilizadas para ensayos de sensibilidad a agentes antineoplásicos. Cabe destacar que las líneas celulares establecidas, aunque provengan de un tejido sano, no pueden considerarse líneas “normales”, debido a su capacidad indefinida de auto-replicación. La denominación correcta es línea “no tumoral”. Existen pocas líneas provenientes de mama humana consideradas no tumorales, entre ellas las MCF-10A y HBL-100 y son las que se utilizan como referencia o aproximación de lo que ocurre en la mama normal. En este trabajo se trabajó con la línea MCF-10A. Ésta es una línea celular espontáneamente inmortal obtenida de un quiste mamario proveniente de una mujer pre-menopáusica (Soule *et al.*, 1973). Esta línea celular tiene características similares al epitelio mamario normal según los siguientes criterios: (a) falta de tumorigenicidad en ratones inmunodeprimidos; (b) crecimiento tridimensional en colágeno; (c) su crecimiento en cultivo es controlado por hormonas y factores de crecimiento; (d) ausencia de crecimiento independiente de anclaje y (e) formación de cultivos confluentes. El análisis citogenético previo a la immortalización mostró células normales diploides, aunque en pasajes posteriores se encontraron rearrreglos mínimos (Soule *et al.*, 1973). A diferencia de estas líneas, la línea HBL-100, descrita como no tumoral, se aisló originalmente de la leche de una mujer sana (Gaffney, 1982). Sin embargo exhibe ciertas características de transformación desde el principio y se desarrolla hasta volverse tumorigénica en ratones nude. Como modelos tumorales, las líneas MCF-7, T-47D y MDA-MB-231 son las líneas más utilizadas en los trabajos en

oncología (más de dos tercios de las publicaciones hacen referencia a estudios en estas líneas). La línea MCF-7, es una línea tumoral de mama humana, obtenida a partir de una efusión pleural. Las células MCF-7 retienen diversas características del epitelio mamario. Poseen morfología poligonal, expresión del ER $\alpha$  y tienen la capacidad de formar domos (Soule *et al.*, 1973). Estas células, desarrolladas en la Michigan Cancer Foundation, se convirtieron en el modelo clásico del estudio del cáncer de mama hormono-dependiente en centenares de laboratorios alrededor del mundo y contribuyeron al conocimiento de la replicación regulada por hormonas y de la terapia hormonal para el cáncer de mama (Levenson *et al.*, 1997). Esta línea MCF-7 es modelo para el tipo de cáncer luminal, que representa al 70% de los tumores observados en la clínica (Neve *et al.*, 2006). En resumen, tanto la línea MCF-10A como la línea MCF-7, se consideran buenos modelos celulares para representar el epitelio “normal” y el tumoral respectivamente.

Para estudiar en profundidad el efecto de los niveles de expresión del  $\beta_2$ -RA sobre el fenotipo celular, sobreexpresamos o silenciamos de manera eficiente este receptor en la línea tumoral (MCF-7) y en la línea no tumoral (MCF-10A). Como se demostró, el silenciamiento del  $\beta_2$ -RA en ambas líneas causó un fenotipo más agresivo, mientras que su sobreexpresión indujo un fenotipo benigno. Es importante destacar que la modulación de los niveles de expresión del  $\beta$ -RA (sin estímulo) provocan un cambio en el comportamiento celular, demostrando una actividad basal del receptor. Este efecto se debe a que el receptor es capaz de unirse a la proteína Gs en ausencia de ligando. Esta propiedad ha sido descrita para el receptor  $\beta_2$ -RA y para numerosos GPCRs (Rasmussen *et al.*, 2007). Sin embargo, en estas condiciones basales no logramos observar cambios detectables en los niveles de AMPc en las células MCF-10A. Esto podría deberse a la compartimentalización de la señal del AMPc. De hecho, se ha descrito que la proximidad de fosfodiesterasas al sitio de producción de AMPc restringe la diseminación del segundo mensajero a través de toda la célula (Cheepala *et al.*, 2013). Más aun, se ha observado que la estimulación del  $\beta_1$ -RA induce un gradiente de AMPc que se propaga por la célula entera, mientras que la estimulación del  $\beta_2$ -RA no logra gatillar esta difusión de AMPc (Nikolaev *et al.*, 2006). Por otro lado, las técnicas clásicas de medición de AMPc poseen una baja resolución temporo-

espacial y probablemente no logren cuantificar cambios discretos en la producción de AMPc en compartimentos celulares específicos. Considerando esto, pequeños cambios en los niveles de AMPc en las células MCF-10A que ocurren en compartimentos específicos, podrían trasladarse en cambios importantes observados como efectos biológicos. Sin embargo, en la línea MCF-7 la sobreexpresión del receptor lleva a un aumento de AMPc de los niveles basales y luego de la estimulación.

Los resultados obtenidos refuerzan la importancia del  $\beta_2$ -RA como regulador de procesos asociados a la progresión tumoral. Hipotetizamos que los niveles de expresión de este receptor son en parte responsables del comportamiento diferencial ante la Epi entre las líneas tumorales y no tumorales. En este contexto, encontramos que el silenciamiento del  $\beta_2$ -RA en la línea no tumoral, convierte la respuesta ante la Epi en una típica respuesta tumoral (direccionada hacia la respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica). En contraste, en células MCF-7 que sobreexpresan el  $\beta_2$ -RA, la Epi induce la típica respuesta de las líneas no tumorales, revirtiéndose el comportamiento agresivo. Conjuntamente, en los estudios *in silico* encontramos que la pérdida de expresión del receptor  $\beta_2$ -RA se correlaciona con un fenotipo maligno. Estos resultados demuestran la importancia del  $\beta_2$ -RA como modulador del comportamiento celular benigno en mama. En línea con nuestros resultados, un análisis realizado a partir de 750 biopsias de diferentes tumores mamarios humanos, describe que los tumores más agresivos y con peor pronóstico presentan una alta expresión de receptores  $\alpha_2$ -RA, mientras que los  $\beta$ -RA se expresan principalmente en tumores más benignos y con mejor pronóstico (Powe *et al.*, 2011b).

Los cultivos tridimensionales resultan de gran utilidad en el estudio de la glándula mamaria normal y tumoral, ya que las células epiteliales mamarias en estos cultivos son capaces de recapitular características del epitelio mamario *in vivo* (Debnath *et al.*, 2005). El epitelio mamario posee una histología característica, como una morfología polarizada, contactos celulares especializados y unión a membrana basal. Éstas aseguran un correcto control de la proliferación celular, supervivencia, diferenciación y secreción (Bissell *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2002; Rodríguez-Boulan

*et al.*, 1989). Esta estructura se corrompe durante la patogénesis. De hecho, por décadas, los patólogos han evaluado los cambios estructurales del epitelio tanto para el diagnóstico como para la clasificación tumoral. La presencia del lumen ha sido asociada con estructuras más desarrolladas (Debnath *et al.*, 2003; Inman *et al.*, 2010). De hecho, se ha descrito que las células tumorales no forman acinos en cultivo 3D, sino *clusters* no polarizados con una limitada diferenciación (Petersen *et al.*, 1992). En nuestros experimentos, tanto en líneas no tumorales como tumorales la estimulación de los  $\beta$ -RA causó un efecto diferenciante en las estructuras acinares y tubulares formadas por las células MCF-10A y en los *clusters* de células MCF-7. Además, la estimulación con Fk reprodujo los efectos del Iso, sugiriendo un efecto mediado por la vía del AMPc, la vía clásica de señalización  $\beta$ -adrenérgica. En línea con esto, Nedvetsky *et al.* asocia un aumento de AMPc con la formación de lumen en células MCF-10A creciendo en cultivo 3D. Esto ocurre por mecanismos coordinados que incluyen polarización de células y apoptosis de las células internas para la formación del lumen. Este proceso depende de la activación de PKA y de la inhibición de la vía de ERK. Interesantemente, los autores plantean que la señalización deficiente de AMPc y PKA podría contribuir a la carcinogénesis, ya que la pérdida de polaridad y la resistencia a la apoptosis son puntos claves en este proceso (Nedvetsky *et al.*, 2012).

Un punto interesante a observar, es que la Epi en estos modelos de cultivo 3D se comporta de la misma manera que lo hace en las líneas en cultivos 2D. Así, induce un fenotipo benigno en la línea no tumoral (desarrollo de lumen y túbulos) mientras que en la línea MCF-7, la incubación con Epi provoca el desarrollo de *clusters* de mayor tamaño sin ningún tipo de diferenciación.

