



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

## Regulación hormonal de la población de células stem en la glándula mamaria: rol diferencial de las isoformas del receptor de progesterona

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

Lic. María Sol Recouvreux

Director de tesis: Dra. Marina Simian

Consejero de estudios: Dra. Elba Vazquez

Lugar de trabajo: Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”, UBA

Buenos Aires.

Fecha de defensa: 9 de Abril de 2018

## ÍNDICE

RESUMEN EN ESPAÑOL.....	4
RESUMEN EN INGLÉS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
AGRADECIMIENTOS .....	9
INTRODUCCIÓN.....	13
Glándula mamaria .....	14
Receptor de progesterona.....	18
Receptor de estrógenos.....	21
Organización jerárquica de la glándula mamaria .....	23
Cáncer de mama.....	28
Antecedentes .....	34
HÍPOTESIS Y OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
Ratones .....	40
Determinación de ciclo estral .....	40
Ovariectomía .....	41
Extracción de la glándula mamaria.....	42
Montaje completo.....	42
Cortes histológicos .....	43
Cultivo primario .....	43
Tratamientos in vivo .....	44
Líneas celulares .....	44
Ensayos con ARN .....	45
Extracción de ARN de línea celular.....	45
Extracción de ARN de tejido .....	45
Retro transcripción.....	45
PCR de tiempo final.....	45
PCR en tiempo real (qPCR).....	46
Ensayos con proteínas.....	47
Extracción de proteínas de línea celular .....	47
Extracción de proteínas totales de tejido.....	57
Western blot.....	48
Zimografía.....	49
Citometría de flujo .....	50
Ensayos de mamoesferas .....	51
Cultivo en 3D .....	52
Tratamientos Hormonales .....	52
Ensayo clonogénico .....	53
Estadística .....	54
RESULTADOS.....	55
Objetivo 1.....	56

Caracterización del modelo .....	57
Determinación del porcentaje y funcionalidad de células madre en las glándulas mamarias de ratones WT y transgénicos para las isoformas de PR. ....	64
Objetivo 2 .....	74
Regulación hormonal de la población de células madre en ratones que sobre expresan una u otra isoforma del PR.....	75
Objetivo 3 .....	87
Modelo tumoral de expresión diferencial de las isoformas del PR.....	88
Expresión y localización de genes pluripotenciales .....	95
Efecto del tratamiento con E y anti estrogénos sobre las CSC del modelo T47D.....	102
DISCUSIÓN .....	109
Conclusiones finales .....	118
BIBLIOGRAFÍA .....	120

## RESUMEN EN ESPAÑOL

Regulación hormonal de la población de células stem en la glándula mamaria: rol diferencial de las isoformas del receptor de progesterona

En esta tesis se plantearon distintas estrategias para estudiar el papel de las isoformas del receptor de progesterona sobre la población de células madre de la glándula mamaria normal y tumoral. Para ello se utilizaron dos modelos: ratones transgénicos que sobre expresan la isoforma A (PR A) o B (PR B) del receptor de progesterona (PR), y la línea celular de cáncer de mama humano, T47D, y sus derivados T47D YA y T47D YB que expresan PR A y PR B respectivamente. Demostramos que tanto las glándulas mamarias de ratones transgénicos, como células de cáncer de mama humano T47D que sobre expresan PR B presentan mayor porcentaje de células positivas para marcadores de células madre. En los ratones, la ovariectomía llevó a una disminución en el porcentaje de células progenitoras luminales tanto en glándulas mamarias de ratones *wild type* como de transgénicos PR A, sin afectar a la población madre/progenitora basal. Por otra parte, ensayos con los anti estrógenos Fulvestran y Tamoxifeno demostraron que las células que sobre expresan PR B presentan resistencia a ambos tratamientos, mientras que aquellas con un incremento en la expresión de PR A son sensibles a los mismos. En el modelo tumoral la expresión de PR B se asoció a un fenotipo más maligno evaluado por la formación de mamoesferas de mayor tamaño, más irregulares, con mayor capacidad clonogénica y resistentes a terapias endocrinas.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que el balance adecuado en la expresión de las isoformas del PR es indispensable para mantener la homeostasis de la población de células madre mamarias, y que impacta también a esta población celular en el contexto tumoral. En particular, PR B jugaría un papel fundamental, indicando la relevancia de conocer si hay alteraciones en las cantidades relativas de

PR A y PR B como factor de riesgo, o pronóstico al momento de una biopsia o decisión sobre una eventual terapia endocrina.

Palabras clave: Receptor de progesterona; población madre; glándula mamaria; cáncer de mama; Fulvestran; Tamoxifeno.

## ABSTRACT

Hormonal regulation of mammary gland stem cells: differential role of progesterone receptor isoforms.

In this thesis different strategies were proposed to study the role of progesterone receptor isoforms on the population of stem cells of the normal and tumor mammary gland. For this, two models were used: transgenic mice that overexpress the A (PR A) or B (PR B) isoforms of the progesterone receptor (PR), and the human breast cancer cell line, T47D, and its derivatives T47D YA and T47D YB expressing PR A and PR B respectively. We show that both the mammary glands of transgenic mice and T47D human breast cancer cells that overexpress PR B present a higher percentage of cells positive for stem cell markers. In mice, ovariectomy led to a decrease in the percentage of luminal progenitor cells in both mammary glands of wild type and transgenic PR A mice, without affecting the basal progenitor/stem cell population. On the other hand, the antiestrogens Fulvestran and Tamoxifen demonstrated that the cells that over-express PR B present resistance to both treatments, while those with an increase in the expression of PR A are sensitive to them. In the tumor model, the expression of PR B was associated with a more malignant phenotype evaluated by the formation of irregular mammospheres of larger size, with greater clonogenic capacity and resistant to endocrine therapies.

The results obtained in this work reveal that the adequate balance in the expression of PR isoforms is essential to maintain the homeostasis of the mammary stem cell population, and that it also impacts this cell population in tumor contexts. In particular, PR B would play a fundamental role, indicating the relevance of knowing if there are alterations in the relative amounts of PR A and PR B as a risk factor, or prognostic factor, at the time of a biopsy or decision on an eventual endocrine therapy.

Key words: Progesterone receptor isoform; madre cell population; mammary gland; breast cancer; Fullvestran; Tamoxifen

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ANOVA	Análisis de la varianza
AREG	Anfiregulina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
B27	Suplemento B27
BCL2	Célula B de linfoma 2
BSA	Seroalbúmina bovina
CD24	Antígeno estable de calor
CD29	$\beta$ 1-Integrina
CD44	Glicoproteína de superficie
CD49f	$\alpha$ 6 integrina
CK14	Citoqueratina 14
CMV	Citomegalovirus
CSCs	Cancer stem cells- células madre tumorales
KDa	KiloDalton
KO	Knock out
E	Estrógeno/ Estrógenos
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
ETOH	Etanol
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
GH	Hormona de crecimiento
HRP	Peroxidasa de rabanita
ICI	Fulvestran-ICI 182,780
IgG	Inmunoglobulina gamma
kg	Kilogramo
mA	Mili Ampere
MC	Montaje Completo
MDA-MB-231	Línea celular de carcinoma mamario humano
MFS	Mamoesferas
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ l	Microlitro

mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteasa de la matriz
MMTV	Virus de tumor mamario murino
NANOG	Factor de transcripción
NFkB	Factor nuclear kappa B
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
OCT4	Factor de transcripción de unión al octámero 4
OVX	Ovariectomizado/Ovariectomía
P	Progesterona
PBS	Buffer fosfato salino
PBS-T	PBS con Tween 0.05%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Para formaldehído
PM	Peso molecular
PR	Receptor de progesterona
PR A	Isoforma A del PR
PR B	Isoforma B del PR
PRE	Elemento de respuesta a la progesterona
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	PCR en tiempo real
RANK	Receptor activador del factor nuclear B
RANKL	Ligando de RANKL
RIPA	Buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación
RPM	Revoluciones por minuto
Sca	Antígeno de células madre
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SHAM	Simulación de la OVX sin remover los ovarios
SOX2	SRY-box 2 – Región determinante del sexo Y 2
Src	Coactivador de receptores esteroideos
T47D	Línea celular humana derivada de un adenocarcinoma mamario
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAM	Tamoxifeno
TEMED	Tetrametil etileno diamina
TE	Tris-EDTA
u.a.	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
WB	Western Blot



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Marina, gracias por guiarme, apoyarme y darme el empuje necesario. Gracias por siempre aconsejarme no sólo en lo científico sino en lo personal, gracias también por darme la libertad de trabajar con confianza buscando mi propio camino. Sobre todo, gracias por aguantar todas mis ansiedades en la última etapa! Gracias por todos estos años compartidos!

Gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, donde me formé, no sólo académicamente sino como persona. Recuerdo con cariño todos los años vividos ahí.

Gracias a todos los integrantes del Roffo por abrirme las puertas. Gracias a los jefes, Alejandro, Gabriel, Ana, Andrea, Lucas, Eduardo y Giselle por siempre estar disponibles para mis consultas. Gracias Laura por ser mi Co-directora en el Roffo, por tu mano con el CBC y siempre estar dispuesta a ayudarme. Gracias Elisa por tu amor a la ciencia, por transmitirla, por siempre sugerirme ideas para los experimentos. Gracias a las chicas de inmuno por la buena onda de todos los días, Denu, Yani, Barbie, Maca, Cata y Naty. Gracias a las chicas de UTG con las que no compartí tanto pero siempre te reciben con una sonrisa, Marce, Chiari, Lucre, Flor y Jesi. y a las chicas más nuevas, Maga, Dolo y Judith por su buena onda en el tiempo que compartimos.

Gracias Darío por tu buena onda de todos los días! por hacer de becariato un lugar habitable! Gracias Leo, Sil, Ali, Gaby y Sebastián sin su ayuda esta tesis no hubiera sido posible. Gracias Mirta por siempre ayudarme con todo el papelerío.

Gracias a todos los miembros del bioterio por toda la ayuda con los ratones! Miriam, Marianela, Pao, Moni, Lily, Romi y Ezequiel.

Gracias a Becariato por existir, nunca olvidaré lo que significó en todos estos años de doctorado.

A mis queridos Roffos gracias por incluirme como una más casi al instante. Nunca me voy a olvidar de la carrera sucia que corrimos a los meses de haber entrado! Son lo más y me alegraron una etapa complicada de mi vida! Y por eso cada uno merece un agradecimiento!

Ro! Gracias por enseñarme todo en el Roffo, se que era tu obligación jaja! Gracias por tus ideas tan firmes y convicciones claras, gracias por todas las birras compartidas (como extraño Makena!!) y los RIAS jaja! Gracias por ser una amiga de fierro y siempre estar cuando lo necesite. Ahora se viene nuestro reencuentro californiano!! Yeahh!

Carito! Gracias por siempre prestarme tu oreja, por confiar en mi, por ser adorable, por tu inocencia en ciertas cosas. Gracias por tu amistad! Te adoro!

Dami, gracias por tu alegría de todos los días, becariato definitivamente no es lo mismo sin vos! Gracias por tu pasión por la ciencia que contagia, que nunca la pierdas! Gracias por siempre asesorarme con todo, desde comprar un pasaje a experimentos de laboratorio. Se te extraña un montonnn!!! Gracias por venir para mi casamiento!! Te quiero!

Lilum! Gracias por tu linda locura, sos lo mas! Gracias por siempre estar para ayudar y para escuchar!! Gracias por SNOPT!! Gracias por todas las birras! Gracias por tu musicalización de todos los viernes jaja! Sos lo más nena! Te adoro!!!

Helen!!! Como me divertía con tus locuras en becariato!! Gracias por siempre dar la nota cuando era necesario! Gracias por estar cuando lo necesite! Te deseo todo lo mejor para esta nueva etapa =)! Te quierooo!

Rocket!!! Que decirle a mi roommate! Jaja que loco que convivimos por un año, gracias por hacerme adelgazar jaja, me vendría bien de nuevo! Gracias por ser siempre auténtica, ir de frente y sobre todo por tu valentía para salir de una situación complicada! Te quiero Rocket!

Tef, Tef, Tef! Gracias por ser un compañero genial! Gracias por siempre estar ahí para dar una mano, gracias por la música compartida! Gracias

por lo mates religiosos en el Roffo, las birras y las charlas! Gracias por contrarestar a Dami jaja!

Jopete! Gracias por ser la fuente de sabiduría a donde siempre recurrir, gracias por tu amistad, tu forma de ver la vida, tu tranquilidad y entereza, gracias por salvarnos a todos de un incendio en lo de Marian! Jaja! Gracias a los dos por alojarnos en NY y toda su ayuda con las entrevistas!

Marian! Gracias por tu preocupación de madre! Gracias por la buena onda! Sos una jefa genial! Ojalá fueran todos como vos! Te quiero!

Crisa! Gracias por siempre tomarte las cosas de forma relajada por enseñarme que siempre se llega, muy importante a la hora de entregar esta tesis!

Iné!! Gracias por siempre ayudarme! Sobre todo con los ratones!! Por todos tus asados! Por todo lo compartido en el CBC! Y junto con Rocket por la mineada jaja! Te quierooooo!!.

Agus, gracias por toda la mano que me diste en este último tiempo en el Roffo y por tu buena onda de todos los días!

Gise, gracias por siempre encargarte de todos los regalos! A pesar de lo poco que compartimos aprendí a quererte mucho! Sabes que contás siempre conmigo!

Juli, gracias por los momentos compartidos, por tu alegría que contagia, por tu amor a los minions jaja!

Ampi! Gracias por toda la mano que me diste con las inmunos y con esta tesis! Gracias por siempre dispuesta a dar una mano!

También le quiero agradecer a los roffos con los que compartí muy poco pero que siempre estuvieron para compartir salidas, Ada, Saris y Gabita y a los roffos más jóvenes, Aldi, Andres, Agos, Liz no pierdan su curiosidad y su buena onda! Ojalá que becariato no se pierda, sino que se transforme.

Gracias a todos por bancarme en estos 5 años en las buenas y en las malas! Sin ustedes no estaría acá en este momento! Los adoro Roffos!

Quiero agradecer a los amigos que me dio la ciencia! Ani, Vicky, Pao, Johi! Cada una con proyectos que nos llevan a distintos lugares pero siempre está intacta la amistad! Gracias por siempre aconsejarme y apoyarme! Las adoro!!

A Nati que en esta tesis no participaste como directora, pero que siempre estuviste ahí para ayudarme en cada paso. Gracias por tu apoyo incondicional! Ojalá volvamos a trabajar juntas en algún momento! Te quieroooo!!

Mis amigas de la facu, Carito, Sol y Sonia que a pesar de las distancias, los proyectos diferentes siempre estamos para lo que necesitamos! Gracias por su amistad durante todos estos años!

A mis amigos de la vida! Guga, Ani, Dami y Tonga! Sin ustedes nada sería lo mismo! Gracias por tanto! Los voy a extrañar horrores!!

Guga hermana del alma, sabes cuanto te amo! Y a tu familia! No estar para ver crecer a Joaquin es una de las cosas que mas me duele de irme! Mas vale que hagamos mucho Skype! Y que me vengan a visitar prontito!!

A mi familia! No entran en estas páginas lo agradecida y orgullosa que estoy de la familia que tengo. A pesar de las distancias estamos mas unidos que nunca! Los amo! Mis viejos que decirles sin ustedes nada, pero nada de esto sería posible, gracias por darme su apoyo incondicional, por acompañarme en cada momento y por darme alas para volar. Vicky gracias por ser siempre mi modelo a seguir, mi compañera y confidente, que lindo que vamos a vivir cerquita de nuevo, te extrañaba horrores! Nachin! Gracias hermano por ser incondicional, por siempre cuidarme, te extraño muchisimoooo!!! Alita! Gracias por ser como una segunda madre! Por siempre estar atenta a todo y ayudarme siempre que lo necesite! Te adoro!!!

También agradecerle al resto de mi familia que siempre están ahí haciendo el aguante!

A Esti, amor mío, gracias por entregarme tu corazón, por atreverte a volver a amar, por acompañarme en esta nueva etapa, en este proyecto que es nuestro. Gracias por amarme sin vueltas, como soy, con mis defectos, yo lo hago de la misma manera. Gracias por cuidarme y bancarme! Juntos en las buenas y en las malas! Todo lo que nos propongamos podemos conseguirlo juntos! Te amo sin principio ni final. Gracias también por darme unos suegros geniales! Gracias Norber y Rosa por adoptarme como una hija mas! Los adoro!