En dichos experimentos, se utilizó el antagonista ICI-118551 para corroborar que el efecto sea mediado por el  $\beta_2$ -RA. La elección de este antagonista en vez del conocido antagonista Prop, se debe a que este último ha sido descrito como agonista sesgado (van der Westhuizen *et al.*, 2014). Asimismo, en nuestro grupo hemos observado un agonismo parcial en ciertos parámetros *in vivo* (Perez *et al.*, 2012). Por otro lado, el ICI tiene una mayor afinidad por el subtipo  $\beta_2$ -RA que por los subtipos  $\beta_1$  y  $\beta_3$ -RA (Vrydag *et al.*, 2007), mientras que el Prop se ha clasificado como

“antagonista” no selectivo, principalmente para el subtipo  $\beta_1$  y  $\beta_2$ -RA (Alexander *et al.*, 2017). El ICI fue capaz de bloquear el efecto del Iso, demostrando la participación del subtipo  $\beta_2$ -RA en la inducción de la diferenciación en cultivos 3D por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

En base a la acción diferenciante observada *in vitro* en las células mamarias se estudió el efecto de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica sobre la glándula mamaria murina. Estudios previos han demostrado que la diferenciación de la glándula mamaria se encuentra asociada a una reducción en el riesgo de cáncer de mama. Durante el parto y posterior lactancia, la glándula mamaria completa su desarrollo y maduración, reduciendo la susceptibilidad de las células a la transformación maligna. Ha sido descrito que el embarazo a término es capaz de inhibir la iniciación carcinogénica a través de la inducción de la diferenciación (Russo *et al.*, 2004). Como ya se mencionó, la mayor parte del desarrollo de la glándula mamaria ocurre durante el periodo posnatal. Antes del nacimiento, los ductos rudimentarios invaden la almohadilla mamaria, y esta estructura se mantiene quiescente hasta los 21 días de edad. Este momento concuerda justamente con el período de destete de los animales. Entre las semanas 6 y 8, los ovarios comienzan a secretar hormonas (pubertad) y comienza la fase de crecimiento ductal activo, que continua hasta las 10-12 semanas de edad, cuando los TEBs alcanzan los límites de la almohadilla mamaria. Con cada ciclo estral, la glándula mamaria se ramifica formando BA, que sufrirán su diferenciación definitiva solo cuando ocurra el proceso de gestación y lactancia (Richert *et al.*, 2000). En base a esto, se eligieron tres estadios diferentes para estudiar el efecto de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica sobre la glándula mamaria. Se utilizaron ratones de destete, púberes y de 20 semanas de edad (adultos), con el fin de abarcar distintos estadios del desarrollo mamario.

El aumento en la ramificación mamaria inducida por Iso se observó en ratones de destete y púberes, pero no en ratones adultos. Esto puede explicarse porque en estos ratones los ductos ya lograron alcanzar los bordes de la almohadilla mamaria. Es lógico pensar que cuando se alcanzan estos límites, se disparen mecanismos inhibitorios de la elongación de los mismos. Si bien la regulación exacta se desconoce,



se ha descrito que el proceso de *branching* se detiene una vez que la almohadilla de grasa se completa. Esta inhibición involucra la producción y activación de TGF $\beta$  endógeno y se encuentra regulado por señales locales asociadas a la arquitectura glandular (Macias *et al.*, 2012). Si bien en el análisis histológico observamos la aparición de estructuras ductales nuevas, a nivel de *whole mount* no se observaron diferencias como en los otros estadios. Estos resultados demuestran que el Iso estaría acelerando el desarrollo ductal mamario.

Un punto interesante a destacar es que el *branching* inducido por Iso no mostró características morfológicas anormales. En la glándula mamaria, las anomalías como las displasias y las hiperplasias pueden detectarse con facilidad (Ethier *et al.*, 1982) y no se observaron en las glándulas de los ratones tratados. Asimismo, la estimulación  $\beta$ -adrenérgica no interfirió en la funcionalidad de las glándulas mamarias de los ratones tratados.

Bajo la influencia del Iso, además del marcado efecto observado en el *branching*, se encontró un incremento de la diferenciación de estructuras del compartimiento estromal. Se observó un efecto notable en la maduración de los adipocitos de los ratones de destete pero no de los púberes. Esto puede deberse a que en los ratones púberes los adipocitos de la glándula mamaria ya son maduros. El Iso estaría acelerando la maduración de los preadipocitos a adipocitos. En relación a esto, ha sido descrito que el tejido adiposo pardo que se observa en la glándula mamaria de los neonatos (Hovey *et al.*, 2002) regula negativamente la diferenciación de las células epiteliales durante el crecimiento ductal previo a la pubertad (Gouon-Evans *et al.*, 2002). Por lo que la disminución de este tejido adiposo inmaduro y la aparición de adiposo maduro, estimularía la diferenciación de las células epiteliales de los ductos, explicando en parte el efecto del Iso sobre la ramificación ductal. En base a estos resultados podemos proponer que la estimulación  $\beta$ -RA induce el desarrollo y la maduración de las estructuras epiteliales y estromales mamarias.

La estimulación de los  $\beta_2$ -RA, con el agonista específico Salb, indujo el *branching* de ratones púberes al igual que el Iso, el cual estimula todos los  $\beta$ -RA, incluidos los  $\beta_3$ -RA que se expresan principalmente en tejido adiposo. El Salb no tuvo efecto en la

maduración de los adipocitos en los ratones de destete, probablemente debido a un rol protagónico del receptor  $\beta_3$  en dicho efecto. En línea con esto, si bien se observó una tendencia, el aumento de la ramificación en ratones de destete luego del tratamiento con Salb no resultó significativo. Esto podría deberse a la importancia de la maduración del estroma en la inducción del *branching* en este estadio. En tal sentido, la importancia del estroma en el desarrollo mamario y su función fue propuesta más de tres décadas atrás (Williams *et al.*, 1983). Modelos quiméricos demostraron la capacidad del estroma en influenciar el desarrollo del epitelio. La recombinación de epitelio mamario con estroma de glándula salival provoca estructuras semejantes al epitelio de esta glándula (Sakakura *et al.*, 1976). Estos estudios revelaron que el componente epitelial es sumamente maleable y el destino celular y la función tisular se encuentran fuertemente influenciados por el componente estromal de la glándula. Más aún, en un modelo tumoral mamario murino donde el desarrollo de los tumores imita las etapas clínicas del desarrollo de cáncer de mama humano se observó inervación simpática entre los adipocitos en estadios premalignos (Szpunar *et al.*, 2016). Este trabajo sugiere que mediante la inervación del tejido adiposo mamario, las catecolaminas regulan los adipocitos y el metabolismo del tejido adiposo mamario, modulando la progresión tumoral temprana.

Los estudios *in silico* realizados de glándula mamaria de ratones demostraron un aumento de la expresión del  $\beta_2$ -RA asociado a etapas tardías de la preñez y a la lactancia. Este aumento se revierte en el período de involución. Este descubrimiento sugiere un rol adicional del receptor en la lactancia. Sin embargo, debería realizarse un estudio comparativo con estadios previos a la gestación, ya que esos datos no se encuentran disponibles en el *dataset* utilizado. Cabe destacar que se observa una disminución significativa del subtipo  $\beta_3$ -RA al tercer día de embarazo con respecto al primero, la cual se mantiene durante la toda la preñez y lactancia. Esto se debe probablemente, a que los *datasets* utilizados contienen la información de ARNm obtenidos a partir de glándulas mamarias completas, es decir que contienen la información del componente epitelial y estromal. Los adipocitos expresan gran cantidad de  $\beta_3$ -RA y componen el 90% de la glándula mamaria de los ratones hembra

vírgenes. Con la preñez este porcentaje se invierte, el epitelio mamario se desarrolla en detrimento del estroma. Por lo tanto, en dichos estadios la proporción de adipocitos es baja y podría ser la causa de la disminución de este subtipo.

En concordancia con nuestros resultados, numerosos reportes han demostrado que estresores psicosociales en etapas tempranas de la vida producen cambios moleculares y morfológicos que se observan posteriormente en la glándula mamaria de ratones adultos (Boyd *et al.*, 2010; Hermes *et al.*, 2009). Se observó que el estrés causado por la separación materna en ratones recién nacidos, provoca una aceleración del desarrollo de la glándula mamaria, induciendo la maduración de TEBs y aumentando el *branching* mamario (Boyd *et al.*, 2010). En línea con esto, otro trabajo asoció el aislamiento social de ratones durante 14 días con un número menor de estructuras pre-TEB y un menor riesgo posterior de desarrollar tumores mamarios (Hasen *et al.*, 2010).

Asimismo, un trabajo realizado con implantes de pellets de toxina colérica demostró que el incremento local de los niveles de AMPc estimula la morfogénesis ductal en ratones C57 ovariectomizados (Silberstein *et al.*, 1984). Otro dato que sugiere la importancia de la vía del AMPc como regulador del desarrollo mamario incluye a la señal parácrina entre la proteína asociada a la hormona paratiroidea (PTHrP) del epitelio mamario embrionario y su receptor PTHR1 en el estroma adyacente, que señala vía la producción de AMPc. Ambos receptores son necesarios para formar el sistema de ductal rudimentario (Wysolmerski *et al.*, 1998). El  $\beta$ -RA podría estar imitando el efecto de dicho receptor mediante la producción de AMPc. De hecho, Silberstein *et al.* sugieren en su trabajo que el incremento local de los niveles de AMPc estimula la morfogénesis ductal operando a través de una vía morfogénica normal, y que el AMPc podría reemplazar los requerimientos hormonales normales para este tipo de desarrollo. A diferencia de este trabajo, en nuestro modelo, el Iso es incapaz de inducir el *branching* mamario en ratones ovariectomizados. Sin embargo, nuestros resultados permiten descartar al PR como mediador de los efectos del Iso sobre el *branching* mamario. Esto a su vez concuerda con las funciones descritas para este receptor en la ramificación lateral y la

alveologénesis durante la preñez, formando una glándula competente para la lactancia (Briskin *et al.*, 1998). Además, se describió que el crecimiento de los ductos mamarios de los ratones PRKO durante la pubertad se encuentra retrasado pero no inhibido (Briskin *et al.*, 1998), indicando que el PR no es totalmente esencial para el *branching* de la glándula mamaria en estadios tempranos.

Por el contrario, demostramos que la presencia del ER y su señalización es esencial para el efecto del Iso sobre la ramificación mamaria. Numerosos trabajos describen el rol esencial del ER $\alpha$  epitelial en la elongación ductal (Mallepell *et al.*, 2006). Sorprendentemente encontramos que el Iso es capaz de inducir el *branching* mamario en ratones de destete, un momento en el desarrollo donde se considera que la función ovárica es nula o despreciable, y por ende los niveles hormonales también. La bibliografía no es concluyente respecto a los niveles de estrógenos en los distintos momentos del desarrollo. Según datos encontrados, los ratones llegan a la pubertad alrededor del día 31, no obstante, entre los 23 y 35 días de edad se incrementan los niveles circulantes de estrógenos (Nelson *et al.*, 1990). Por otro lado, el Iso podría estar estimulando la maduración ovárica y acelerando la madurez sexual, aumentando los niveles de estrógenos en sangre. En relación a esto, se ha descrito que el agonista  $\beta_2$ -adrenérgico fenoterol estimula la secreción ovárica de progesterona y estradiol en rata. Se sugiere que los  $\beta_2$ -RA expresados en ovario tienen un rol regulatorio en la secreción de hormonas ováricas (Zsolnai *et al.*, 1982). Más aún, otro trabajo demuestra que la estimulación adrenérgica de los  $\beta_2$ -RA expresados en ovarios inmaduros inducen la liberación de esteroides, sugiriendo que el sistema adrenérgico se encuentra involucrado en la iniciación de la función ovárica en adultos (Aguado *et al.*, 1982). Actualmente, estamos evaluando posibles técnicas que nos permitan medir los niveles de estrógenos en ratones de destete control y tratados con Iso. Por otro lado, los ovarios de estos animales fueron extraídos a fin de determinar cambios histológicos relacionados con la función ovárica y dilucidar el mecanismo mediante el cual el Iso ejerce su efecto en ratones de destete. Estos ovarios están procesados pero aún no han sido analizados. Un efecto del Iso sobre la función ovárica explicaría también la diferencia en la inducción del *branching* que ocurre entre los ratones de destete pero no en los OVX. Asimismo, el efecto del Iso observado en las glándulas

mamarias de los ratones de destete, podría ser en parte un efecto indirecto de la aceleración de la madurez sexual.

En relación al efecto de la activación  $\beta$ -adrenérgica sobre el *branching*, se encontró que el Iso aumentó la expresión de EFRINA-B1 de manera dependiente del ER. Anteriormente, se le ha propuesto un rol regulatorio a EFRINA-B1 en el desarrollo mamario (Davy *et al.*, 2004; Kouros-Mehr *et al.*, 2006). La localización de dicha proteína concuerda con lo descrito y refuerza los resultados que demuestran un aumento de los ductos maduros y por ende, de la expresión de EFRINA-B1 luego del tratamiento con Iso.

Una observación interesante en el presente trabajo es la capacidad del Iso de modular la expresión de miembros de la familia de factores de crecimiento fibroblásticos, FGFR2, FGF2 y FGF10. Estos se encuentran involucrados en el desarrollo del *branching* mamario y si bien otros FGFs son expresados en la glándula, estos dos factores y el receptor son sumamente importantes en el desarrollo que ocurre durante la pubertad, regulando distintos aspectos de la ramificación ductal. En particular se ha asociado al FGF2 con la expansión epitelial y la elongación ductal, mientras que el FGF10 y su receptor el FGFR2 se han descritos como inductores del *branching* mamario y responsables de la dirección del crecimiento de los ductos (Zhang *et al.*, 2014). Aún resta por definir el mecanismo por el cual el  $\beta$ -RA provoca un aumento en la expresión de estos factores. En este sentido, en una línea celular de osteoblastos, el aumento de AMPc incrementa los transcritos de FGF2, FGFR2 y FGFR1 e induce la translocación de las proteínas al núcleo (Hurley *et al.*, 1999). Si bien el promotor del FGF2 no posee un sitio específico de unión al factor de transcripción CREB, contiene un sitio consenso conocido para el factor AP-1. CREB regula la expresión de numerosos genes que contienen a las secuencias denominadas elementos de respuesta a AMPc (CRE). La activación de CREB, mediante fosforilación, ha sido asociada a la activación de la vía del AMPc por el  $\beta$ -RA (Lonze *et al.*, 2002). Por otro lado, AP-1 es un factor de transcripción que regula diversos procesos celulares incluyendo diferenciación, proliferación y apoptosis (Ameyar *et al.*, 2003). Clásicamente, AP-1 se une a los elementos de respuesta a TPA (TRE). Sin embargo, ha

sido descrito en células de rata, que la producción de AMPc por PTH es capaz de inducir la unión de CREB a la secuencia consenso de AP-1 (TRE) (Rajakumar *et al.*, 1996). Por lo que, los efectos del Iso en la expresión de los FGFs podrían estar mediados también vía el sitio TRE.

Otro punto a destacar es el efecto de la activación de los  $\beta$ -RA sobre la arquitectura del lumen. Este efecto mostró ser independientemente de la presencia del ER, sugiriendo la activación de otras vías no asociadas a este receptor hormonal. En particular, la expresión de los FGFs resultó ser independiente del ER, debido a que el tratamiento con FULV no fue capaz de revertir el efecto del Iso en la inducción de dichos factores. Particularmente, el aumento de la expresión de FGF2 y FGF10 inducida por Iso se suprime en ratones OVX. Si bien ambos abordajes nos permiten estudiar la importancia de los estrógenos en los efectos estudiados, la ovariectomía conlleva un cambio hormonal sumamente importante, mientras que en los ratones tratados con FULV solo se inhibe la señalización inducida por el ER y su consiguiente respuesta. La diferencia en la expresión de estos dos FGFs entre los ratones tratados con FULV y OVX podría deberse a la pérdida de alguna otra señal necesaria para la inducción de estos factores. Por ende, podríamos suponer que la activación  $\beta$ -adrenérgica ejerce su efecto sobre la morfología ductal, al menos en parte, a través de los miembros evaluados de la familia de FGFs.

Nuestro trabajo es el primer estudio que demuestra que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica induce la expresión del ER $\alpha$  en células MCF-7 y MCF-10A. Se ha reportado que la línea MCF-10A en cultivo 2D expresa ER $\beta$  pero no ER $\alpha$  (Liu *et al.*, 2004; Marchese *et al.*, 2012). Interesantemente, las condiciones de cultivo 3D estimularon la expresión específica del ER $\alpha$  en células MCF-10A, efecto que no ha sido reportado previamente. En línea con esto, se ha descrito que la expresión génica en células epiteliales mamarias en cultivo 2D es significativamente diferente de aquellas que provienen de cultivos 3D (Yu *et al.*, 2012). De hecho, la línea MCF-10A produce proteínas de la leche bajo ciertas condiciones de cultivo 3D (Inman *et al.*, 2010). Por ende, la expresión de ER $\alpha$  en MCF-10A creciendo en cultivo 3D no es un fenómeno sorprendente.

Por otro lado, el tratamiento *in vivo* con Iso indujo también la expresión del ER $\alpha$  en las glándulas mamarias. Esto tampoco había sido descrito anteriormente. Este resultado concuerda con lo observado en el trabajo realizado por Boyd, donde se demuestra que los ratones adultos que sufrieron una separación prolongada de sus madres durante el periodo neonatal, muestran un aumento del 200% en los niveles del ER $\alpha$  en comparación con los animales que no sufrieron dicho estrés (Boyd *et al.*, 2010).