“Como te explico lo esencial de tu existencia para mi”

# INTRODUCCIÓN

➤ Glándula mamaria:

La glándula mamaria es un órgano complejo que presenta dos compartimentos. Por un lado se encuentra el parénquima funcional formado por un epitelio dinámico que sufre variaciones durante toda la vida, debido a los sucesivos ciclos de proliferación, diferenciación y apoptosis regulados hormonalmente (Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW 2000). El mismo está compuesto por células luminales y mioepiteliales. Las primeras son las que se diferenciarán en el epitelio secretor durante la lactancia y las segundas estimularán la contracción local para la secreción de leche. Por otro lado se encuentra el estroma conformado por fibroblastos, adipocitos y células del sistema inmune que forman la almohadilla grasa subcutánea o "fat pad" (Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW 2000).

Las células luminales y mioepiteliales, rodeadas por su membrana basal, se distribuyen espacialmente de forma muy peculiar, generando la estructura arbórea característica de la glándula mamaria, compuesta por alvéolos (las unidades productoras de leche) interconectados por ductos (que conducen la leche hasta el pezón). Cada grupo de alvéolos se denomina lóbulo y, junto con el ducto colector que sale del mismo, constituyen la unidad funcional básica de la mama, llamada unidad terminal ducto-lobular. El crecimiento lateral de los ductos se debe al crecimiento y la división de los brotes terminales (TEB) a partir de ductos primarios y secundarios. Los brotes terminales luego dan origen a nuevos ductos primarios (Sternlicht 2005). La figura 1 muestra la estructura de la glándula mamaria.

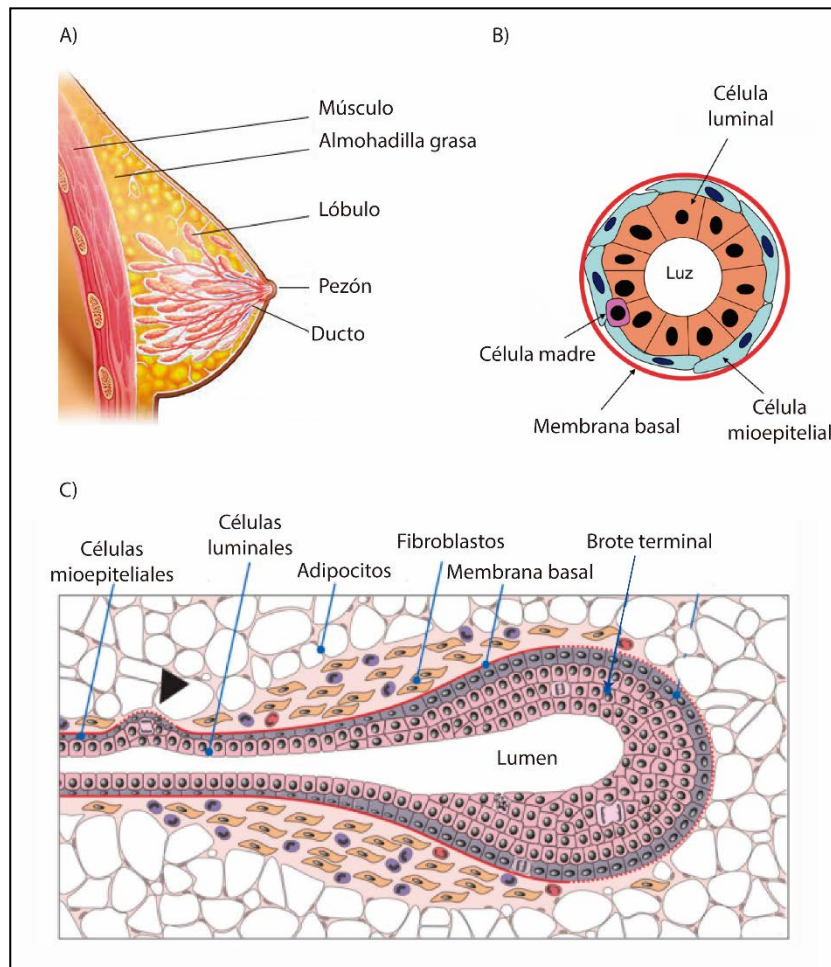


Figura 1. Glándula mamaria. A) Estructura de la glándula mamaria humana. Se observa la estructura de ductos que finalizan en lóbulos sumergidos en la almohadilla grasa. B) Corte transversal de un ducto. Cada ducto está formado por una capa de células luminales que miran a la luz. Por debajo se encuentran las células mioepiteliales que se encargan de la acción contráctil. Rodeando el ducto se encuentra la membrana basal. C) Corte longitudinal de un brote terminal. Los ductos se encuentran rodeados por el estroma de la glándula mamaria formada por tejido graso(adipocitos), fibroblastos, vasos sanguíneos e infiltrado del sistema inmune. Modificado de (Sternlicht 2005).

La glándula mamaria es el único órgano que se desarrolla casi por completo después del nacimiento (Briskin C 2006) y su morfología se va modificando durante las distintas etapas del desarrollo. Desde el nacimiento hasta la pubertad el crecimiento es mínimo, dado por ductos rudimentarios. Al comienzo de la pubertad, con el advenimiento de las hormonas ováricas (Estrógeno (E) y Progesterona(P)), la diferenciación de la glándula mamaria se activa, caracterizándose por una rápida extensión y ramificación del sistema de ductos (Lamote I, Meyer E, Massart-Leën AM 2004). En esta etapa los ductos llegan hasta el extremo de la almohadilla grasa donde se forman los brotes



terminales. Durante la preñez, la P junto con las hormonas hipofisarias prolactina y hormona de crecimiento (GH) median el aumento de la complejidad de las ramificaciones la formación de los alveolos, que llegan a su máxima diferenciación durante la lactancia, formando un epitelio secretor que ocupa la almohadilla grasa por completo (Briskin C 2006; Lamote I, Meyer E, Massart-Leën AM 2004). Al término de la lactancia comienza un proceso complejo de remodelado de la glándula, denominado involución, que se caracteriza por una extensiva apoptosis de las células del epitelio secretor, junto con el remodelado de la matriz extracelular y su reemplazo por tejido adiposo (Bracke and Wever 2011). El mismo está mediado por metaloproteasas de matriz (MMPs) que se encargan de degradar la matriz extracelular (Talhok, Bissell, and Werb 1992). Cuando finaliza la involución, la glándula mamaria presenta una morfología similar a la de una hembra virgen (Watson 2006; Radisky and Hartmann 2009; Andrechek et al. 2008). La figura 2 muestra el desarrollo mamario de un ratón y la participación de las hormonas durante este proceso.

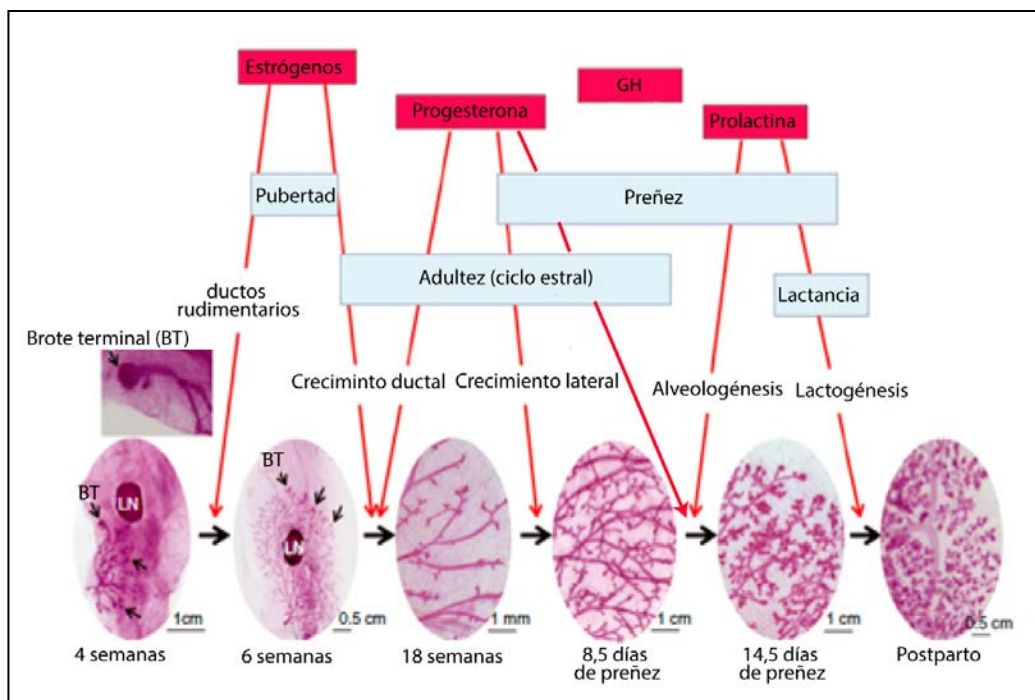


Figura 2. Desarrollo de la glándula mamaria de ratón. Se observa, por medio de montajes completos, cómo se desarrollan los ductos a medida que van transcurriendo

las distintas etapas del desarrollo y como interfieren las hormonas en cada momento. Modificado de (Briskin and Ataca 2015).

Los E y la P estimulan la proliferación del epitelio luminal actuando de manera indirecta sobre las células sensoras, no proliferativas, positivas para sus receptores (Tanos et al. 2012; Briskin and Ataca 2015). Estas células abarcan entre un 20-30% de las células luminales y se encuentran intercaladas entre las células respondedoras negativas para los receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR). Se han descrito distintos factores paracrinos que median el efecto de cada una de estas hormonas; en el caso del E sería la anfiregulina a través de su receptor EGFR mientras que para la P se han descrito como principales mediadores a Wnt4 y RANKL (Tanos et al. 2012). La figura 3 explica el mecanismo de acción de la P.

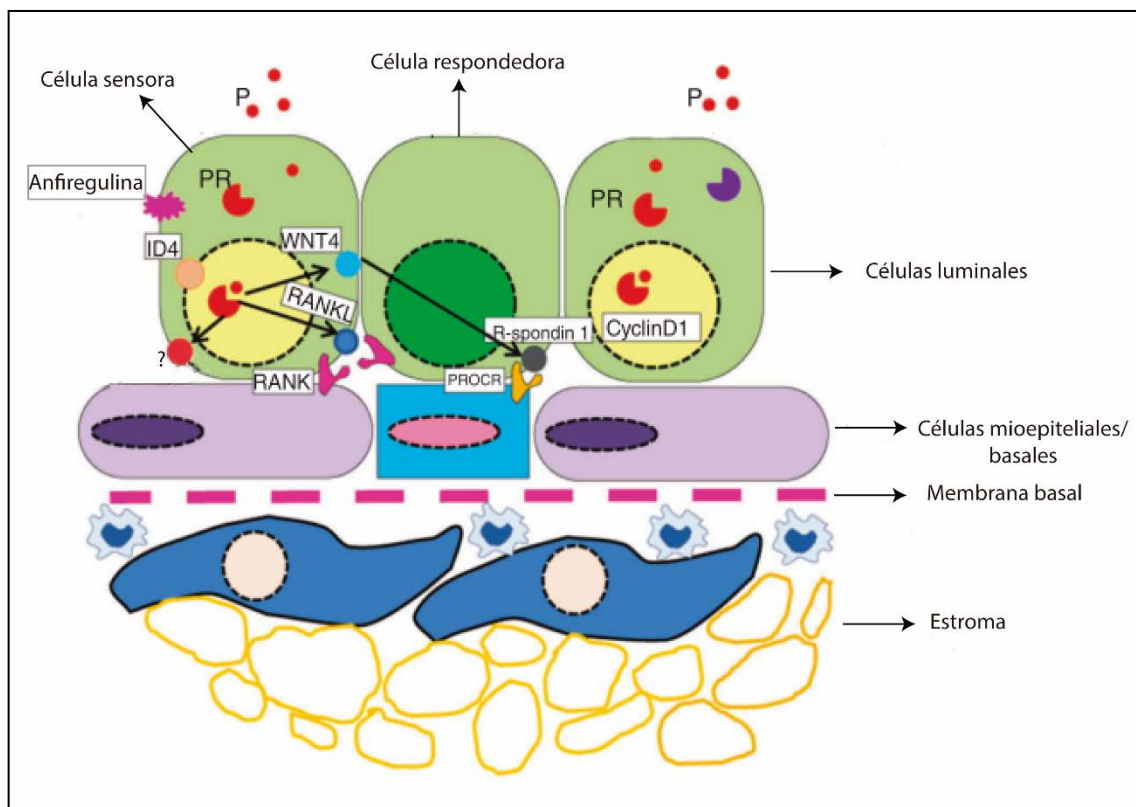


Figura 3. Modelo de la acción de P sobre el epitelio mamario. La P estimula a las células sensoras (positivas para PR) llevando a la secreción de distintos factores paracrinos que generan la respuesta biológica en las células respondedoras (negativas para PR). La vía de acción es similar para los E. Modificada de (Briskin and Ataca 2015).

➤ Receptor de Progesterona:

El PR pertenece a la superfamilia de los receptores esteroideos nucleares, junto con otros receptores, como el de estrógenos (Edwards1 2013). En el tejido mamario normal, tanto de humanos como de ratones, el PR media los efectos de la P, entre ellos, promover la proliferación de las células epiteliales (Edwards1 2013). Elevados niveles de expresión del PR se asocian con el extremo del ducto creciente o brote terminal (Aupperlee et al. 2005). Una vez alcanzada la madurez sexual las células epiteliales que dan origen a las estructuras lóbulo-alveolares también expresan altos niveles de PR. El estroma de la glándula mamaria es negativo para PR (Patricia A. Mote et al. 2006).

La vía clásica de acción del PR involucra la unión al ligando en el citoplasma, que induce fosforilaciones que lo liberan de las chaperonas, responsables de su estabilidad en dicho compartimento. Una vez liberado dimeriza, trasloca al núcleo y regula a sus genes blanco (Graham et al. 1995). Los promotores de los genes blanco de PR presentan los sitios PRE, que son secuencias específicas de ADN (*enhancers*) donde se une PR. Además PR activa vías de señalización no genómicas al interactuar con la P en citoplasma o membrana plasmática (Boonyaratanakornkit et al. 2001; Lange, C 2008). Se ha descrito la presencia de un motivo rico en prolina (PXXPXR), que permite la interacción con el dominio SH3 de la proteína tirosina quinasa Src llevando a la activación de la cascada de señalización de MAPK (Boonyaratanakornkit et al. 2001, 2008, 2017). Por otro lado, se ha demostrado que PR tiene actividad en ausencia de ligando (Lange et al. 1998; Hagan et al. 2011).