A fin de comprender cómo la estimulación de los  $\beta$ -RA afecta el desarrollo mamario, sería necesario determinar el mecanismo involucrado en el aumento de expresión de ER $\alpha$  tanto *in vitro* como *in vivo*. Algunos estudios demuestran que el AMPc es capaz de modular la expresión del ER. En el tracto reproductivo masculino, se describió que el ER $\alpha$  se regula positivamente por un GPCR acoplado a la vía de AMPc y PKA (Li *et al.*, 2010). De hecho, se ha reportado un motivo CRE en el promotor de una variante del ER. Esta variante ha sido detectada en todos los tejidos humanos y murinos y predomina en las células MCF-7 (Kos *et al.*, 2000; Kos *et al.*, 2001). Por otro lado, la señalización  $\beta$ -adrenérgica podría estar modulando chaperonas encargadas de estabilizar al ER $\alpha$ , como proteínas *heat-shock*. Se sabe que éstas pueden ser fosforiladas por PKA (Edwards *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2009), lo que lleva a una mayor estabilidad de las mismas. Esto se traduciría en una disminución de la velocidad de degradación del ER $\alpha$ . Esto podría explicar el aumento observado en los niveles de este receptor. Por otro lado, la actividad de ER depende de su interacción cooperativa con co-reguladores, formando un complejo de proteínas que permiten modular la actividad de genes blanco. Dichos co-reguladores juegan un papel crucial en el desarrollo de la glándula mamaria y su desregulación se encuentra asociada al desarrollo tumoral (Manavathi *et al.*, 2013). El efecto del Iso en la mama podría estar en parte mediado por algunos co-activadores del ER. De hecho, algunos de ellos se encuentran modulados por AMPc (Fenne *et al.*, 2008).

Un hallazgo sumamente interesante de nuestro estudio es que el efecto diferenciante del  $\beta$ -RA sobre la glándula mamaria normal puede ser trasladado a modelos tumorales. Además de los efectos diferenciantes en células tumorales

creciendo en cultivo 3D, el Iso causó la inhibición del crecimiento de dos tumores mamarios murinos. Esto concuerda con lo obtenido por otros autores (Campbell *et al.*, 2012; Carie *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2012). Carie *et al.* demuestran que la activación  $\beta$ -adrenérgica induce apoptosis y regresión tumoral mediante la inhibición de las vías Raf-1/Mek-1/Erk1/2 de manera dependiente de PKA. En tal sentido, trabajos de nuestro laboratorio también asocian la activación  $\beta$ -adrenérgica con la inhibición del crecimiento de tumores murinos y de líneas tumorales humanas mediante la inhibición de ERK de manera PKA dependiente, y con una disminución del número y el tamaño de metástasis experimentales (Rivero *et al.*, 2017).

En el tumor C4-2-HI la disminución del tamaño tumoral puede ser parcialmente explicada por la pronunciada diferenciación inducida por el Iso. En línea con esto, el Iso indujo un aumento en la expresión nuclear del factor de transcripción GATA3, que se encuentra ampliamente asociado al desarrollo mamario, y el cual se pierde progresivamente durante la progresión tumoral (Chou *et al.*, 2010). En el tumor C7-2-HI no se observaron diferencias en cuanto a la diferenciación, probablemente debido a las características histológicas del tumor. El C7-2-HI es un tumor más diferenciado, y el efecto del Iso podría no ser apreciable.

Si bien los estrógenos son los reguladores clave del desarrollo mamario, nuestro trabajo revela que las catecolaminas circulantes o liberadas durante el estrés podrían también encontrarse involucradas en este proceso. Debido a que la glándula mamaria se encuentra inervada por el sistema nervioso simpático, que se observan cambios en el tono simpático-adrenal durante la lactancia (Mena *et al.*, 1995) y los resultados aquí obtenidos, podríamos sugerir un rol fisiológico del  $\beta_2$ -RA en el desarrollo mamario. Sternlicht *et al.* en una revisión realizada en el año 2006 sugirieron que un GPCR podría influenciar el mecanismo de *branching* mamario gobernado por el ER $\alpha$  (Sternlicht *et al.*, 2006). Así, es posible entonces que la señalización  $\beta$ -adrenérgica durante importantes periodos del desarrollo puedan causar cambios permanentes en la glándula mamaria con implicancias futuras en el desarrollo tumoral. Descifrar los mecanismos mediante los cuales los  $\beta$ -RA intervienen



como mediadores del estrés en el desarrollo de la glándula mamaria podría tener relevantes implicaciones clínicas en la investigación en cáncer de mama.

Páginas 112 a 123 eliminadas a pedido del autor.

# **Bibliografía**

Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR (1982). Ovarian beta-adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* **110**(4): 1124-1132.

Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ (2004). Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* **279**(34): 35518-35525.

Al-Bazz YO, Underwood JC, Brown BL, Dobson PR (2009). Prognostic significance of Akt, phospho-Akt and BAD expression in primary breast cancer. *Eur J Cancer* **45**(4): 694-704.

Al-Wadei HA, Takahashi T, Schuller HM (2006). Caffeine stimulates the proliferation of human lung adenocarcinoma cells and small airway epithelial cells via activation of PKA, CREB and ERK1/2. *Oncol Rep* **15**(2): 431-435.

Alexander SP, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, *et al.* (2017). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* **174 Suppl 1**: S17-S129.

Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* **85**(8): 747-752.

Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, Dhabhar FS, Sephton SE, McDonald PG, *et al.* (2006). The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat.Rev.Cancer* **6**(3): 240-248.

Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, *et al.* (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**(6687): 805-809.

Armaiz-Pena GN, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK (2009). Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain Behav Immun* **23**(1): 10-15.

Bae JM, Kim EH (2015). Hormone Replacement Therapy and Risk of Breast Cancer in Korean Women: A Quantitative Systematic Review. *Journal of preventive medicine and public health = Yebang Uihakhoe chi* **48**(5): 225-230.

Baker JG, Hall IP, Hill SJ (2003). Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol* **64**(6): 1357-1369.

Ball LJ, Kuhne R, Hoffmann B, Hafner A, Schmieder P, Volkmer-Engert R, *et al.* (2000). Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *The EMBO journal* **19**(18): 4903-4914.

Ban KA, Godellas CV (2014). Epidemiology of breast cancer. *Surgical oncology clinics of North America* **23**(3): 409-422.

Barron TI, Connolly RM, Sharp L, Bennett K, Visvanathan K (2011). Beta blockers and breast cancer mortality: a population- based study. *J.Clin.Oncol.* **29**(19): 2635-2644.

Barron TI, Sharp L, Visvanathan K (2012). Beta-adrenergic blocking drugs in breast cancer: a perspective review. *Ther.Adv.Med.Oncol.* **4**(3): 113-125.

Berg WA (2007). Beyond standard mammographic screening: mammography at age extremes, ultrasound, and MR imaging. *Radiologic clinics of North America* **45**(5): 895-906, vii.

Berg WA (2009). Tailored supplemental screening for breast cancer: what now and what next? *AJR. American journal of roentgenology* **192**(2): 390-399.

Bernabe J, Peeters G (1980). Studies on the motility of smooth muscles of the teats in lactating cows. *J.Dairy Res.* **47**(3): 259-275.

Berrier AL, Yamada KM (2007). Cell-matrix adhesion. *Journal of cellular physiology* **213**(3): 565-573.

Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW (2002). The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation; research in biological diversity* **70**(9-10): 537-546.

Blum JW, Schams D, Bruckmaier R (1989). Catecholamines, oxytocin and milk removal in dairy cows. *J.Dairy Res.* **56**(2): 167-177.

Bocchinfuso WP, Korach KS (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **2**(4): 323-334.

Bos JL (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**(9): 733-738.

Boyd AL, Salleh A, Humber B, Yee J, Tomes L, Kerr LR (2010). Neonatal experiences differentially influence mammary gland morphology, estrogen receptor {alpha} protein levels, and carcinogenesis in BALB/c mice. *Cancer prevention research* **3**(11): 1398-1408.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* **13**(8): 790-801.

Brisken C, Ataca D (2015). Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **4**(3): 181-195.

Brisken C, Kaur S, Chavarria TE, Binart N, Sutherland RL, Weinberg RA, *et al.* (1999). Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Developmental biology* **210**(1): 96-106.

Brisken C, Park S, Vass T, Lydon JP, O'Malley BW, Weinberg RA (1998). A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5076-5081.

Bruckmaier R, Mayer H, Schams D (1991). Effects of alpha- and beta-adrenergic agonists on intramammary pressure and milk flow in dairy cows. *J.Dairy Res.* **58**(4): 411-419.

Bruckmaier RM, Wellnitz O, Blum JW (1997). Inhibition of milk ejection in cows by oxytocin receptor blockade, alpha-adrenergic receptor stimulation and in unfamiliar surroundings. *J.Dairy Res.* **64**(3): 315-325.