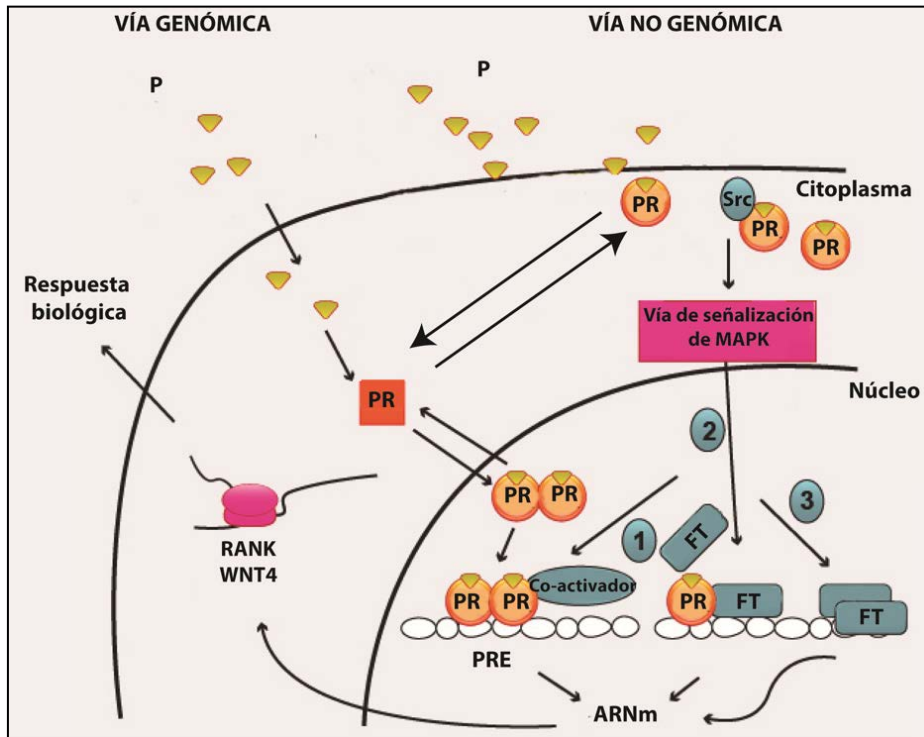
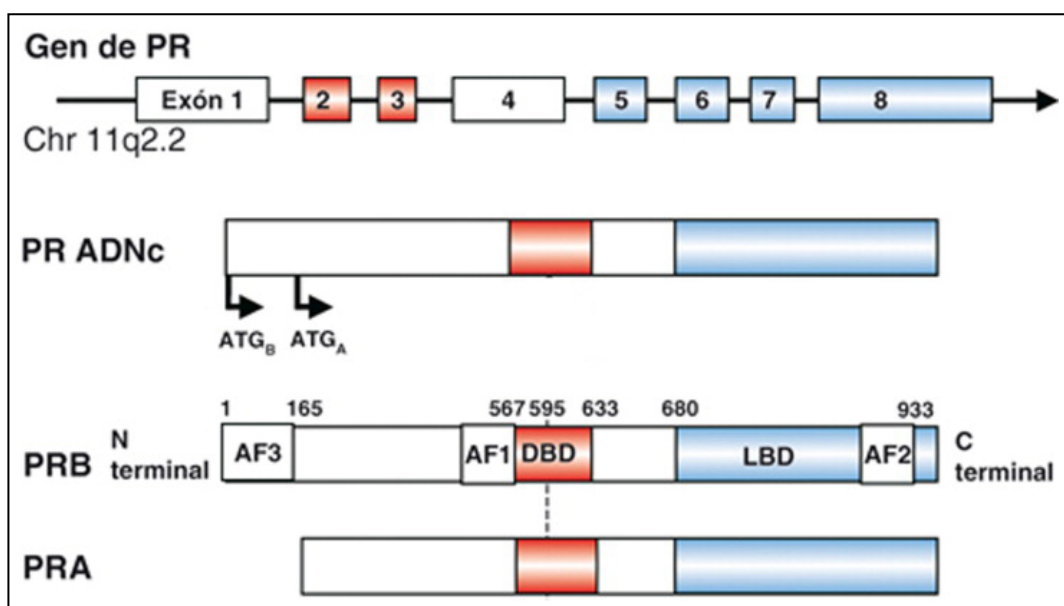


Figura 4. Esquema de las vías de señalización posibles para PR. Se muestran la vía genómica, la no genómica. Modificado de <https://endocrinologiaginecologica.blogspot.com.ar/2012/05/?view=classic>.

El PR presenta dos isoformas, la isoforma A (PR A) y la isoforma B (PR B) cuya expresión es regulada por la presencia de dos promotores alternativos en un único gen (Aupperlee et al. 2005; Kariagina, Aupperlee, and Haslam 2010). La figura 5 muestra la estructura del gen



de PR.

Figura 5. Esquema de la estructura del receptor de progesterona. Se muestra el gen de PR, seguido por el ADNc con los dos promotores alternativos y ambas isoformas PR B y PR A. Modificado de (Chabbert-Buffet 2009).

PR A y PR B presentan una estructura similar excepto por 164 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal de la isoforma B (Kraus, Montano, and Katzenellenbogen 1993). Este dominio le proporciona actividad diferencial que está dada por la interacción con co-reguladores específicos (Giangrande et al. 2000; C A Sartorius et al. 1994).

En presencia de ligando PR A se encuentra asociado a funciones de represión génica, mientras que PR B es un transactivador más potente. En este sentido PR A es capaz de reprimir tanto la actividad de PR B como la del ER (Clark and McGuire 1983; Jacobsen et al. 2005). En cambio, en ausencia de ligando PR A es la isoforma más activa (Jacobsen et al. 2005).

La cantidad relativa de cada isoforma varía en distintos tejidos, sugiriendo que una apropiada expresión diferencial de cada una es crítica para una adecuada respuesta a la P. En la glándula mamaria humana ambas isoformas se expresan en niveles similares (PR A:PR B es 1:1) (P. A. Mote et al. 2002), mientras que en ratones desde el nacimiento hasta la pubertad PR A es la isoforma dominante (3:1), y al momento de la preñez este balance se invierte (Schneider et al. 1991; Kariagina, Aupperlee, and Haslam 2008).

Estudios realizados con ratones knock out (KO) para PR A o PR B muestran diferentes funciones para cada isoformas en mama y endometrio (Mulac-Jericevic et al. 2003, 2000). Ratones KO para PR A son infértiles por fallas en el desarrollo del endometrio, mientras que el desarrollo de la glándula mamaria es normal indicando que PR B es suficiente para que la glándula mamaria se desarrolle normalmente (Conneely and Lydon 2000). Ratones KO para PR B desarrollan normalmente el endometrio, mientras que la glándula mamaria no se desarrolla normalmente y presenta aberraciones durante la

alveologénesis, indicando el papel diferencial de PR B sobre este proceso (Mulac-Jericevic et al. 2003).

Todas estas observaciones sugieren que un desbalance en el cambio de la expresión o actividad de las isoformas del PR pueden tener consecuencias tanto en el desarrollo normal de la glándula mamaria como en la génesis de tumores de mama.

#### ➤ Receptor de Estrógenos:

Los ERs también son proteínas pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares. Existen dos receptores de estrógenos: el ER $\alpha$  (Walter et al. 1985) y el ER $\beta$  (Kuiper et al. 1996), que se expresan a partir de distintos genes ubicado en diferentes cromosomas y cumplen diversos roles en distintos tejidos (Pelekanou and Leclercq 2011). En esta tesis analizaremos en detalle las vías de señalización mediadas por ER $\alpha$ .

Se conocen varias isoformas del ER $\alpha$ , entre las cuales se encuentra la isoforma canónica de 66 kDa. Se han caracterizado también isoformas de menor peso molecular, producto del uso de promotores alternativos o de *splicing* alternativo, como la de 46 kDa, la cual no posee los primeros 173 aminoácidos (Greene et al. 1986; Flouriot et al. 2000).

EL ER, al igual que PR, actúa a través de distintas vías de señalización: la vía genómica directa incluye la activación por su ligando el E, la homodimerización del ER $\alpha$  y la posterior translocación al núcleo donde se unirá de manera directa a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) para la modulación de la expresión génica.

En el mecanismo no genómico el E interactúa con un receptor asociado con la membrana a través de una palmitoilación, que lo ancla a la misma (Razandi et al. 2002; Heldring et al. 2007). De esta manera se inicia una cascada de señalización mediante segundos mensajeros que conducen finalmente a una respuesta fisiológica rápida (Heldring et al. 2007).

La vía independiente de ligando incluye la activación a través de otras vías de señalización, como la señalización por factores de crecimiento. En este caso, proteínas quinasas activas fosforilan al ER $\alpha$ , promoviendo su dimerización y posterior unión al ADN para modular la expresión génica (Giuliano, Trivedi, and Schiff 2013).

La figura 6 muestra los mecanismos de acción del ER $\alpha$ .

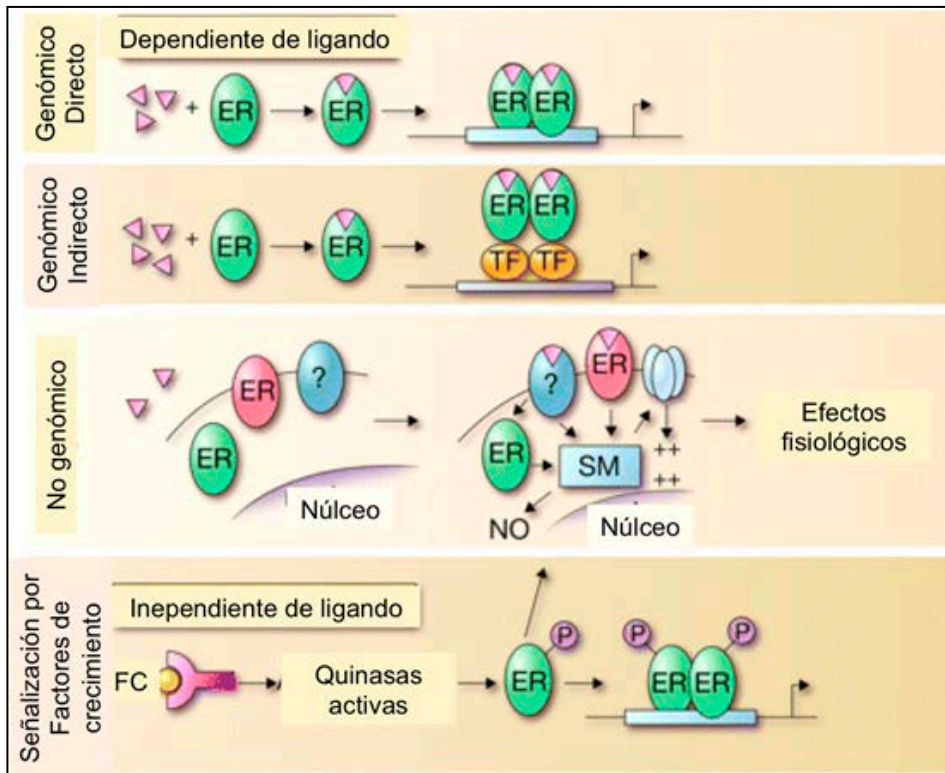


Figura 6. Vías de señalización del ER $\alpha$ . Se representan las distintas vías de acción conocidas. SM: segundos mensajeros. FC: factores de crecimiento. Modificado de (Heldring et al. 2007).

El ER $\alpha$  media el efecto de los E en sus tejidos blanco, entre ellos la glándula mamaria. Ratones KO para dicho receptor no presentan desarrollo de los ductos característico de la pubertad (Briskin and O'Malley 2010). Resulta particularmente interesante que ratones KO para anfiregulina (AREG) muestran el mismo fenotipo que los ratones KO para ER. A partir de esto se describió a AREG como una de las principales vías paracrinias por la cual los E median su efecto proliferativo en el epitelio mamario (Tanos et al. 2012; Briskin and Ataca 2015). El receptor de AREG, EGFR se expresa sólo en células del estroma,

por lo que existe una interacción entre las células luminales sensoras (ER+), el estroma y las células luminales respondedoras(ER-). Los factores FGF7 y FGF10 fueron propuestos como los mediadores entre el estroma y las células respondedoras en respuesta a la activación de EGFR (Tanos et al. 2012).

Por último, se ha descrito que los E regulan la expresión de PR. El tratamiento con estradiol en ratones OVX lleva a un aumento de la expresión de PR A sin alterar PR B, mientras que el tratamiento con P o E+P llevan a una disminución de PR A y un aumento de PR B. (Aupperlee and Haslam 2007).

➤ Organización jerárquica de la glándula mamaria:

Desde hace décadas que distintas evidencias sugieren que la glándula mamaria es mantenida por una pequeña población de células madre o "stem", con la capacidad de diferenciarse en los tres linajes que la constituyen: luminal, alveolar y mioepitelial (J E Visvader and Smith 2011).

Las células madre adultas son células multipotenciales y tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares y regenerar por completo un tejido, a diferencia de las células madres embrionarias que son pluripotenciales y pueden diferenciarse en cualquier tejido (D'Angelo and Wicha 2010). La glándula mamaria presenta entonces una jerarquización a partir de células madre multipotenciales, que se caracterizan por ser negativas para receptores esteroideos ER y PR (Clayton, Titley, and Vivanco 2004; Asselin-Labat et al. 2006; Simões and Vivanco 2011), y que a medida que se diferencian generan las células progenitoras (uni o bipotenciales) de cada linaje. La siguiente figura muestra cómo sería esta jerarquización.



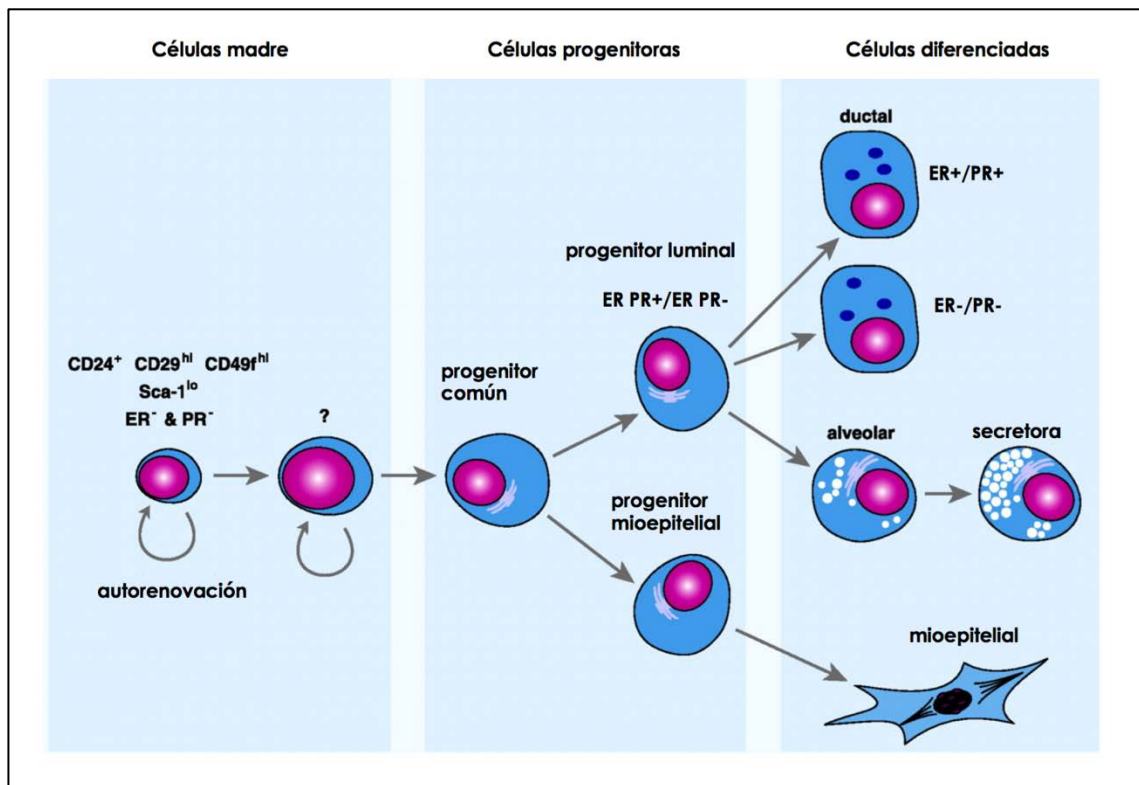


Figura 7. Modelo de células madre. Jerarquización a partir de una célula madre mamaria adulta hasta los tres linajes que componen el epitelio. Adaptado de (Jane E. Visvader and Lindeman 2006).

Las células madre mamarias presentan distintas propiedades que las hacen únicas y permiten identificarlas, entre ellas:

- ✓ Quiescencia: durante la mayor parte de la vida las células madre mamarias se encuentran en un estado de quiescencia en el cual se dividen muy lentamente de forma simétrica, manteniendo la integridad de su ADN (N. Fu, Lindeman, and Visvader 2014). Su baja tasa de división les confiere la habilidad de retener marcadores a lo largo del tiempo (Shackleton et al. 2006). Estas células son capaces de activarse, por ejemplo, frente a los cambios hormonales durante la pubertad y la preñez, coincidentes con momentos de expansión del árbol mamario (Joshi et al. 2010). Las células madres son necesarias para el mantenimiento del árbol mamario durante toda la vida.

✓ División asimétrica y capacidad de autorenovación: las células madre pueden dividirse de manera simétrica generando dos células hijas iguales o puede dividirse de manera asimétrica generando una célula hija idéntica (autorenovación) y una célula progenitora que se diferenciará. De esta manera la célula madre da lugar a células progenitoras de un linaje determinado (D'Angelo and Wicha 2010).

✓ Marcadores de superficie: las células madre expresan proteínas de membrana que permiten identificarlas, pero dada la similitud con las células progenitoras que derivan de estas ha sido difícil encontrar aquellas marcas que las diferencien de manera inequívoca. Los marcadores más utilizados para identificar las células madre de glándula mamaria de ratón son CD24 (antígeno estable de calor) (Sleeman et al. 2005) y CD29 ( $\beta$ 1 integrina) (Shackleton et al. 2006; Asselin-Labat et al. 2010) que permiten separar la población basal enriquecida en células madre de la población progenitora luminal. Estas marcas no permiten diferenciar entre las células madre y las células progenitoras basales, siendo la población enriquecida en células madre CD24<sup>+</sup>CD29<sup>hi</sup> (Joshi et al. 2010; Shackleton et al. 2006; Asselin-Labat et al. 2010; Rios et al. 2014; N. Y. Fu et al. 2017). Otros marcadores se usan en combinación con los anteriores para aislar únicamente o con mayor pureza las células madre. Estos son CD49f ( $\alpha$ 6 integrina) (Joshi et al. 2010; Hilton, Clarke, and Graham 2017) y Sca1 (antígeno de células madre 1) (Sleeman et al. 2007). Es importante a la hora de evaluar los marcadores para células madre provenientes de la glándula mamaria completa separar la población correspondiente al infiltrado inmune que puede contener células positivas para estos marcadores y considerarlas por error. Para separar estas poblaciones se utiliza la marca Lin que contiene los marcadores: CD45, Ter119 que identifican células

hematopoyéticas, y CD31 a las células endoteliales (Stingl et al. 2006).

✓ Crecimiento independiente de anclaje: las células madre/progenitoras tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones no adherentes y en ausencia de SFB formando esferas (Dontu, Al-Hajj, et al. 2003). Bajo estas condiciones las células diferenciadas mueren por "anoikis", que es una forma de apoptosis por falta de anclaje (Dontu, Al-Hajj, et al. 2003; S. Liu, Dontu, and Wicha 2005). El ensayo de formación de mamoesferas (MFS) es un indicador funcional de la capacidad de auto-renovación de las células madre/progenitoras (Dontu, Al-Hajj, et al. 2003; S. Liu, Dontu, and Wicha 2005; Tosoni et al. 2012). Las MFS surgen a partir de una célula madre/progenitora que comienza a dividirse de manera asimétrica y así diferenciarse. Las sucesivas divisiones dan lugar a una esfera formada por células con distintos grados de diferenciación (Dey et al. 2009). Sucesivos pasajes de las MFS llevan a la pérdida de la capacidad stem dado que se incrementa el número de células más diferenciadas que pierden la capacidad de sobrevivir bajo estas condiciones (S. Liu, Dontu, and Wicha 2005; Dey et al. 2009). Dentro de las poblaciones que conforman la glándula mamaria, se ha reportado que no sólo las células madre son capaces de dar origen a las MFS, sino que también las células progenitoras basales y luminales tienen esta capacidad (Dong et al. 2013).

✓ Expresión de genes pluripotenciales: Las células madres se caracterizan por expresar genes que mantienen este fenotipo, entre ellos los más importantes son los factores de transcripción SOX2, OCT4 y NANOG que regulan la capacidad de autorenovación de las células madre embrionarias y adultas (Hassiotou et al. 2013).

✓ Repoblación de la almohadilla grasa: una célula madre tiene la capacidad de regenerar el árbol mamario completo

cuando se coloca en la almohadilla grasa clareada de un ratón aceptor. Esta técnica se considera el "gold standard" para detectar células madre mamarias (Kordon and Smith 1998; Shackleton et al. 2006).

En 2010 fueron publicados dos trabajos en la revista Nature que investigaron el papel de estas hormonas ováricas en la regulación de las células madre de la glándula mamaria murina (Joshi et al. 2010; Asselin-Labat et al. 2010). Ambos determinaron que la P estimula la expansión de la población de células madre a través de mecanismos paracrinós. Joshi y colaboradores describen que durante el ciclo estral el reservorio de células madre se modifica en cada etapa por los cambios hormonales que se presentan durante el mismo. El pico máximo de células madre coincide con la etapa diestro donde se da el pico de P (Joshi et al. 2010). Por otro lado, Asselin-Labat y colaboradores confirman que el reservorio de células madre aumenta hasta 24 veces durante la preñez respecto de una hembra virgen y que este aumento está asociado a los niveles de P circulantes (Asselin-Labat et al. 2010). Por otro lado, los E también jugarían un papel importante en esta regulación dado que tanto la ovariectomía como el tratamiento durante 3 semanas con Letrozole (inhibidor de aromatasa) llevó a una disminución en la población luminal mientras que la basal no se vio alterada en número, pero sí en función, disminuyendo su capacidad de repoblamiento de la almohadilla grasa (Asselin-Labat et al. 2010).

Como se mencionó previamente, las células madre son negativas para PR y ER, por lo que los efectos inducidos por P y E son indirectos y mediados por las células sensoras. En este sentido se caracterizó a RANKL como el mediador de este efecto, dado que ensayos con anticuerpos bloqueantes de RANKL evitaron la expansión de la población de células madre mediada por P (Asselin-Labat et al. 2010). Por otro lado, un trabajo en 2015 indica que Wnt4 jugaría un papel importante en el mantenimiento de la población de células madre bajo la regulación parcial de PR (Rajaram et al. 2015).

Por último, las células madre han sido asociadas al desarrollo de cáncer de mama, ya que por sus características serían sensibles a sufrir mutaciones que llevarían a la formación de tumores (Wicha 2008; Korkaya, Liu, and Wicha 2011). Además, serían las responsables de la adquisición de resistencia a los tratamientos en esta patología (M. Al-Hajj et al. 2003; Phillips, McBride, and Pajonk 2006; Bunting 2002; Tiberio et al. 2002; Simões et al. 2015).

En esta tesis nos enfocaremos en estudiar el impacto del desbalance en los niveles de expresión de las isoformas del PR en la regulación de las células madre.

#### ➤ Cáncer de mama

El cáncer se define como una enfermedad neoplásica con transformación de las células, que proliferan de manera anormal y descontrolada. Una neoplasia es un crecimiento anormal de un tejido, producto de la pérdida de regulación de la proliferación celular. Se denomina tumor benigno a aquella masa celular que prolifera dentro de límites determinados, sin invadir tejidos adyacentes. Tumor maligno, o cáncer, es aquel que tiene la capacidad de invadir tejidos adyacentes y, por tanto, la potencialidad de diseminarse.

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en las mujeres a nivel mundial y de acuerdo con lo que informa la Organización Mundial de la Salud (WHO, facts-sheet, [www.who.int/](http://www.who.int/)) es la quinta causa de muerte debida a tumores en el mundo. Se estima que 1 de cada 8 mujeres entre los 20 y los 70 años de edad padecerá cáncer de mama (Bray et al. 2013). Existen muchos factores de riesgo descritos asociados a esta enfermedad. Entre ellos, la actividad prolongada de los ovarios (por una menarca temprano o una menopausia tardía) aumenta significativamente el riesgo de tener cáncer de mama (Hilton, Graham, and Clarke 2015). Por otro lado, tratamientos hormonales prolongados como las terapias de reemplazo hormonal aumentan el riesgo (Henderson and Feigelson 2000). Ambos

fenómenos se deben a que tanto los E como la P actúan como mitógenos sobre el epitelio mamario y la exposición prolongada puede llevar a la desregulación del ciclo celular (Henderson and Feigelson 2000; Lanari et al. 2009; Hilton, Graham, and Clarke 2015). Además, factores ambientales y/o estilo de vida (consumo de tabaco, drogas y alcohol principalmente) también aumentan el riesgo de desarrollar esta enfermedad.

En la figura 8 se muestra un ejemplo de tinción inmunohistoquímica que denota cómo el desarrollo de un tumor afecta completamente la organización celular de los ductos mamarios.

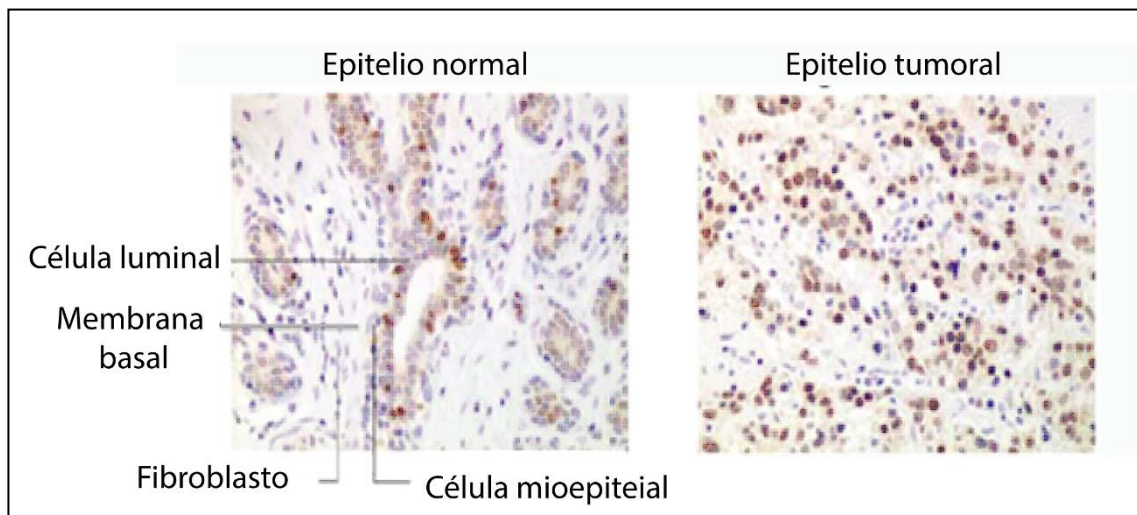


Figura 8. Cortes histológicos. Se muestra la diferencia entre la histología de una mama normal (izq) bien organizada en ductos y tumoral (der) totalmente desorganizada. Modificado de (Ali and Coombes 2002).

El 75% de los tumores de mama diagnosticados son positivos para ER y PR. El tamoxifeno (TAM), un modulador selectivo del ER, ha sido la terapia de elección durante las últimas tres décadas (Jordan 2014). Hoy en día se cuenta con otras alternativas terapéuticas como el Fulvestran (ICI 182,780; ICI) (Alan E Wakeling, Dukes, and Bowler 1991; A. E. Wakeling 2000) un anti estrógeno “puro” y los inhibidores de aromatasa como el Lestrozole (Brodie, Macedo, and Sabnis 2010).

El TAM es un análogo estructural del E capaz de competir por el sitio de unión al ER, con similar afinidad por el mismo (Fabian, Tilzer, and

Sternson 1981). La unión de TAM lleva al reclutamiento de co-represores, anulando la expresión de genes de supervivencia y promoviendo el arresto o muerte celular (Jordan 2014). En estas condiciones ER no es ubiquitinado y, por lo tanto, no es enviado para su degradación en el proteasoma, permaneciendo disponible para unirse nuevamente a TAM o E. La actividad de TAM puede ser antagonista o agonista dependiendo de la abundancia relativa de las distintas isoformas del ER y del contexto celular en que se encuentren (Jordan 2014). Existen también anti estrógenos “puros” que tienen actividad antagonista exclusivamente, como el Fulvestran o ICI 182,780 (ICI) (Alan E Wakeling, Dukes, and Bowler 1991). El ICI induce la degradación del ER por el proteasoma, bloqueando por completo su acción (Alan E Wakeling, Dukes, and Bowler 1991; A. E. Wakeling 2000). La siguiente figura muestra los distintos modelos de acción del E, el TAM y el ICI.

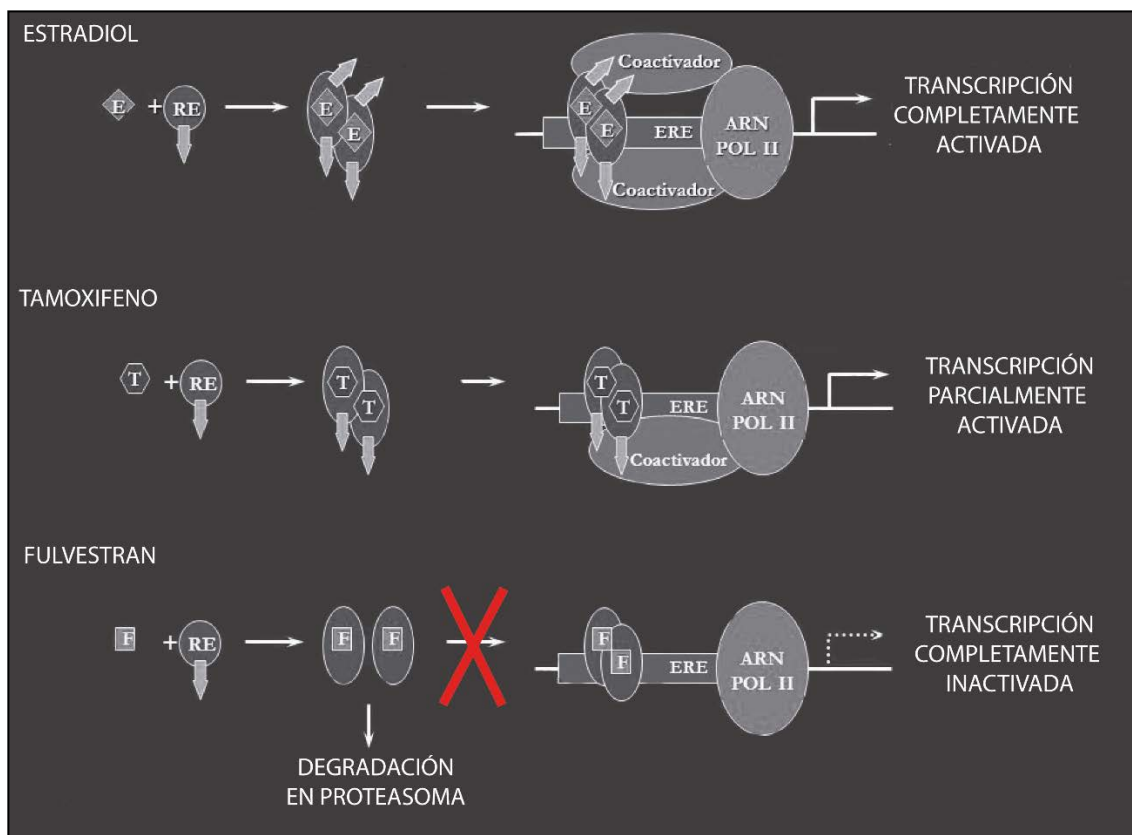


Figura 9. Mecanismos de acción de agonistas y antagonistas del ER. Se muestra la acción del E, que al unirse a su receptor es capaz de activar la transcripción de sus genes blanco. El TAM se une al receptor, pero recluta distintos co-reguladores activando la transcripción de sólo algunos genes blanco. El Fulvestran al unirse al

receptor induce su degradación en el proteasoma. Modificado de (A. E. Wakeling 2000).

Por otro lado, también se utilizan inhibidores de aromatasa que bloquean directamente la producción endógena de estradiol, inhibiendo el último paso de su síntesis: la aromatización a partir de andrógenos (Chumsri and Brodie 2012). De esta manera evitarían la señalización a través de ER. Estos inhibidores han sido utilizados en la clínica con buenos resultados en pacientes post menopáusicas con tumores positivos para ER, aunque la adquisición de resistencia sigue siendo el desafío en todos estos tratamientos (Bradley et al. 2015)(Hilton, Clarke, and Graham 2017).

#### PR en cáncer:

El balance de las isoformas del PR se encuentra generalmente alterado en cáncer de mama. Tumores con sobre expresión de una u otra isoforma llevan a fenotipos más agresivos que aquellos con expresión similar (Bonneterre et al. 2016). Distintos trabajos reportan la importancia de diferenciar entre las isoformas del PR a la hora de un tratamiento para tumores de mama positivos para PR.

En el trabajo de Hopp y colaboradores, en el que utilizan muestras de 300 pacientes con metástasis en ganglio axilar, indican que aquellos pacientes con mayor expresión de PR A tienen 3% más de probabilidad de recaer luego de la terapia endócrina (Hopp et al. 2004). Sin embargo, trabajos más recientes como el de Pathiraja y colaboradores que utilizaron 1000 muestras de pacientes (500 tratados con TAM y 500 sin tratar) muestran que el silenciamiento de PR A correlaciona con peor pronóstico (Pathiraja et al. 2011). Por otro lado, el trabajo de Bonetterre y colaboradores con 800 muestras de tumores de mama humanos indican que el desbalance tanto hacia una isoforma o la otra lleva a tumores más agresivos comparado con tumores que expresan niveles similares de ambas isoformas (Bonneterre et al. 2016). Además, encontraron que tumores que expresan sólo PR B están asociados con



estadios más avanzados de la enfermedad (Bonneterre et al. 2016). Por último, un trabajo muy reciente de Rojas y colaboradores demuestran que pacientes con tumores con mayor expresión de PR B presentan mayor tamaño, mayor grado histológico y que además son resistentes a terapias con anti progestágenos al ser tratados *in vitro* (Rojas et al. 2017).

Trabajos en modelos de líneas celulares (T47D y MDA-MB-231) indican que sobre expresar PR B lleva a fenotipos más agresivos y resistentes a terapias endocrinas (Sequeira et al. 2014; Bellance et al. 2013). Es necesario profundizar en los mecanismos de acción de cada isoforma del PR para entender su rol en carcinogénesis.