Bruzzone A, Perez C, Rojas P, Romanato M, Gass H, Lanari C, *et al.* (2011). Alpha2-adrenoceptors enhance cell proliferation and mammary tumour growth in both the stroma and the tumor cells *Current Cancer Drug Targets.*

Bruzzone A, Pinero CP, Castillo LF, Sarappa MG, Rojas P, Lanari C, *et al.* (2008). alpha(2)-Adrenoceptor action on cell proliferation and mammary tumour growth in mice. *Br.J.Pharmacol.*

Bruzzone A, Sauliere A, Finana F, Senard JM, Luthy I, Gales C (2014). Dosage-dependent regulation of cell proliferation and adhesion through dual beta2-adrenergic receptor/cAMP signals. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **28**(3): 1342-1354.

Burrige K, Wennerberg K (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**(2): 167-179.

Cakir Y, Plummer HK, III, Tithof PK, Schuller HM (2002). Beta-adrenergic and arachidonic acid-mediated growth regulation of human breast cancer cell lines. *Int.J Oncol.* **21**(1): 153-157.

Campbell JP, Karolak MR, Ma Y, Perrien DS, Masood-Campbell SK, Penner NL, *et al.* (2012). Stimulation of host bone marrow stromal cells by sympathetic nerves promotes breast cancer bone metastasis in mice. *PLoS.Biol.* **10**(7): e1001363.

Cardwell CR, Coleman HG, Murray LJ, Entschladen F, Powe DG (2013). Beta-blocker usage and breast cancer survival: a nested case-control study within a UK clinical practice research datalink cohort. *International journal of epidemiology* **42**(6): 1852-1861.

Carie AE, Sebti SM (2007). A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway. *Oncogene* **26**(26): 3777-3788.

Clavel-Chapelon F, Group ENE (2002). Differential effects of reproductive factors on the risk of pre- and postmenopausal breast cancer. Results from a large cohort of French women. *British journal of cancer* **86**(5): 723-727.

Cole SW, Sood AK (2012). Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin Cancer Res* **18**(5): 1201-1206.

Coleman S, Silberstein GB, Daniel CW (1988). Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland: evidence supporting a role for epidermal growth factor. *Developmental biology* **127**(2): 304-315.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* **347**(9017): 1713-1727.

Cosentino M, Marino F (2013). Adrenergic and dopaminergic modulation of immunity in multiple sclerosis: teaching old drugs new tricks? *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* **8**(1): 163-179.

Couse JF, Korach KS (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine reviews* **20**(3): 358-417.

Cheepala S, Hulot JS, Morgan JA, Sassi Y, Zhang W, Naren AP, *et al.* (2013). Cyclic nucleotide compartmentalization: contributions of phosphodiesterases and ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**: 231-253.

Chida Y, Hamer M, Wardle J, Steptoe A (2008). Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nature clinical practice. Oncology* **5**(8): 466-475.

Childers WK, Hollenbeak CS, Cheriya P (2015). beta-Blockers Reduce Breast Cancer Recurrence and Breast Cancer Death: A Meta-Analysis. *Clinical breast cancer* **15**(6): 426-431.

Chou J, Provot S, Werb Z (2010). GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it! *Journal of cellular physiology* **222**(1): 42-49.

Dachary-Prigent J, Dufourcq J, Lussan C, Boisseau M (1979). Propranolol, chlorpromazine and platelet membrane: a fluorescence study of the drug-membrane interaction. *Thrombosis research* **14**(1): 15-22.

Daly CJ, McGrath JC (2011). Previously unsuspected widespread cellular and tissue distribution of beta-adrenoceptors and its relevance to drug action. *Trends Pharmacol Sci* **32**(4): 219-226.

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating g (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* **366**(9499): 1784-1793.

Datta D, Arion D, Corradi JP, Lewis DA (2015). Altered expression of CDC42 signaling pathway components in cortical layer 3 pyramidal cells in schizophrenia. *Biological psychiatry* **78**(11): 775-785.

Davio CA, Cricco GP, Bergoc RM, Rivera ES (1995). H1 and H2 histamine receptors in N-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers. *Biochem Pharmacol* **50**(1): 91-96.

Davy A, Aubin J, Soriano P (2004). Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes & development* **18**(5): 572-583.

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, *et al.* (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**(6710): 474-477.

Debnath J, Brugge JS (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* **5**(9): 675-688.

Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* **30**(3): 256-268.



Doorn J, Leusink M, Groen N, van de Peppel J, van Leeuwen JP, van Blitterswijk CA, *et al.* (2012). Diverse effects of cyclic AMP variants on osteogenic and adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Tissue engineering. Part A* **18**(13-14): 1431-1442.

Drake MT, Violin JD, Whalen EJ, Wisler JW, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2008). beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **283**(9): 5669-5676.

Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature cell biology* **1**(5): 253-259.

Edwards HV, Scott JD, Baillie GS (2012). PKA phosphorylation of the small heat-shock protein Hsp20 enhances its cardioprotective effects. *Biochemical Society transactions* **40**(1): 210-214.

Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, *et al.* (2002). A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol.* **4**(11): 901-906.

Entschladen F, Drell TL, Lang K, Joseph J, Zaenker KS (2004). Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol* **5**(4): 254-258.

Entschladen F, Thyssen DA, Drell DW (2016). Re-Use of Established Drugs for Anti-Metastatic Indications. *Cells* **5**(1).

Erickson CE, Gul R, Blessing CP, Nguyen J, Liu T, Pulakat L, *et al.* (2013). The beta-blocker Nebivolol Is a GRK/beta-arrestin biased agonist. *PLoS one* **8**(8): e71980.

Ethier SP, Ullrich RL (1982). Detection of ductal dysplasia in mammary outgrowths derived from carcinogen-treated virgin female BALB/c mice. *Cancer Res* **42**(5): 1753-1760.

Fenne IS, Hoang T, Hauglid M, Sagen JV, Lien EA, Mellgren G (2008). Recruitment of coactivator glucocorticoid receptor interacting protein 1 to an estrogen receptor transcription complex is regulated by the 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Endocrinology* **149**(9): 4336-4345.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**(5): E359-386.

Franke-Radowiecka A, Wasowicz K (2002). Adrenergic and cholinergic innervation of the mammary gland in the pig. *Anat. Histol. Embryol.* **31**(1): 3-7.

Gaffney EV (1982). A cell line (HBL-100) established from human breast milk. *Cell Tissue Res* **227**(3): 563-568.

Galandrin S, Bouvier M (2006). Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* **70**(5): 1575-1584.

Gallego MI, Binart N, Robinson GW, Okagaki R, Coschigano KT, Perry J, *et al.* (2001). Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Developmental biology* **229**(1): 163-175.

Gao YT, Shu XO, Dai Q, Potter JD, Brinton LA, Wen W, *et al.* (2000). Association of menstrual and reproductive factors with breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Int J Cancer* **87**(2): 295-300.

Gargiulo L, Copsel S, Rivero EM, Gales C, Senard JM, Luthy IA, *et al.* (2014). Differential beta(2)-adrenergic receptor expression defines the phenotype of non-tumorigenic and malignant human breast cell lines. *Oncotarget* **5**(20): 10058-10069.

Gautreau A, Louvard D, Arpin M (2000). Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. *The Journal of cell biology* **150**(1): 193-203.

Gilman AG (1970). A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**(1): 305-312.

Goodwin PJ, Meyerhardt JA, Hursting SD (2010). Host factors and cancer outcome. *J Clin Oncol* **28**(26): 4019-4021.

Gouon-Evans V, Pollard JW (2002). Unexpected deposition of brown fat in mammary gland during postnatal development. *Molecular endocrinology* **16**(11): 2618-2627.

Gow IF, Mitchell E, Wait M (2003). Adrenergic receptors in the bovine mammary artery. *Biochem.Pharmacol.* **65**(10): 1747-1753.

Grimm SL, Seagroves TN, Kabotyanski EB, Hovey RC, Vonderhaar BK, Lydon JP, *et al.* (2002). Disruption of steroid and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development. *Molecular endocrinology* **16**(12): 2675-2691.

Gyires K, Zadori ZS, Torok T, Matyus P (2009). alpha(2)-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem.Int.* **55**(7): 447-453.

Hammon HM, Bruckmaier RM, Honegger UE, Blum JW (1994). Distribution and density of alpha- and beta-adrenergic receptor binding sites in the bovine mammary gland. *J Dairy Res.* **61**(1): 47-57.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.

Harbeck B, Huttelmaier S, Schluter K, Jockusch BM, Illenberger S (2000). Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem* **275**(40): 30817-30825.

Hasen NS, O'Leary KA, Auger AP, Schuler LA (2010). Social isolation reduces mammary development, tumor incidence, and expression of epigenetic regulators in wild-type and p53-heterozygotic mice. *Cancer prevention research* **3**(5): 620-629.

Haslam SZ, Counterman LJ, Nummy KA (1993). Effects of epidermal growth factor, estrogen, and progesterin on DNA synthesis in mammary cells in vivo are determined by the developmental state of the gland. *Journal of cellular physiology* **155**(1): 72-78.

Hein L (2006). Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res.* **326**(2): 541-551.

Hering D, Lachowska K, Schlaich M (2015). Role of the Sympathetic Nervous System in Stress-Mediated Cardiovascular Disease. *Current hypertension reports* **17**(10): 80.

Hermes GL, Delgado B, Tretiakova M, Cavigelli SA, Krausz T, Conzen SD, *et al.* (2009). Social isolation dysregulates endocrine and behavioral stress while increasing malignant burden of spontaneous mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(52): 22393-22398.

Hieble JP, Bondinell WE, Ruffolo RR, Jr. (1995). Alpha- and Beta-Adrenoceptors: From the Gene to the Clinic. 1. Molecular Biology and Adrenoceptor Subclassification. *Journal of Medicinal Chemistry* **38**(18): 3415-3444.

Holmes S, Griffith EJ, Musto G, Minuk GY (2013). Antihypertensive medications and survival in patients with cancer: a population-based retrospective cohort study. *Cancer epidemiology* **37**(6): 881-885.

Hovey RC, Trott JF, Ginsburg E, Goldhar A, Sasaki MM, Fountain SJ, *et al.* (2001). Transcriptional and spatiotemporal regulation of prolactin receptor mRNA and cooperativity with progesterone receptor function during ductal branch growth in the mammary gland.

*Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **222**(2): 192-205.

Hovey RC, Trott JF, Vonderhaar BK (2002). Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **7**(1): 17-38.

Hurley MM, Tetradis S, Huang YF, Hock J, Kream BE, Raisz LG, *et al.* (1999). Parathyroid hormone regulates the expression of fibroblast growth factor-2 mRNA and fibroblast growth factor receptor mRNA in osteoblastic cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **14**(5): 776-783.

Inderwies T, Pfaffl MW, Bruckmaier RM (2003a). Milking characteristics and their relation to adrenergic receptor mRNA expression and ligand binding in the mammary gland of dairy cows. *Domest. Anim Endocrinol.* **25**(3): 275-286.

Inderwies T, Pfaffl MW, Meyer HH, Blum JW, Bruckmaier RM (2003b). Detection and quantification of mRNA expression of alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes in the mammary gland of dairy cows. *Domest. Anim Endocrinol.* **24**(2): 123-135.

Inman JL, Bissell MJ (2010). Apical polarity in three-dimensional culture systems: where to now? *Journal of biology* **9**(1): 2.

Kahsai AW, Xiao K, Rajagopal S, Ahn S, Shukla AK, Sun J, *et al.* (2011). Multiple ligand-specific conformations of the beta2-adrenergic receptor. *Nat Chem Biol* **7**(10): 692-700.

Kenakin T (2004). Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **25**(4): 186-192.

Kenakin T, Christopoulos A (2013). Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nature reviews. Drug discovery* **12**(3): 205-216.

Kos M, O'Brien S, Flouriot G, Gannon F (2000). Tissue-specific expression of multiple mRNA variants of the mouse estrogen receptor alpha gene. *FEBS letters* **477**(1-2): 15-20.

Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Molecular endocrinology* **15**(12): 2057-2063.

Koul O, Hauser G (1987). Modulation of rat brain cytosolic phosphatidate phosphohydrolase: effect of cationic amphiphilic drugs and divalent cations. *Archives of biochemistry and biophysics* **253**(2): 453-461.

- Kouros-Mehr H, Werb Z (2006). Candidate regulators of mammary branching morphogenesis identified by genome-wide transcript analysis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**(12): 3404-3412.
- Kwon T, Kwon DY, Chun J, Kim JH, Kang SS (2000). Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem* **275**(1): 423-428.
- Lacroix M, Leclercq G (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res.Treat.* **83**(3): 249-289.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lamb CA, Helguero LA, Fabris V, Lucas C, Molinolo AA, Lanari C (2003). Differential effects of raloxifene, tamoxifen and fulvestrant on a murine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res.Treat.* **79**(1): 25-35.
- Langslet A (1970). Membrane stabilization and cardiac effects of d,1-propranolol, d-propranolol and chlorpromazine. *Eur J Pharmacol* **13**(1): 6-14.
- Laplante M, Sabatini DM (2012). mTOR Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**(2).
- Lavoie C, Mercier JF, Salahpour A, Umapathy D, Breit A, Villeneuve LR, *et al.* (2002). Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* **277**(38): 35402-35410.
- Lefkowitz RJ (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* **25**(8): 413-422.
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**(5721): 512-517.
- Levenson AS, Jordan VC (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res* **57**(15): 3071-3078.
- Li XY, Lu Y, Sun HY, Wang JQ, Yang J, Zhang HJ, *et al.* (2010). G protein-coupled receptor 48 upregulates estrogen receptor alpha expression via cAMP/PKA signaling in the male reproductive tract. *Development* **137**(1): 151-157.

Liu R, Ramani B, Soto D, De Arcangelis V, Xiang Y (2009). Agonist dose-dependent phosphorylation by protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase regulates beta2 adrenoceptor coupling to G(i) proteins in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **284**(47): 32279-32287.

Liu S, Lin YC (2004). Transformation of MCF-10A human breast epithelial cells by zeranol and estradiol-17beta. *Breast J* **10**(6): 514-521.

Liu X, Ma L, Li HH, Huang B, Li YX, Tao YZ, *et al.* (2015). beta-Arrestin-biased signaling mediates memory reconsolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(14): 4483-4488.

Lonze BE, Ginty DD (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* **35**(4): 605-623.

Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, *et al.* (2004). Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *European heart journal* **25**(15): 1341-1362.

Lorenowicz MJ, van Gils J, de Boer M, Hordijk PL, Fernandez-Borja M (2006). Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis. *J.Leukoc.Biol.* **80**(6): 1542-1552.

Lutgendorf SK, Sood AK, Antoni MH (2010). Host factors and cancer progression: biobehavioral signaling pathways and interventions. *J Clin Oncol* **28**(26): 4094-4099.

Luthy IA, Bruzzone A, Pinero CP, Castillo LF, Chiesa IJ, Vazquez SM, *et al.* (2009). Adrenoceptors: non conventional target for breast cancer? *Curr.Med.Chem.* **16**(15): 1850-1862.

Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., *et al.* (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & development* **9**(18): 2266-2278.

Lyons WR, Li CH, Johnson RE (1958). The hormonal control of mammary growth and lactation. *Recent progress in hormone research* **14**: 219-248; discussion 248-254.

Macias H, Hinck L (2012). Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **1**(4): 533-557.

MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, *et al.* (1970). Age at first birth and breast cancer risk. *Bulletin of the World Health Organization* **43**(2): 209-221.

Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB (2011). beta-Adrenergic receptors (beta-AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high beta-AR-expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.*

Mallepell S, Krust A, Chambon P, Brisken C (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2196-2201.

Manavathi B, Dey O, Gajulapalli VN, Bhatia RS, Bugide S, Kumar R (2013). Derailed estrogen signaling and breast cancer: an authentic couple. *Endocrine reviews* **34**(1): 1-32.

Manson ME, Corey DA, Rymut SM, Kelley TJ (2011). beta-arrestin-2 regulation of the cAMP response element binding protein. *Biochemistry* **50**(27): 6022-6029.

Marchese S, Silva E (2012). Disruption of 3D MCF-12A breast cell cultures by estrogens--an in vitro model for ER-mediated changes indicative of hormonal carcinogenesis. *PLoS one* **7**(10): e45767.

Marchetti B, Spinola PG, Plante M, Poyet P, Follea N, Pelletier G, *et al.* (1989). Beta-adrenergic receptors in DMBA-induced rat mammary tumors: correlation with progesterone receptor and tumor growth. *Breast Cancer Res. Treat.* **13**(3): 251-263.

Matos ELDIZNFern nMMGCGMESAaRS (2003). Atlas de mortalidad por cáncer en Argentina, 1997-2001, pp 1-152.

Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, *et al.* (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *The Journal of cell biology* **140**(3): 647-657.

Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS (1994). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Molecular and cellular biology* **14**(9): 6107-6116.

McGough A, Pope B, Chiu W, Weeds A (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *The Journal of cell biology* **138**(4): 771-781.

Mena F, Aguayo D, Pacheco P, Morales MT (1995). Central effects of catecholamines upon mammary contractility in rats are neurally mediated. *Neuroendocrinology* **61**(6): 722-730.

Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD (1987). Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J.Natl.Cancer Inst.* **79**(6): 1341-1350.