#### Células madre en cáncer:

Existen distintas teorías sobre el inicio de un tumor; por un lado se ha postulado la teoría estocástica, que indica que cualquier célula somática de un tejido puede sufrir alteraciones o mutaciones que la lleven a proliferar descontroladamente iniciando un tumor (Dick 2008). Por otro lado, la teoría de las células madres tumorales o “cáncer stem cells” (CSCs) propone que es una célula madre normal la que sufre alteraciones o mutaciones que llevan a la formación de un tumor (Dick 2008). En la glándula mamaria, esta última es la teoría más aceptada, debido a evidencias que indican que estos tumores también presentan una jerarquización, es decir que no cualquier célula del tumor es capaz de regenerar el tumor entero (M. Al-Hajj et al. 2003). La figura 9 esquematiza la teoría de las CSC.

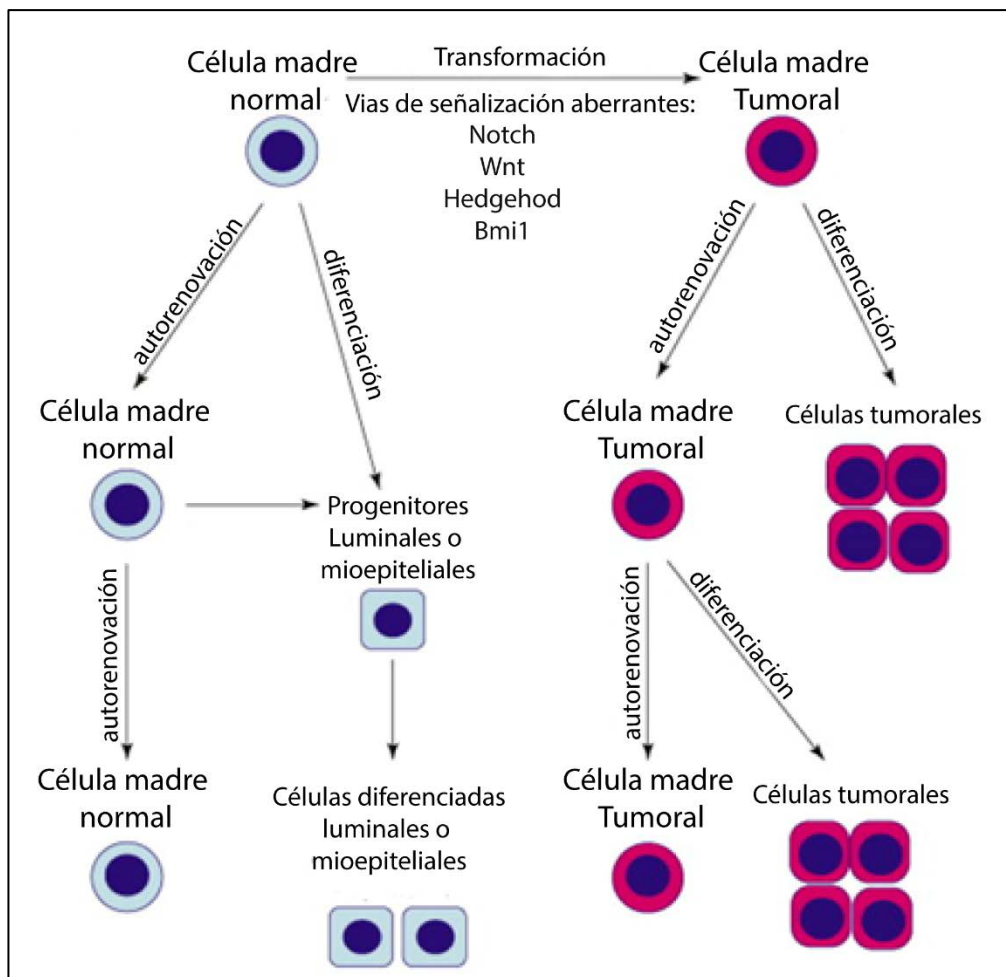


Figura 10. Teoría de las células madre tumorales. Hipótesis sobre la aparición de cáncer de mama a partir de alteraciones en células madre normales. Modificado de (Klonisch et al. 2008).

Para identificar a las CSCs en humanos se utilizan principalmente los marcadores CD44 (glicoproteína de superficie) y CD24 (antígeno estable de calor) siendo esta población  $CD24^{-/low} CD44^{+}$  (M. Al-Hajj et al. 2003; Muhammad Al-Hajj and Clarke 2004; Simoes et al. 2015; Rong Liu et al. 2016; Goyette et al. 2017). Se ha reportado que las células con este fenotipo son capaces de regenerar el tumor mientras que las células restantes no son tumorigénicas (M. Al-Hajj et al. 2003). Además este fenotipo se ve asociado a la capacidad de formar MFS (Li et al. 2008), alta expresión de los genes stem SOX2, OCT4 y NANOG (Simões et al. 2011). Por último, tumores triple negativos presentan mayor cantidad de

células con este fenotipo, asociándolo con un peor pronóstico (R Liu et al. 2007).

Las CSCs han sido asociadas a resistencia a quimioterapias, radioterapias y terapias endocrinas. Este fenómeno estaría dado por la expresión de transportadores de membrana que se encargan de expulsar los agentes quimioterapéuticos fuera de la célula (Bunting 2002; Cojoc et al. 2015) y por expresar altos niveles de moléculas anti apoptóticas como BCL2 (Tiberio et al. 2002). Phillips y colaboradores demostraron que células con el fenotipo CD24<sup>-/low</sup> CD44<sup>+</sup> en distintas líneas celulares de cáncer de mama son resistentes a la radioterapia (Phillips, McBride, and Pajonk 2006). Además, las CSCs serían negativas para receptores hormonales y al diferenciarse generarían tumores positivos para los mismos (Wicha, Liu, and Dontu 2006; Simões and Vivanco 2011; Simões et al. 2015). Esta teoría propone una manera de explicar por qué tumores que empiezan siendo sensibles a una terapia luego presentan resistencia (Dontu, Al-Hajj, et al. 2003; Wicha, Liu, and Dontu 2006; Simoes et al. 2015). La adquisición de resistencia y el desarrollo de metástasis son la principal causa de muerte por cáncer de mama. Estudiar la biología de las células madre normales y de las CSCs ayudará a plantear nuevas estrategias contra este tipo de tumores que incluyan terapias que destruyan no sólo a la masa tumoral sino a las células madre que la mantienen.

➤ Antecedentes:

Para poder estudiar en el contexto mamario normal el impacto del desbalance de cada una de las isoformas del PR la Dra. Shyamala Harris creó animales transgénicos que sobre expresan PR A o PR B ( Shyamala et al 1998; Shyamala et al. 2000). Sus trabajos demuestran que la sobre expresión de PR A lleva a un fenotipo hiperplásico con un aumento de las ramificaciones laterales; los animales que sobre expresan PR B presentan en un 20% de los casos un limitado desarrollo de ramificaciones laterales a partir de los conductos principales (Shyamala

et al. 2000). Sin embargo, en presencia de estimulación hormonal son capaces de diferenciarse en estructuras lóbulo-alveolares (Shyamala et al. 2000). Estos resultados sugieren que el balance adecuado entre las isoformas del PR es importante para el destino de las células epiteliales mamarias, sugiriendo que afectaría el pool de células madre y/o progenitoras.

Dado que se encontró un fenotipo hiperplásico en las glándulas mamarias de los ratones transgénicos PR-A, se investigó cual era el papel de los E y la P en el mismo (Simian et al. 2009). Para contestar esta pregunta se ovariectomizaron ratones PR-A, se los trató con E, P o E+P y se analizaron las glándulas mamarias por la técnica de montaje completo (MC) o "whole mount". La ovariectomía (OVX) revirtió completamente el fenotipo de las glándulas mamarias de los ratones PR-A mientras que el tratamiento con E inició levemente la proliferación celular lo cual se evidenció por la presencia de numerosos brotes laterales. Sin embargo, cuando se trató a los animales con E+P se recuperó el fenotipo hiperplásico. Para descifrar cual era la importancia relativa de la señalización vía ER y PR se trató a los ratones PR-A con anti estrógenos y anti progestágenos. Sólo el anti estrógeno ICI revirtió el fenotipo hiperplásico. No se observó efecto alguno al tratar a los ratones con los anti progestágenos RU486 o ZK98,299.

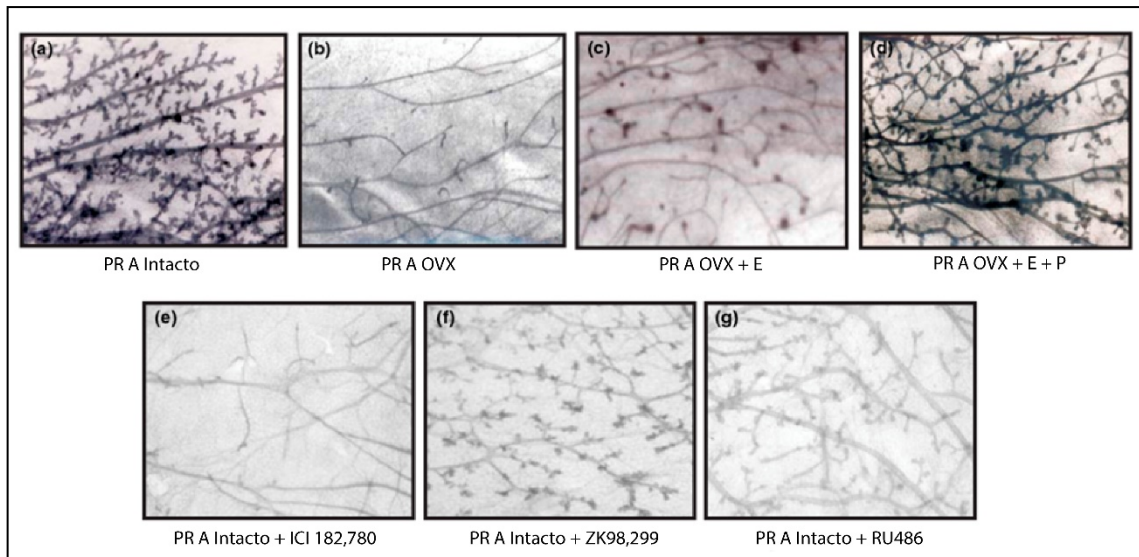


Figura 11. Fenotipo hiperplásico de ratones PR A. MC de las glándulas mamarias de ratones PR A bajo distintas condiciones. a) PR A intacto. b) PR A ovariectomizado. c) PR A ovariectomizado tratado con  $1\mu\text{g}$  de estradiol durante 5 días. d) PR A ovariectomizado tratado con  $1\mu\text{g}$  E y  $1\text{mg}$  de P durante 5 días. e) PR A tratado con ICI durante 4 días. f) PR A tratado con el anti progestágeno ZK98,299 durante 4 días. g) PR A tratado con el anti progestágeno RU486 durante 4 días. Modificado de (Simian et al. 2009).

Estos resultados sugieren que los E y la P tienen roles diferentes en el establecimiento del fenotipo hiperplásico en los ratones PR-A.

A partir de estos antecedentes es que planteamos los siguientes objetivos para esta tesis.



# HÍPOTESIS Y OBJETIVOS

Hasta el momento no se ha determinado el impacto de alteraciones en la expresión de las isoformas del PR en el mantenimiento/expansión de la población madre en la glándula mamaria normal y tumoral. Dado los fenotipos observados en los transgénicos para las distintas isoformas de PR (Shyamala et al. 1998, 2000; Simian et al. 2009), además del reciente descubrimiento del papel de las hormonas esteroides en el control de la población madre mamaria (Joshi et al. 2010; Asselin-Labat et al. 2010), hipotetizamos que el correcto nivel de expresión de las isoformas del PR jugaría un papel clave en el mantenimiento, expansión y diferenciación de la población de células madre mamarias normales. Más aún, consideramos que en contextos tumorales tendría un impacto sobre la población de CSC. Los tres objetivos planteados a continuación pondrán a prueba nuestra hipótesis para así comprender en mayor profundidad el papel del PR en la biología de la glándula mamaria.

*Objetivos específicos:*

1) Determinar la cantidad y funcionalidad de células madre en las glándulas mamarias de ratones transgénicos para PR A y PR B, como así en sus hermanas no transgénicas.

2) Investigar el papel de las hormonas ováricas sobre la población de células madre en el marco del desbalance de las isoformas del PR.

3) Estudiar el papel de las isoformas del PR en un modelo *in vitro* de células tumorales humanas.

---



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Ratones

Los ratones transgénicos de la cepa FvB, fueron cedidos por la doctora Shyamala Harris y transportados al Bioterio del Instituto Ángel H. Roffo, donde se mantuvieron ambas colonias en condiciones óptimas. Los animales se conservaron con una dieta a base de alimento balanceado *ad libitum*, bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) a una temperatura de entre 20 y 23°C.

Se contó con dos colonias de ratones transgénicos, una que sobre expresa la isoforma A del PR y otra que sobre expresa la isoforma B. Se realizó PCR para identificar a los ratones transgénicos. Para esto se extrajo ADN de la punta de la cola de los ratones y se utilizaron primers específicos del transgen. Dado que la generación de un desbalance en las cantidades relativas de las isoformas del PR podría afectar la preñez, se utilizó un sistema transgénico binario donde el gen GAL-4, bajo un promotor de citomegalovirus mamario (CMV) (ratones CMV-GAL-4), actúa como el transactivador del gen de PR A o PR B, el cual lleva

cuatro sitios de unión a GAL-4 en su promotor (ratones UAS-PR A/UAS-PR B). La cruce de los ratones CMV-GAL-4 con los UAS-PR A/PR B dio como resultado ratones bi-génicos con un aumento en la isoforma A o B del PR.

Para llevar a cabo los distintos experimentos se trabajó con ratones hembras vírgenes adultas de entre 20 y 23 semanas donde ya el fenotipo de cada transgénico está establecido (Shyamala et al. 1998).

➤ Determinación de ciclo estral:

Con el objetivo de determinar en qué fase del ciclo estral se encontraban los ratones, se tomó una muestra de la mucosa vaginal por medio de una micropipeta con 20µl de PBS estéril. La muestra se colocó en un portaobjetos y las células subyacentes se observaron bajo microscopio óptico. El ciclo estral se determinó según la presencia de los distintos tipos celulares característicos de cada estadio como muestra la siguiente figura.

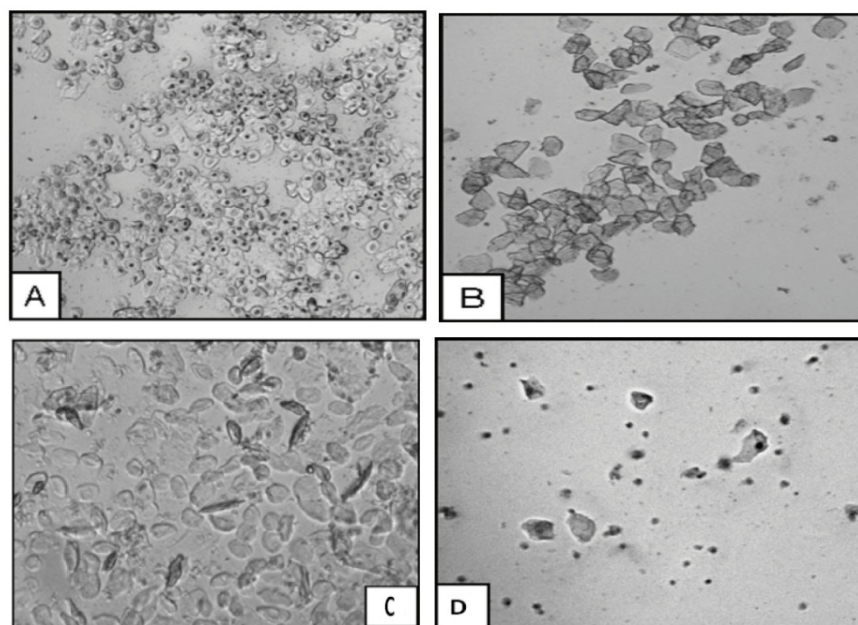


Figura 12. Ciclo estral de ratón. A-Proestro: caracterizado por presentar células epiteliales parabasales e intermedias con núcleo. B-Estro: presenta células epiteliales superficiales sin núcleo y queratinizadas. C- Metaestro: las células queratinizadas degeneran y presenta células epiteliales redondeadas. D- Diestro: presenta células epiteliales parabasales e infiltración con linfocitos.(Goldman, Murr, and Cooper 2007)

Los datos obtenidos del ciclo estral no fueron utilizados para separar los datos obtenidos en ninguno de los ensayos realizados. Sin embargo, se registró en caso de obtener variaciones en los resultados que podrían explicarse por esta variable.