Morales T, Shapiro E, Marina N, Mena F (2001). Sympathetic innervation of mammary glands mediates suckling-induced reflex inhibition of milk yield in rats. *Physiol Behav.* **74**(1-2): 37-43.

Morch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard O (2017). Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *The New England journal of medicine* **377**(23): 2228-2239.

Moreno-Smith M, Lutgendorf SK, Sood AK (2010). Impact of stress on cancer metastasis. *Future oncology* **6**(12): 1863-1881.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters* **392**(1): 49-53.

Nandi S (1958). Endocrine control of mammary gland development and function in the C3H/He Crgl mouse. *J Natl Cancer Inst* **21**(6): 1039-1063.

Nedvetsky PI, Kwon SH, Debnath J, Mostov KE (2012). Cyclic AMP regulates formation of mammary epithelial acini in vitro. *Molecular Biology of the Cell* **23**(15): 2973-2981.

Nelson JF, Karelus K, Felicio LS, Johnson TE (1990). Genetic influences on the timing of puberty in mice. *Biology of reproduction* **42**(4): 649-655.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, *et al.* (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* **10**(6): 515-527.

Neville MC (2001). Anatomy and physiology of lactation. *Pediatric clinics of North America* **48**(1): 13-34.

Nicholson KM, Anderson NG (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**(5): 381-395.

Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S (2006). Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* **99**(10): 1084-1091.

Numbere B, Fleming KM, Walker A, Card TR (2017). Adrenergic blockers and the risk for common solid cancers: a case-control study. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* **26**(1): 86-93.



O'Brien LE, Zegers MM, Mostov KE (2002). Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(7): 531-537.

Ohashi K, Hosoya T, Takahashi K, Hing H, Mizuno K (2000). A Drosophila homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. *Biochemical and biophysical research communications* **276**(3): 1178-1185.

Olson MF (2016). Rho GTPases, their post-translational modifications, disease-associated mutations and pharmacological inhibitors. *Small GTPases*: 1-13.

Osborne CK, Coronado-Heinsohn EB, Hilsenbeck SG, McCue BL, Wakeling AE, McClelland RA, *et al.* (1995). Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **87**(10): 746-750.

Palm D, Lang K, Niggemann B, Drell TL, Masur K, Zaenker KS, *et al.* (2006). The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer* **118**(11): 2744-2749.

Park MJ, Park EC, Choi KS, Jun JK, Lee HY (2011). Sociodemographic gradients in breast and cervical cancer screening in Korea: the Korean National Cancer Screening Survey (KNCSS) 2005-2009. *BMC Cancer* **11**: 257.

Parkin DM (2011). 15. Cancers attributable to reproductive factors in the UK in 2010. *British journal of cancer* **105 Suppl 2**: S73-76.

Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, Giacometti S, Fanciullino R, Pouchy C, *et al.* (2011). Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget* **2**(10): 797-809.

Pearce A, Sanders L, Brighton PJ, Rana S, Konje JC, Willets JM (2017). Reciprocal regulation of beta2-adrenoceptor-activated cAMP response-element binding protein signalling by arrestin2 and arrestin3. *Cell Signal* **38**: 182-191.

Perez PC, Bruzzone A, Sarappa M, Castillo L, Luthy I (2012). Involvement of alpha2- and beta2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. *Br.J.Pharmacol.* **166**(2): 721-736.

Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(19): 9064-9068.

Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA (1997). Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* **71**(5): 800-809.

Pon CK, Lane JR, Sloan EK, Halls ML (2016). The beta2-adrenoceptor activates a positive cAMP-calcium feedforward loop to drive breast cancer cell invasion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **30**(3): 1144-1154.

Popoff MR, Geny B (2009). Multifaceted role of Rho, Rac, Cdc42 and Ras in intercellular junctions, lessons from toxins. *Biochimica et biophysica acta* **1788**(4): 797-812.

Powe DG, Entschladen F (2011a). Targeted therapies: Using beta-blockers to inhibit breast cancer progression. *Nature reviews. Clinical oncology* **8**(9): 511-512.

Powe DG, Voss MJ, Habashy HO, Zanker KS, Green AR, Ellis IO, *et al.* (2011b). Alpha- and beta-adrenergic receptor (AR) protein expression is associated with poor clinical outcome in breast cancer: an immunohistochemical study. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**(2): 457-463.

Powe DG, Voss MJ, Zanker KS, Habashy HO, Green AR, Ellis IO, *et al.* (2010). Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. *Oncotarget.* **1**(7): 628-638.

Price MA, Tennant CC, Butow PN, Smith RC, Kennedy SJ, Kossoff MB, *et al.* (2001). The role of psychosocial factors in the development of breast carcinoma: Part II. Life event stressors, social support, defense style, and emotional control and their interactions. *Cancer* **91**(4): 686-697.

Pjuguet P, Del Maestro L, Gautreau A, Louvard D, Arpin M (2003). Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* **14**(5): 2181-2191.

Raimondi S, Botteri E, Munzone E, Cipolla C, Rotmensz N, DeCensi A, *et al.* (2016). Use of beta-blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers and breast cancer survival: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* **139**(1): 212-219.

Rajakumar RA, Quinn CO (1996). Parathyroid hormone induction of rat interstitial collagenase mRNA in osteosarcoma cells is mediated through an AP-1-binding site. *Molecular endocrinology* **10**(7): 867-878.

Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij HB, de Rooij J, Price LS, Schwede F, *et al.* (2003). Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J.Cell Biol.* **160**(4): 487-493.

Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, *et al.* (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**(7168): 383-387.

Re G, Badino P, Girardi C, Di Carlo F (1992). Effects of a beta 2-agonist (clenbuterol) on cultured human (CG-5) breast cancer cells. *Pharmacol.Res.* **26**(4): 377-384.

Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **5**(2): 227-241.

Ridley AJ (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in cell biology* **16**(10): 522-529.

Ridley AJ (2001). Rho GTPases and cell migration. *Journal of cell science* **114**(Pt 15): 2713-2722.

Ridley AJ, Hall A (1992a). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**(3): 389-399.

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992b). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**(3): 401-410.

Rivero EM, Pinero CP, Gargiulo L, Entschladen F, Zanker K, Bruzzone A, *et al.* (2017). The beta 2-Adrenergic Agonist Salbutamol Inhibits Migration, Invasion and Metastasis of the Human Breast Cancer MDA-MB- 231 Cell Line. *Curr Cancer Drug Targets* **17**(8): 756-766.

Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* **245**(4919): 718-725.

Roets E, Peeters G (1985a). Identification and characterization of 3H-prazosin binding to alpha 1-adrenoceptors in bovine teat muscles. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* **275**(2): 189-198.

Roets E, Peeters G, Leysen JE (1984). Identification of beta-adrenoceptors in bovine teat muscles by 3H-dihydroalprenolol binding. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* **270**(2): 203-214.

Roets E, Vauquelin G, Peeters G, Braeckman R (1985b). Homogeneity of beta-adrenoceptors on bovine teat muscles. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* **276**(1): 44-49.

Russo IH, Russo J (1996). Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ.Health Perspect.* **104**(9): 938-967.

Russo J, Russo IH (2004). Development of the human breast. *Maturitas* **49**(1): 2-15.

Sahores A, Luque GM, Wargon V, May M, Molinolo A, Becu-Villalobos D, *et al.* (2013). Novel, low cost, highly effective, handmade steroid pellets for experimental studies. *PLoS one* **8**(5): e64049.

Sakakura T, Nishizuka Y, Dawe CJ (1976). Mesenchyme-dependent morphogenesis and epithelium-specific cytodifferentiation in mouse mammary gland. *Science* **194**(4272): 1439-1441.

Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *The Journal of cell biology* **147**(5): 1009-1022.

Santen RJ, Allred DC, Ardoin SP, Archer DF, Boyd N, Braunstein GD, *et al.* (2010). Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **95**(7 Suppl 1): s1-s66.

Shah SM, Carey IM, Owen CG, Harris T, Dewilde S, Cook DG (2011). Does beta-adrenoceptor blocker therapy improve cancer survival? Findings from a population-based retrospective cohort study. *British journal of clinical pharmacology* **72**(1): 157-161.

Shamir ER, Ewald AJ (2014). Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(10): 647-664.

Shi M, Liu D, Duan H, Qian L, Wang L, Niu L, *et al.* (2011). The beta2-adrenergic receptor and Her2 comprise a positive feedback loop in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.* **125**(2): 351-362.

Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, Reis RI, Huang LY, Tripathi-Shukla P, *et al.* (2014). Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* **512**(7513): 218-222.

Silberstein GB, Strickland P, Trumpbour V, Coleman S, Daniel CW (1984). In vivo, cAMP stimulates growth and morphogenesis of mouse mammary ducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(15): 4950-4954.