➤ Ovariectomía:

Esta intervención se realizó en hembras de entre 20 y 23 semanas. Brevemente, se anestesiaron los ratones con Xilacina (20mg/kg)/ketamina (90mg/kg), se los colocó boca abajo sobre una plancha de telgopor, previamente desinfectada con alcohol 70%. Luego se realizaron dos incisiones en la piel, una a cada lado de la columna a la altura de los ovarios. Una vez expuesto el peritoneo se pudo observar a trasluz la grasa asociada a los ovarios, en ese lugar se realizó un corte pequeño y por medio del uso de pinzas se extrajo el ovario. Una vez extraídos ambos ovarios se procedió al cierre de la herida. Para todo el procedimiento se utilizó material de cirugía esterilizado. Luego de 15 días se sacrificaron a los animales por dislocación cervical.

➤ Extracción de la glándula mamaria:

Luego de sacrificar al ratón se lo colocó boca arriba y se aseguraron las patas con alfileres en una plancha de telgopor previamente desinfectada con alcohol 70%. Se realizó un corte en la zona ventral y se abrió la piel hacia arriba, la misma se aseguró también con alfileres para que no interfieran con la extracción. Una vez abierto se estiró la piel y se realizaron cortes hacia las patas inferiores y superiores exponiendo así las glándulas mamarias torácicas e inguinales. Con mucho cuidado se cortaron los extremos de las mismas y se las separó de la piel. Para todo el procedimiento se utilizó material de cirugía esterilizado. Rápidamente, para mantener la integridad del tejido las glándulas mamarias se colocaron en un eppendorf sobre hielo seco y se guardaron a -80°C para su posterior uso, o se realizaron alguna de las siguientes técnicas: montaje completo, cortes histológicos o cultivo primario como se describe a continuación.

- Montaje completo o "whole mount":

Para observar el fenotipo de las glándulas mamarias se utilizó la técnica de montaje completo (MC) que consta de teñir la glándula completa con una solución de carmín-aluminio que permite observar todas las ramificaciones del árbol mamario. Brevemente, la glándula mamaria inguinal completa se retiró cuidadosamente de la piel y se colocó en un vidrio cargado de manera de quedar en la posición en la que se encontraba en el ratón. Se colocó en fijador de Carnoy (60% Etanol, 30% Cloroformo, 10% ácido acético glacial) por 24hs. A continuación, se realizaron pasajes por alcohol 70% (30min), alcohol 50% (5min), alcohol 25% (5min), agua destilada (5min) y por último se colocó en la solución de carmín-aluminio (1g Carmín (Sigma) cada 2,5g Sulfato de aluminio y potasio en 500ml de agua) por 24hs. Luego se realizaron los pasajes de deshidratación con alcoholes hasta llegar al xilol en donde se dejaron hasta que perdieron toda la grasa (al menos 72hs). De esta manera se obtuvo todo el árbol mamario con una coloración rojiza que permite ver bajo lupa los brotes terminales y ramificaciones laterales de la glándula mamaria. Las imágenes se tomaron por medio de una lupa acoplada a una cámara fotográfica.

- Cortes histológicos:

Las glándulas mamarias se fijaron en formol y se incluyeron en parafina, para su posterior corte en micrótopo. Los cortes histológicos (5 m) obtenidos se desparafinaron con xilol, se hidrataron con alcoholes de graduación decreciente (96%-75%) y finalmente con agua destilada. A continuación, los cortes se colorearon con hematoxilina de Mayer (hematoxilina 1g/L, Sulfato de Aluminio y potasio 50g/L, Yodato de Sodio 0,2g/L, Ácido cítrico 1g/L, Hidrato de cloral 50g/L en agua destilada) por 4 min, se incubaron en agua corriente durante 5 min, se deshidrataron con alcoholes de graduación creciente (75%, 96%, 100%) y se aclararon

con xilol. Por último, se montaron con bálsamo de Canadá sintético (Biopack).

Las imágenes de los cortes se tomaron en un microscopio invertido acoplado a una cámara fotográfica. El número y tamaño de los ductos se evaluaron con el programa Fiji.

- Cultivo primario:

Se utilizó el método de Shackleton (Shackleton et al. 2006) que es similar al previamente utilizado por nosotros (Simian et al. 2001). Es importante destacar que distintos protocolos pueden llevar a resultados diferentes (Gao et al. 2016). Brevemente, luego de la remoción de las glándulas (a las cuales se les quito el nódulo linfático para disminuir el infiltrado inmune), estas se disociaron mecánicamente y se resuspendieron en medio DMEM F12 con glutamina 1 mM, conteniendo 200 U/ml de colagenasa IV (Whorthington), 0,2% Tripsina (Invitrogen) y suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Internegocios). Se incubó de 8 a 10 horas a 37 °C bajo agitación suave, hasta obtener una solución unicelular. A continuación, la suspensión unicelular se centrifugó, dejando la capa de grasa en la superficie del sobrenadante, la cual se removió por medio del uso de pipetas de punta gruesa (este proceso se realizó 2 veces para asegurar la remoción completa de la grasa). Luego se agregó buffer de lisis (0.64% NH<sub>4</sub>Cl) para eliminar los glóbulos rojos. Por último, la suspensión unicelular se filtró, con el fin de retener posibles restos de tejido. A partir de esta solución se realizaron distintos ensayos que se describen más adelante.

- Tratamiento in vivo con Fulvestran:

Se trataron hembras vírgenes de entre 20 y 22 semanas con Fulvestran (ICI182,780, Santa Cruz) (3mg/kg por día) o vehículo (Etanol). Las inyecciones se realizaron de manera intraperitoneal por 4 días seguidos. Al quinto día se sacrificaron los ratones y se recolectaron las glándulas mamarias como se describió previamente.

## 2. Líneas celulares

Se utilizó la línea celular humana T47D (C. a. Sartorius et al. 1994), derivada de un adenocarcinoma mamario y sus líneas derivadas T47D Y, T47D YA y T47D YB gentilmente otorgadas por la Dra. Carol Lange. Este modelo se utilizó por su expresión diferencial de las isoformas del PR. La línea T47D expresa ambas isoformas, T47D Y no expresa PR, T47D YA sólo expresa la Isoforma A y las T47D YB que sólo expresa la Isoforma B (C. a. Sartorius et al. 1994).

Las líneas se mantuvieron en DMEM-F12 suplementado con 10% SFB, 2 mM de glutamina, 80 g/ml de gentamicina en condiciones óptimas de temperatura y dióxido de carbono (37°C; 0,5atm CO<sub>2</sub>). En particular las líneas T47D YA e YB presentan resistencia al antibiótico G418 por lo que se agregó al medio para mantener la selección.

## 3. Ensayos con ARN

### ➤ Extracción de ARN de línea celular:

Se partió de placas de cultivo P6. Se lavaron las células adheridas con PBS 1x y se colocaron las placas en hielo. Se le agregó 500µl de Trizol Reagent (Invitrogen) y con la ayuda de un rastrillo de goma (en adelante scraper) se levantó el lisado y se lo incubó a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. A continuación, se le agregó 100µl de cloroformo a cada muestra, se agitó y se incubó a TA por 3 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 12.000 RPM a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ARN agregando 250µl de isopropanol e incubando 20 minutos a TA. Se centrifugó y descartó el sobrenadante. El pellet se lavó 2 veces con etanol 75% y finalmente se resuspendió en agua millieQ autoclavada. Las muestras fueron guardadas a -70°C para su posterior uso.

➤ Extracción de ARN de tejido:

Se tomó un fragmento de tejido congelado, se la sumergió en Trizol y se dejó en hielo hasta descongelar. A continuación, se procesó el tejido mecánicamente por medio de un ultraturrax hasta disgregarlo por completo. Luego se continuó con los pasos descritos en el ítem anterior.

➤ Retro transcripción:

A partir de los extractos de ARN celulares o de tejido, se realizó una retrotranscripción a ADN usando la retrotranscriptasa MMLV (Invitrogen), dNTPs (Promega N251B) y oligo dT (Genbiotech) como *primer*. El programa en el termociclador fue: 1h a 37°C seguidos por 5 minutos a 72°, obteniendo de este modo el ADNc de todos los ARNm celulares.

➤ PCR de tiempo final:

A partir del ADNc o del ADN extraído de las colas de los ratones, se realizaron ensayos de PCR con Mix común en un volumen final de 25µl constituidos por: 5µl de Buffer 5x, 0,5 µl de primer FW, 0,5 µl de primer RV, 0,5µl de dNTPs, 1µl de Taq polimerasa y 1µl de ADN. Los componentes de la Mix fueron adquiridos en PROMEGA, salvo los primers que fueron adquiridos de Tecnolab. Para las reacciones de PCR se hicieron 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55-58° (dependiendo del par de *primers* en uso) por 1 minuto y 72°C x 2 minutos, seguidos de un último ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos. Luego se corrieron las muestras en un gel de agarosa 1% para identificar las bandas correspondientes a los fragmentos de PCR amplificados.

Los primers utilizados se detallan en la siguiente tabla.

Primer	secuencia
PR genotipado FW	5'-CGT CTA CGG AGC GAC ATT TC-3'
PR genotipado RV	5'- CAA AGA GAC ACC AGG AAG TG-3'

GAL4 genotipado FW	5'-CAC TGA AGC CAA TCT ATC TG-3'
GAL4 genotipado RV	5'-GCA CGT ACA TAA GGT CAA TAG-3'
PRtg mensajero FW	5'- CGAATTGATCAAGGCAATTGGT-3'
PRtg mensajero RV	5'-AGACACTCTAT- GCCTGTGTGGAG-3'
PRen mensajero FW	5'-AAA AGG GGA GCT TGG GTC GT-3'
PRen mensajero RV	5'-CAA AGA GAC ACC AGG AAG TG-3'

Tabla 1. Primers PCR tiempo final. Se muestran los primers utilizados para identificar a los ratones transgénicos (genotipado) y los primers para identificar el mensajero de PR transgénico(tg) y endógeno(en).

➤ PCR en tiempo real (qPCR):

A partir de los ADNcs obtenidos por RT, se realizaron distintos ensayos de qPCR con la master mix 5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Mix Plus adquirida en Solis Biodyne. Para cada mensajero se utilizó un par de primers específicos adquiridos de la marca Tecnolab. Para las reacciones de qPCR se hicieron 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60° por 20 segundos y 72°C por 20 segundos, seguidos por la curva de disociación.

Los datos se procesaron utilizando la fórmula: Tasa de cambio o "Foldchange"  $= 2^{(\Delta Ct(ref) - \Delta Ct(t))}$  en donde ref es la muestra seleccionada como control y T es la muestra que queremos estudiar. El delta Ct (o  $\Delta Ct$ ) de ref y T se calculan restando el Ct del gen de normalización (GAPDH) con el Ct del gen en estudio, logrando así normalizar la expresión de cada gen en estudio con el nivel de expresión de un gen que no se modifica con el tratamiento aplicado.

La siguiente tabla presenta los primers utilizados:

Primer	Secuencia
qGAPDH Forward	TGCACCACCAACTGCTTAGC
qGAPDH Reverse	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
qhSOX2 Foward	TTGCTGCCTCTTTAAGACTAGGA
qhSOX2 Reverse	CTGGGGCTCAAACCTCTCTC
qhNANOG Foward	ATGCCTCACACGGAGACTGT
qhNANOG Reverse	AAGTGGGTTGTTTGCCTTTG
qhOCT4 Foward	AGCAAAACCCGGAGGAGT
qhOCT4 Reverse	CCACATCGGCCTGTGTATATC



Tabla 2. Primers PCR tiempo real. Se muestran los primers de los genes pluripotenciales y GAPDH como control de carga.

#### 4. Ensayos con proteínas

##### ➤ Extracción de proteínas de línea celular:

Para la extracción de proteínas totales, se partió de placas de cultivo P100, p60 y P6 confluentes al 80%. Las células fueron lavadas con PBS 1x frío y se les agregó buffer RIPA (50mM TrisHCl, 150mM NaCl, 1% triton, 0,25% Deoxicolato de Sodio, 1mM EDTA, a pH 7.4) con inhibidores de proteasas (Roche). Las células se levantaron utilizando un scrapper y se lisaron por medio de 2 sucesivas congelaciones a  $-70^{\circ}\text{C}$  y descongelaciones en hielo. Luego se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó por el método de Bradford (Bradford 1976).

Los extractos proteicos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

##### ➤ Extracción de proteínas totales de tejido:

Para la extracción de proteínas de tejido se colocó un trozo de tejido en un tubo de Khan de plástico, se sumergió en buffer RIPA con inhibidores de proteasa. Se utilizó un UltraTurrax para disgregar mecánicamente el tejido. Una vez obtenidos los lisados se procedió como se describió en el ítem anterior.

##### ➤ Western blot:

Se partió de muestras con 20 a  $50\mu\text{g}$  de proteínas totales. A cada muestra se le agregó buffer de siembra (50mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 0,1% Azul de Br-fenol, 10% glicerol, 1% de B-mercaptoetanol) y se incubó durante 3 a 5 minutos a  $100^{\circ}\text{C}$  (desnaturalización). Luego, las muestras fueron sembradas en un gel de poliacrilamida/SDS al 10 o 12% y se corrieron durante 1 hora 30 minutos a 150 V constante en buffer de

corrida (14,5g Glicina, 3g Tris, 1% SDS, en 1L de agua destilada). A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Bio-Rad, #162-0184) previamente activada en metanol, por 1 hora a 600 mA constante en hielo, en buffer de transferencia (14,5g Glicina, 3g Tris en 1L de agua destilada).

Las membranas se bloquearon con PBS-T 5% leche descremada durante 1 hora en agitación a TA, luego de lo cual se incubó toda la noche a 4°C en agitación con el anticuerpo primario correspondiente en PBS-T 1% leche descremada. Los anticuerpos usados se detallan a continuación:

Anticuerpo	Concentración	Isotipo IgG
Actina (Santa Cruz SC-47778)	1:10000	Ratón
E- Cadherina (Santa Cruz SC-8426)	1:1000	Ratón
PR C20 (Santa Cruz SC-539)	1:300	Conejo
ER $\alpha$ F10(Santa Cruz SC-8002)	1:500	Conejo
Tubulina (Abcam ab4074)	1:1000	Conejo

Tabla 3: anticuerpos primarios para WB

Luego de la incubación con el anticuerpo primario, se lavó 3 veces la membrana con PBS-T, y se agregó el anticuerpo secundario correspondiente en PBS-T 5% leche descremada. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

Anticuerpo	Concentración
anti-IgG-conejo (Santa Cruz SC-2004)	1:5000
anti- IgG-ratón (Santa Cruz SC-2005)	1:5000

Tabla 4: anticuerpos secundarios para WB

Se incubaron los anticuerpos secundarios por 1 hora a TA, luego de la cual se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 minutos. Por último, las membranas se incubaron en ECL (2ml Tris 0,1M a pH: 8, 15 $\mu$ l agua

oxigenada, 100µl Luminol, 65µl Cumárico, en 20ml de agua) por 3 min y fueron reveladas con el sistema de revelado manual.

➤ Zimografía:

Se partió de glándulas mamarias competas, las cuales se procesaron como se describió previamente para obtener proteínas totales, pero en RIPA sin EDTA, en ausencia de inhibidores de proteasas y con el cuidado de mantener siempre en hielo las muestras. Esta técnica se utilizó para estudiar la actividad de las MMPs en la glándula mamaria de ratones WT, PR A y PR B. Para esto se utilizaron geles de 8% de poliacrilamida con 1 mg/ml de gelatina (Sigma-Aldrich), en condiciones no reductoras. Se realizó una electroforesis a 120V durante 1h 30min. Luego de la electroforesis, los geles se lavaron durante 15 min, 2 veces con 2,5% de Tritón X-100, en agitación suave. A continuación, se incubaron 24 o 48 horas a 37° en la solución de activación enzimática: Tris-HCl (pH 7,4), 0,2 M de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0,02% de Tritón X-100. Luego se fijaron con una solución de 0,1% de azul de Coomassie (G-250, Bio-Rad), 30% de metanol y 10% de ácido acético, y se destiñeron con 30% de metanol y 10% de ácido acético en agua destilada. Se cuantificaron las bandas claras con el programa Fiji. La actividad de MMPs se normalizó según el contenido proteico de las glándulas mamarias cuantificado por la técnica de Bradford (Bradford 1976).