Slattery ML, Kerber RA (1993). A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk. The Utah Population Database. *JAMA* **270**(13): 1563-1568.

Sloan EK, Priceman SJ, Cox BF, Yu S, Pimentel MA, Tangkanangnukul V, *et al.* (2010). The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res* **70**(18): 7042-7052.

Slotkin TA, Zhang J, Dancel R, Garcia SJ, Willis C, Seidler FJ (2000). Beta-adrenoceptor signaling and its control of cell replication in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.* **60**(2): 153-166.

Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, *et al.* (1998). Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem* **273**(32): 20029-20035.

Snedeker SM, Brown CF, DiAugustine RP (1991). Expression and functional properties of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor during mouse mammary gland ductal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(1): 276-280.

Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, Sarmiere P, Moussi N, Sarcevic B, *et al.* (2005). Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *The EMBO journal* **24**(3): 473-486.

Sorensen GV, Ganz PA, Cole SW, Pedersen LA, Sorensen HT, Cronin-Fenton DP, *et al.* (2013). Use of beta-blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin II receptor blockers, and risk of breast cancer recurrence: a Danish nationwide prospective cohort study. *J Clin Oncol* **31**(18): 2265-2272.

Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Jr., Brenz R, McGrath CM, *et al.* (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* **50**(18): 6075-6086.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* **51**(5): 1409-1416.

Sozzani S, Agwu DE, McCall CE, O'Flaherty JT, Schmitt JD, Kent JD, *et al.* (1992). Propranolol, a phosphatidate phosphohydrolase inhibitor, also inhibits protein kinase C. *J Biol Chem* **267**(28): 20481-20488.

Spiegel D (1994). Health caring. Psychosocial support for patients with cancer. *Cancer* **74**(4 Suppl): 1453-1457.

Spiegel D, Giese-Davis J (2003). Depression and cancer: mechanisms and disease progression. *Biol.Psychiatry* **54**(3): 269-282.

Steiner E, Klubert D, Knutson D (2008). Assessing breast cancer risk in women. *American family physician* **78**(12): 1361-1366.

Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* **74**(7): 365-381.

Strumpf NE, Mezey MD (1980). A developmental approach to the teaching of aging. *Nursing outlook* **28**(12): 730-734.

Stuebe AM, Willett WC, Xue F, Michels KB (2009). Lactation and incidence of premenopausal breast cancer: a longitudinal study. *Archives of internal medicine* **169**(15): 1364-1371.

Sun P, Enslin H, Myung PS, Maurer RA (1994). Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & development* **8**(21): 2527-2539.

Szpunar MJ, Belcher EK, Dawes RP, Madden KS (2016). Sympathetic innervation, norepinephrine content, and norepinephrine turnover in orthotopic and spontaneous models of breast cancer. *Brain Behav Immun* **53**: 223-233.

Tachibana K, Haghparast SM, Miyake J (2015). Inhibition of cell adhesion by phosphorylated Ezrin/Radixin/Moesin. *Cell adhesion & migration* **9**(6): 502-512.

Tang J, Li Z, Lu L, Cho CH (2013). beta-Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. *Seminars in cancer biology* **23**(6 Pt B): 533-542.

Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, *et al.* (2006). Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat.Med.* **12**(8): 939-944.

Thaker PH, Lutgendorf SK, Sood AK (2007). The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell Cycle* **6**(4): 430-433.

Tran Quang C, Gautreau A, Arpin M, Treisman R (2000). Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. *The EMBO journal* **19**(17): 4565-4576.

Tsukita S, Yonemura S (1999). Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* **274**(49): 34507-34510.

Tubio MR, Fernandez N, Fitzsimons CP, Copsel S, Santiago S, Shayo C, *et al.* (2010). Expression of a G protein-coupled receptor (GPCR) leads to attenuation of signaling by other GPCRs: experimental evidence for a spontaneous GPCR constitutive inactive form. *Journal of Biological Chemistry* **285**(20): 14990-14998.

Tzingounis AV, von Zastrow M, Yudowski GA (2010). {Beta}-blocker drugs mediate calcium signaling in native central nervous system neurons by {beta}-arrestin-biased agonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(49): 21028-21033.

van der Westhuizen ET, Breton B, Christopoulos A, Bouvier M (2014). Quantification of ligand bias for clinically relevant beta2-adrenergic receptor ligands: implications for drug taxonomy. *Mol Pharmacol* **85**(3): 492-509.

Vandewalle B, Revillion F, Lefebvre J (1990). Functional beta-adrenergic receptors in breast cancer cells. *J Cancer Res.Clin.Oncol.* **116**(3): 303-306.

Vazquez SM, Mladovan AG, Perez C, Bruzzone A, Baldi A, Luthy IA (2006). Human breast cell lines exhibit functional alpha2-adrenoceptors. *Cancer Chemother.Pharmacol* **58**(1): 50-61.

Vazquez SM, Pignataro O, Luthy IA (1999). Alpha2-adrenergic effect on human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res.Treat.* **55**(1): 41-49.

Vonderhaar BK (1987). Local effects of EGF, alpha-TGF, and EGF-like growth factors on lobuloalveolar development of the mouse mammary gland in vivo. *Journal of cellular physiology* **132**(3): 581-584.

Vrydag W, Michel MC (2007). Tools to study beta3-adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **374**(5-6): 385-398.

Wang X, Lu XA, Song X, Zhuo W, Jia L, Jiang Y, *et al.* (2012). Thr90 phosphorylation of Hsp90alpha by protein kinase A regulates its chaperone machinery. *Biochem J* **441**(1): 387-397.

Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, Liang Y, *et al.* (2009). The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion and its function in tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(50): 21288-21293.

Wargon V, Riggio M, Giulianelli S, Sequeira GR, Rojas P, May M, *et al.* (2015). Progestin and anti-progestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int J Cancer* **136**(11): 2680-2692.

Weaver SR, Hernandez LL (2016). Autocrine-paracrine regulation of the mammary gland. *Journal of dairy science* **99**(1): 842-853.

Westhoff CL (1999). Breast cancer risk: perception versus reality. *Contraception* **59**(1 Suppl): 25S-28S.

Williams JM, Daniel CW (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Developmental biology* **97**(2): 274-290.

Wisler JW, DeWire SM, Whalen EJ, Violin JD, Drake MT, Ahn S, *et al.* (2007). A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(42): 16657-16662.

Wong HP, Yu L, Lam EK, Tai EK, Wu WK, Cho CH (2007). Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation. *Toxicol Sci* **97**(2): 279-287.

Wong K, Pertz O, Hahn K, Bourne H (2006). Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3639-3644.

Wood TL, Richert MM, Stull MA, Allar MA (2000). The insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins in postnatal development of murine mammary glands. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **5**(1): 31-42.

Wysolmerski JJ, Philbrick WM, Dunbar ME, Lanske B, Kronenberg H, Broadus AE (1998). Rescue of the parathyroid hormone-related protein knockout mouse demonstrates that parathyroid hormone-related protein is essential for mammary gland development. *Development* **125**(7): 1285-1294.

Xhaard H, Rantanen VV, Nyronen T, Johnson MS (2006). Molecular evolution of adrenoceptors and dopamine receptors: implications for the binding of catecholamines. *J Med Chem* **49**(5): 1706-1719.

Xue G, Hemmings BA (2013). PKB/Akt-dependent regulation of cell motility. *J Natl Cancer Inst* **105**(6): 393-404.

Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, *et al.* (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**(6687): 809-812.

Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ (1999). New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiological reviews* **79**(1): 73-98.



Yildirim NK, Ozkan M, Ilgun AS, Sarsenov D, Alco G, Aktepe F, *et al.* (2018). Possible role of stress, coping strategies, and life style in the development of breast cancer. *International journal of psychiatry in medicine*: 91217417749789.

Yu M, Lin G, Arshadi N, Kalatskaya I, Xue B, Haider S, *et al.* (2012). Expression profiling during mammary epithelial cell three-dimensional morphogenesis identifies PTPRO as a novel regulator of morphogenesis and ErbB2-mediated transformation. *Molecular and cellular biology* **32**(19): 3913-3924.

Zhang X, Martinez D, Koledova Z, Qiao G, Streuli CH, Lu P (2014). FGF ligands of the postnatal mammary stroma regulate distinct aspects of epithelial morphogenesis. *Development* **141**(17): 3352-3362.

Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, *et al.* (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12): 4459-4464.

Zhou R, Zhu L, Kodani A, Hauser P, Yao X, Forte JG (2005). Phosphorylation of ezrin on threonine 567 produces a change in secretory phenotype and repolarizes the gastric parietal cell. *Journal of cell science* **118**(Pt 19): 4381-4391.

Zsolnai B, Varga B, Horvath E (1982). Increase of ovarian progesterone secretion by beta 2-adrenergic stimulation in oestrous rats. *Acta endocrinologica* **101**(2): 268-272.