## 5. Citometría de flujo:

Quinientas mil células provenientes de la disgregación de la monocapa de las líneas T47D o de la suspensión unicelular obtenida del cultivo primario de los ratones, fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes en PBS con 2% SFB por 1 hora en hielo. Se utilizaron los marcadores superficiales de células madre mamarias murinas: CD29-FITC, CD24-APC y Lin-PE y los marcadores humanos: CD24-APC, CD44-FITC, todos adquiridos de la firma Biolegend. Se utilizó el citómetro FACS

AREA del departamento de Química Biológica, de la FCEN, UBA. Como control se utilizó cada anticuerpo por separado y un tubo sin anticuerpo para evaluar la autofluorescencia. Los datos fueron analizados en el programa Flow Jo. La siguiente figura muestra los resultados esperados para el análisis en Flow Jo de la glándula mamaria de ratones vírgenes de la cepa FvB respecto a estos marcadores.

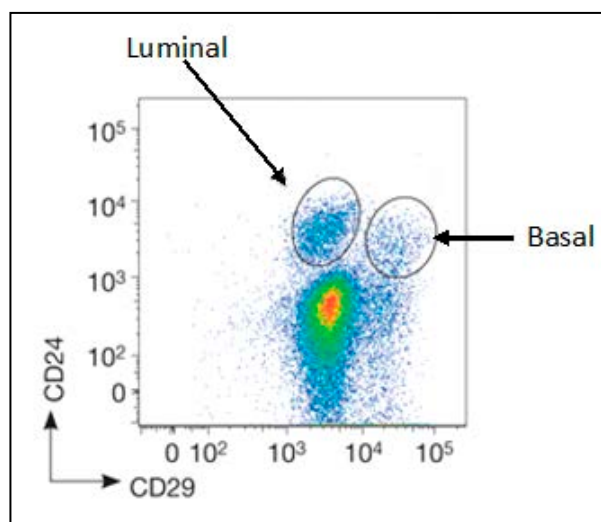


Figura 13. Análisis de datos de citometría de flujo. Se muestra el resultado esperado para ratones FvB WT con los marcadores CD29 y CD24 en la población Lin<sup>-</sup>. Modificado de (Asselin-Labat et al. 2010).

## 6. Ensayos de mamoesferas:

A partir de la disgregación de la monocapa de las líneas T47D o de la suspensión unicelular obtenida del cultivo primario, se sembraron 500 o 10.000 células/ml, respectivamente en pocillos de placas de baja adherencia ((Ultra Low Attachment plates (Corning, NY)) en cantidades suficientes de medio (según el tamaño de la placa utilizada) en ausencia de SFB para formación de MFS: DMEM/F12 con 20 ng/ml EGF, 20µl/ml B27, 100 µg/ml gentamicina, todo adquirido de Gemini Bio. Esta técnica ha sido ampliamente descrita por otros autores (Dontu, Abdallah, et al. 2003) y se realiza de rutina en nuestro laboratorio (Raffo et al. 2013). La figura 14 describe esta técnica.

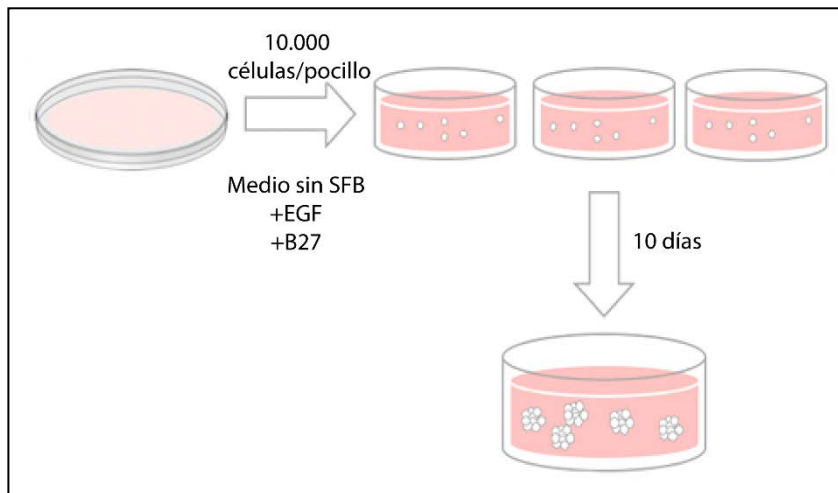


Figura 14. Esquema del ensayo de MFS. A partir de la suspensión unicelular obtenida de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B o de las líneas celulares T47D, se sembraron 10.000 células por pocillo en condiciones para MFS y se incubaron durante 10 días.

Luego de 10 días se cuantificó el número de MFS formadas y se tomaron fotografías por medio de un microscopio NIKON TE2000-S invertido con contraste de fase acoplado a una cámara fotográfica. El tamaño y forma de las MFS obtenidas se cuantificó con el programa Fiji.

En el caso de las MFS provenientes de ratones, también se analizó su morfología, para esto a partir de las fotos tomadas en cada ensayo (N=5) se contaron cuantas MFS por foto contenían lumen y cuantas eran macizas.

## 7. Tratamientos Hormonales:

Tanto para las células provenientes del cultivo primario de las glándulas mamarias de los ratones, como para la monocapa de las células T47D se agregaron los siguientes tratamientos al momento de formar las MFS: Estradiol ( $10^{-8}M$ ), 4-OH-tamoxifeno( $10^{-6}M$ ), ICI182,780 ( $10^{-6}M$ ) (todos de Santa Cruz Biotechnology) o etanol absoluto como control. Se dejaron crecer durante 7 o 10 días (línea T47D y células de ratones respectivamente) y se evaluó la formación de las MFS tanto en número como en forma o morfología. Los tratamientos hormonales se realizaron en ausencia de rojo fenol. Cuando se trataron las células en

monocapa se utilizó suero charcolizado (2%) como se describió previamente (Raffo et al. 2013).

#### **8. Cultivo en 3D:**

10.000 células provenientes de las suspensiones unicelulares de los ratones WT, PR A y PR B fueron resuspendidas en 400  $\mu$ l de DMEM F12 con 2% SFB, 5ng/ml de EGF y 2% de Matrigel (Matriz extracelular, BD). Luego fueron sembradas sobre un portaobjeto multicámaras (labteks, BD Biosciences) conteniendo 40  $\mu$ l de Matrigel. Cada 96 hs se realizó un cambio de medio. Luego de 10 días en cultivo se pudo detectar la formación de colonias y se tomaron fotografías por medio de un microscopio invertido Nikon TE2000-S con contraste de fase acoplado a una cámara fotográfica.

#### **9. Inmunofluorescencia:**

a) En monocapa: Para la tinción por inmunofluorescencia, se siguió el protocolo descrito por Debnath, J. y col. 2003 (Debnath 2003), con ligeras modificaciones. Las células se fijaron 20 minutos a TA con PFA 4% en PBS y se permeabilizaron con Triton-X100 0,1% en PBS, por 10 minutos a 4°C. Luego se bloquearon 60 minutos a TA con la solución: BSA 0,1%, Triton X-100 0,2%, Tween-20 0,05%. Posteriormente, los vidrios se incubaron con los anticuerpos primarios indicados (preparados en el medio de bloqueo) a 4°C, ON en cámara húmeda. A continuación, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios (preparados en medio de bloqueo) acoplados a distintos fluoróforos, durante 1 hora a TA.

b) En MFS: Las MFS crecidas en suspensión fueron centrifugadas y colocadas en porta objetos cargados (Super-Frost). Una vez secado el medio y se fijaron al vidrio con PFA al 4% como se describió para la monocapa.

Los anticuerpos primarios fueron los mismos que se utilizaron para WB. La tabla a continuación muestra los anticuerpos secundarios utilizados:

Anticuerpo	Concentración
anti-IgG-conejo Alexa 488 (Abcam ab150077)	1:1000
anti-IgG-conejo Alexa 647 (Abcam ab 150079)	1:1000
anti- IgG-ratón Alexa 488 (Abcam ab 150113)	1:1000
anti- IgG-ratón Alexa 647 (Abcam ab 150115)	1:1000

Tabla 5: Anticuerpos secundarios utilizados en las IF.

En el caso de la monocapa se utilizó el microscopio de fluorescencia del Área de investigaciones del Roffo, TE2000-S. Para las tinciones en las MFS se utilizó el microscopio confocal de la academia de medicina Olympus FV-1000.

#### 10. Ensayo clonogénico:

Las MFS de las líneas T47D fueron disgregadas con tripsina y 1000 células derivadas de estas se sembraron por triplicado en placas de 35 mm y se mantuvieron con medio completo. Luego de 10 días las colonias fueron fijadas con formol neutro y teñidas con cristal violeta. Se contaron las colonias con más de 20 células bajo lupa y se calculó la capacidad clonogénica como el porcentaje de colonias en función del número de células sembradas.

#### 11. Estadística:

Los datos se expresan como la media y su desvío estándar. Se utilizó el programa Graph Pad para realizar la estadística. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de ANOVA de un factor con las comparaciones post-hoc indicadas en el texto, y múltiples pruebas t-de Student en los casos que correspondiera.





# RESULTADOS

Objetivo 1:

Determinar la cantidad y funcionalidad de células madre en las glándulas mamarias de ratones transgénicos para PR A y PR B, así como en sus hermanas no transgénicas

## Caracterización del modelo:

Con el objetivo de estudiar el papel diferencial de las isoformas del PR sobre el compartimento de células madre de la glándula mamaria murina, se trabajó con ratones transgénicos que sobre expresan cada una de ellas (Shyamala et al., 1998; Shyamala et al., 2000; Simian 2009). Dado que la generación del desbalance en las cantidades relativas de las isoformas del PR podría afectar la preñez, se utilizó un sistema transgénico binario donde el factor de transcripción GAL-4, bajo un promotor de citomegalovirus mamario (CMV) (ratones CMV-GAL-4), actúa como el transactivador del gen PR A o PR B. El transgen PR A o PR B lleva cuatro sitios de unión de GAL-4 en su promotor (ratones UAS-PR A/UAS-PR B). La cruce de los ratones CMV-GAL-4 con los UAS-PR A/PR B resultó en ratones bi-génicos que presentaron un aumento en PR A o PR B, generando un desbalance respecto de los ratones no transgénicos, en el futuro denominados "wild type" (WT). Es importante destacar que estos ratones mantienen el gen endógeno de PR y por ende expresan las dos isoformas del mismo. La siguiente figura describe el modelo de trabajo.

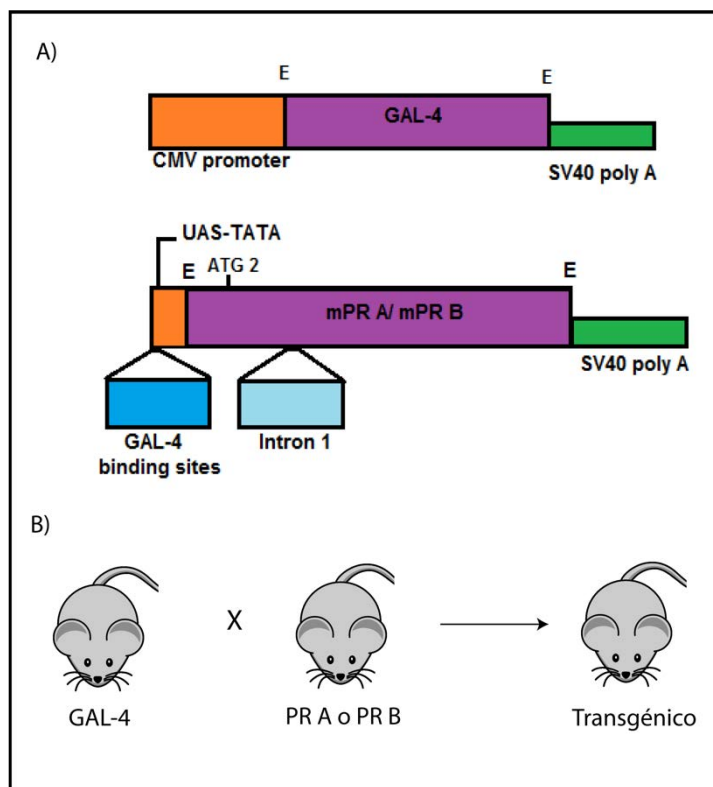


Figura 15: Modelo bi-génico de expresión de PR. A) Construcción del transgen de GAL-4. Se observa el promotor de CMV en naranja, el cDNA de GAL-4 en violeta y la cola de poly A en verde. Las "E" corresponden a los sitios de corte de la enzima EcoR1 que se utilizaron para generar la construcción. B) Construcción del transgen de PR. Se observa el promotor con los sitios UAS de unión de GAL-4 en azul y el agregado en la posición correcta del intrón 1 del gen de PR (celeste). En violeta se muestra el cDNA de PR-A o PR-B, y las "E" corresponden a los sitios de corte para la enzima de restricción EcoRI que se utilizó para generar las construcciones. c) Esquema del cruzamiento entre un ratón PR A/PR B con un ratón GAL4 para obtener ratones transgénicos que sobre expresen una u otra isoforma.

Para determinar el genotipo de los ratones transgénicos se extrajo ADN de la cola luego del destete y se realizó de rutina PCR de punto final con primers diseñados específicamente para el transgen de PR o GAL-4 según correspondía. La figura 16 muestra un gel representativo.

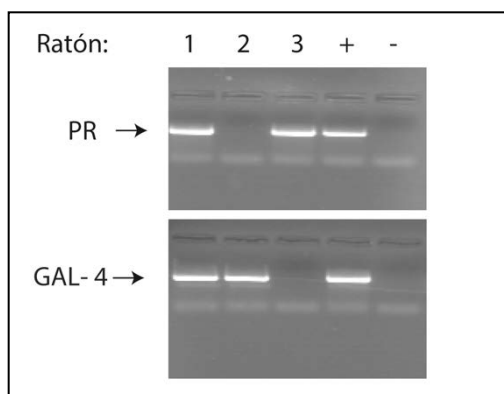
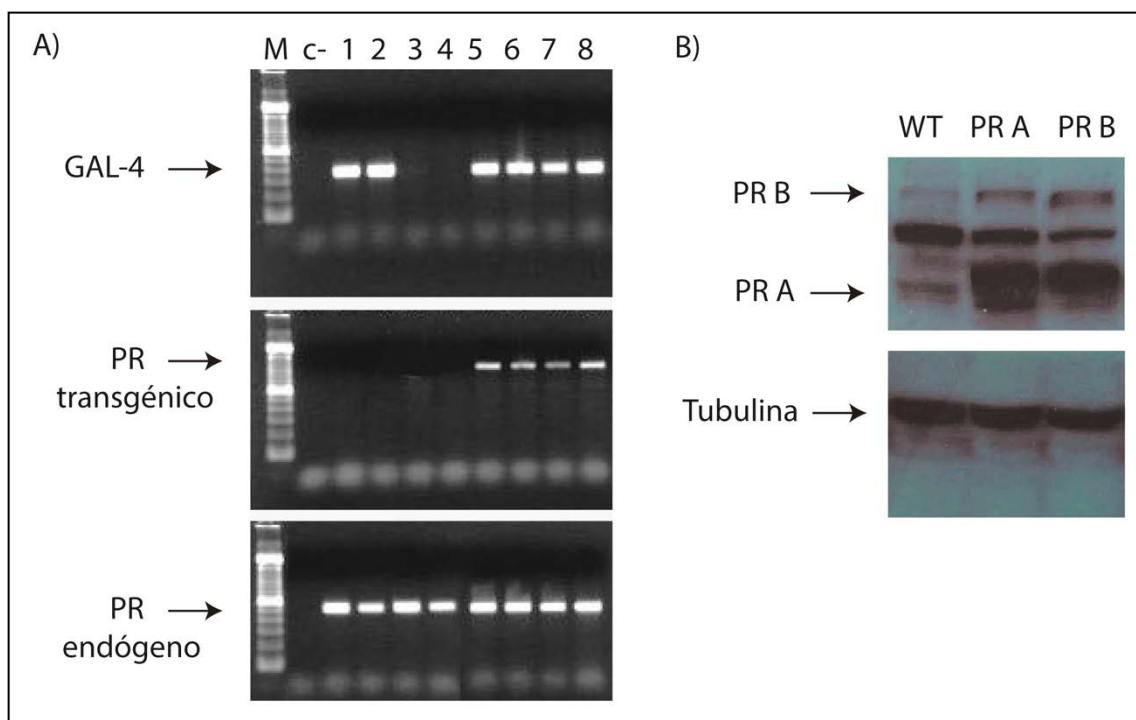


Figura 16. Identificación de los ratones transgénicos por PCR. Foto representativa de las muestras de ADN extraídas de la cola de ratones: 1: PR-GAL-4; 2: GAL-4; 3: PR. El c+ corresponde a una muestra positiva para ambos transgenes. El C- corresponde al control de PCR sin muestra. Luego de realizar la PCR con primers específicos se corrieron las muestras resultantes en un gel de agarosa 1% y se tomó la foto en un trans-iluminador acoplado a una cámara fotográfica.

Para corroborar la correcta expresión de los transgenes se realizó RT-PCR a partir de ARN extraído de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B. Para esto se utilizaron primers específicos para identificar los mensajeros transgénicos PR y GAL-4, y el mensajero endógeno de PR (Figura 17 A). Fue posible identificar específicamente los mensajeros transgénicos ya que se utilizaron primers que se encuentran en la zona 5'UTR del transgen, que difiere del endógeno. Además, se evaluó por WB la expresión del PR (Figura 17 B). La proteína generada por el

transgen es idéntica a la endógena, por lo que no es posible diferenciarlas. En el caso de las glándulas mamarias de los ratones PR A se observó, a nivel proteico, un incremento significativo en la expresión de la isoforma A de PR acompañado por un incremento en PR B respecto del WT. En el caso de las muestras provenientes de los transgénicos PR B se observó mayor expresión de PR B en comparación a WT, junto con un aumento en los niveles de PR A. Sin embargo, no



observamos que los niveles de PR B superaran los de PR A.

Figura 17. Expresión de las isoformas del PR. A) Gel representativo de la expresión de GAL-4, PR transgénico y endógeno. Se utilizaron primers específicos para diferenciar el PR transgénico del endógeno, para esto la secuencia del primer "forward" corresponde a la zona 5'UTR que es diferente a la del endógeno. Muestras: 1,2: Sólo expresan GAL-4 no son considerados transgénicos; 3,4: WT no expresan ningún transgen; 5,6,7 y 8: ratones PR A-GAL-4 expresan PR transgénico y GAL-4. En todos los casos se expresa PR endógeno. B) WB representativo de la expresión proteica de PR en ratones WT, PR A y PR B.

Con el objetivo de confirmar que ambas colonias conservaban el fenotipo correspondiente (ya descrito anteriormente), se realizó la técnica de montaje completo (MC) de la glándula mamaria o "whole mount" que consta de la fijación y tinción con carmín-aluminio de la glándula completa y permite observar todos los ductos, ramificaciones

laterales y brotes terminales. En la siguiente figura se muestran los MC, de manera comparativa, para cada genotipo (WT; PR A; PR B) y la progresión de los mismos a distintas semanas de vida.

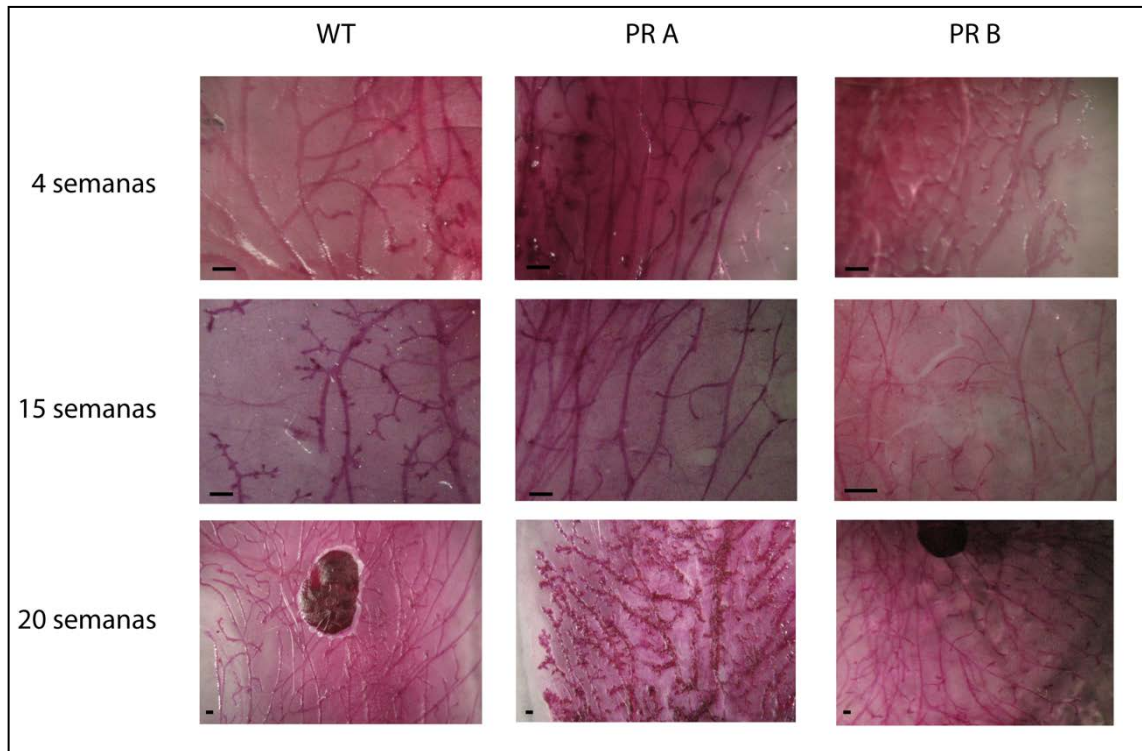


Figura 18: Ratones PR A desarrollan hiperplasia en la adultez. Se sacrificaron ratones hembras WT, PR A y PR B a las 4, 15 y 20 semanas de vida. Se removieron las glándulas mamarias inguinales completas sin dañar la estructura del tejido y se apoyaron en vidrios cargados en la misma posición que se encontraban en el ratón para realizar los MC. Las fotos fueron tomadas por medio de una cámara acoplada a una lupa (aumento 2,5x). La barra de escala representa 200 $\mu$ m.

Los ratones pre-púberes fueron destetados a las 4 semanas de vida y presentaron una glándula mamaria que mostró un desarrollo rudimentario, no llegando a ocupar más de un 30% de la almohadilla grasa, como ha sido descrito previamente (Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW 2000; Macias and Hinck 2012). La figura 18 demuestra que los ratones WT, PR A y PR B presentaron un desarrollo similar en esta etapa del desarrollo.

Una vez que se inicia la pubertad, con el advenimiento de las hormonas ováricas E y P, la glándula mamaria crece rápidamente elongando los ductos y aumentando las ramificaciones laterales, pasando a ocupar un 60-70% de la almohadilla grasa, dejando el

espacio suficiente para el momento de la preñez donde se llena por completo (Macias and Hinck 2012). Se observó que, a las 15 semanas de vida, cuando los ratones ya son adultos, el grado de desarrollo se mantuvo similar entre los tres genotipos. En cambio, a las 20 semanas los ratones PR A presentaron un fenotipo hiperplásico dado por mayor número de ramificaciones laterales y aumento del espesor de los ductos, mientras que las glándulas mamarias de ratones PR B fueron similares a la de ratones WT o incluso de menor desarrollo.

Estas observaciones fueron confirmadas por el análisis de cortes histológicos de las glándulas mamarias de ratones a las 20 semanas de vida. Se observó que el número de ductos fue significativamente mayor en ratones PR A, los cuales estaban rodeados por más de una capa de células epiteliales y presentaron mayor tamaño que los ductos de ratones WT y PR B. La figura 19 resume estos resultados.

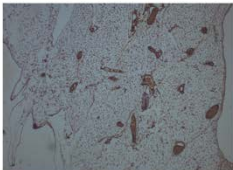

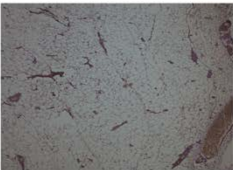
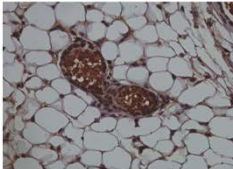
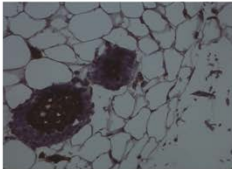
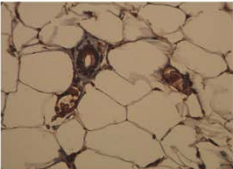
	WT	PR A	PR B
4x			
40x			
Nº de ductos por campo	18,5	24,7**	15
Nº de células por ducto	1,2	2,4**	1
Tamaño de ductos (µm)	87	148**	35**

Figura 19. La histología de las glándulas mamarias de ratones PR A y PR B difieren de los ratones WT. Se realizaron cortes histológicos de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B, se tiñeron con hematoxilina-eosina, se observaron a microscopio y se tomaron 3 fotos por glándula en aumento 4x y 10 en aumento 40x (3 ratones por genotipo). Se analizó el número de ductos, el número de células epiteliales que lo formaban y el tamaño de los mismos. Los asteriscos indican diferencias significativas

analizadas por ANOVA de 1 factor ( $p < 0,0001$ ), seguido por comparaciones de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Estos resultados indican que la sobre expresión prolongada de PR A lleva a una alteración del desarrollo normal de la glándula mamaria, evidenciado por el desarrollo de hiperplasia como fue reportado previamente (Shyamala et al. 2000; Simian et al. 2009).

Las MMPs juegan un papel fundamental en el desarrollo normal de la glándula mamaria. Estas enzimas se encargan de la degradación de los componentes de la matriz extracelular, necesarios para el avance de los ductos en la almohadilla grasa durante la pubertad y la preñez (Sorrell et al. 2005). Por otro lado, la sobre expresión y actividad de las MMPs ha sido asociada con la disrupción de la estructura de la glándula mamaria (Desprez et al. 1995) y el grado de invasión que tiene un tumor; mayor expresión de estas enzimas correlacionan con tumores más invasivos (Planagumà et al. 2011; Simian et al. 2001; McDaniel et al. 2006). Se evaluó la expresión de las MMPs 2 y 9 por medio de la técnica de zimografía a partir de extractos de glándula mamaria completa de ratones WT, PR A y PR B. Para ello, se extrajeron las glándulas mamarias de ratones hembra, se colocaron rápidamente en solución RIPA sin inhibidor de proteasas (para evitar que se degraden las MMPs) y se procesaron por medio de un ultraturrax hasta disgregar la glándula por completo. Los extractos se corrieron en geles para zimografía como se detalla en materiales y métodos. La figura 20 revela que los extractos de glándulas provenientes de ratones PR B presentaron mayor actividad de MMP 9.



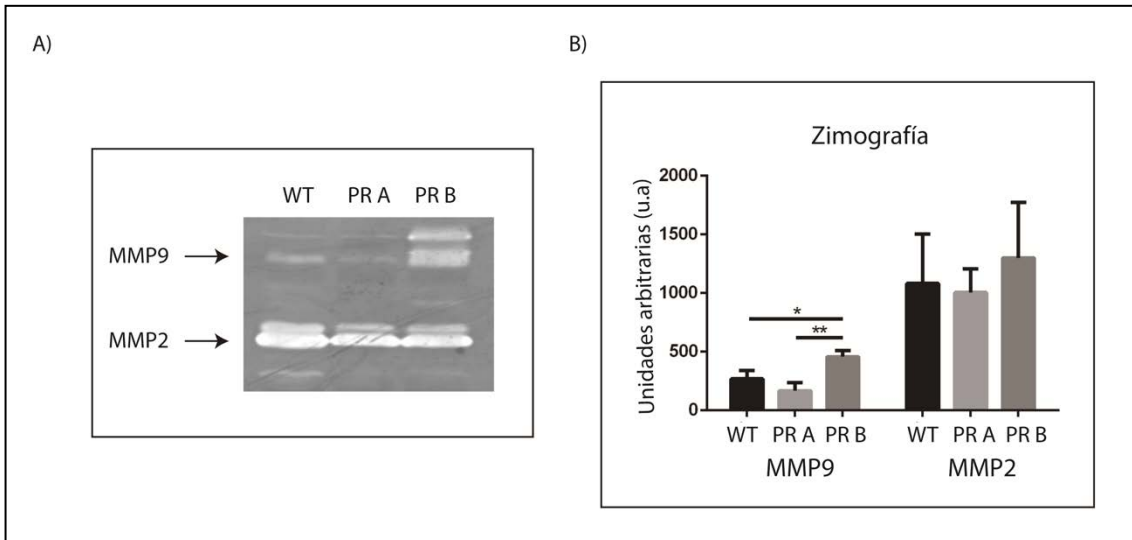


Figura 20: Las glándulas mamarias de ratones PR B presentan mayores niveles de MMP 9. A) Zimografía representativa a partir de extractos mamarios provenientes de ratones WT, PR A y PR B. B) Cuantificación de la actividad de MMPs por densitometría de 3 experimentos independientes, la densitometría fue relativizada a la cantidad de proteína cuantificada por Bradford. Los asteriscos indican diferencias significativas analizado por ANOVA de un factor ( $p= 0,0044$ ), seguido de contrastes de Tukey (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )

En un trabajo previo (Simian et al. 2009) se describió que la activación de MMP2 es regulada por la P y su receptor. En ese trabajo los autores sólo utilizaron ratones PR A, por lo que no se observó la diferencia en MMP9 dada en los PR B. Para evaluar si las hormonas ováricas afectaban el nivel de MMP-2 en las glándulas mamarias de los ratones PR B, se ovariectomizaron ratones WT, PR A y PR B y se evaluó por zimografía la actividad de MMP2. Se observó una disminución en la actividad de MMP2 tanto en las glándulas mamarias de WT, PR A y como de PR B. La figura 21, a continuación, muestra una zimografía representativa.

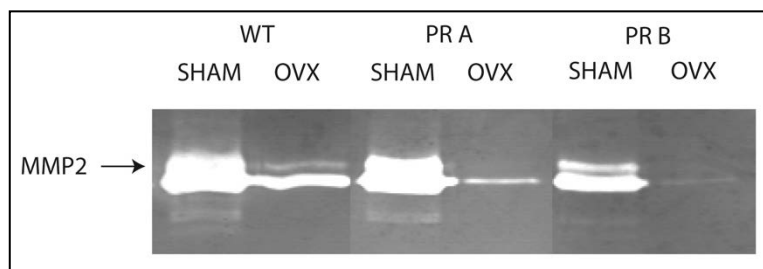


Figura 21. Las hormonas ováricas regulan la actividad de MMP2. Se ovariectomizaron ratones WT, PR A y PR B de 20 semanas y luego de 15 días se procedió al sacrificio y extracción de las glándulas mamarias de los mismos. La figura muestra una zimografía representativa a partir de extractos mamarios de los ratones WT, PR A y PR B intactos (SHAM) u ovariectomizados (OVX).

Determinación del porcentaje y funcionalidad de células madre en las glándulas mamarias de ratones WT y transgénicos para las isoformas de PR.

Para estudiar el papel de cada isoforma del PR sobre la población de células madre mamaria, se analizaron por citometría de flujo suspensiones celulares provenientes de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B. Para ello se sacrificaron ratones hembra de 20 semanas y se removieron las glándulas mamarias (inguinales y torácicas) con el cuidado de sacar el ganglio linfático y así evitar contaminación con células del sistema inmune. Se realizó una disgregación mecánica con tijera, seguida de una disgregación enzimática hasta obtener una suspensión unicelular. Una vez obtenida esta suspensión las células fueron lavadas en varios pasos de centrifugación para eliminar la grasa y los glóbulos rojos. Por último, se cuantificó el número de células (500.000 por ratón) y se incubaron con los anticuerpos contra los marcadores superficiales que permiten identificar a las células madre de la glándula mamaria de ratón: CD24 (antígeno estable de calor) y CD29 (integrina  $\beta 1$ ) (Joshi et al. 2010; Shackleton et al. 2006). Además, se agregó un cóctel denominado Lin (CD45-CD31-Ter119) que permite eliminar en el análisis a aquellas células del estroma que presenten estos marcadores: células endoteliales (CD31+) y células del sistema inmune como células hematopoyéticas (CD45-Ter119+) (Dong et al. 2013). Estos marcadores permiten identificar las células progenitoras luminales (CD24+CD29<sup>+/low</sup> Lin<sup>-</sup>), que darán lugar a las células luminales y alveolares, y las células basales (CD24+CD29<sup>hi</sup> Lin<sup>-</sup>), que incluye a células progenitoras mioepiteliales y células madre. Para identificar únicamente a estas últimas sería necesario utilizar además otros marcadores como Sca-1 y CD49f (Shackleton et al. 2006; Joshi et al. 2010; Asselin-Labat et al. 2010).

En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos.

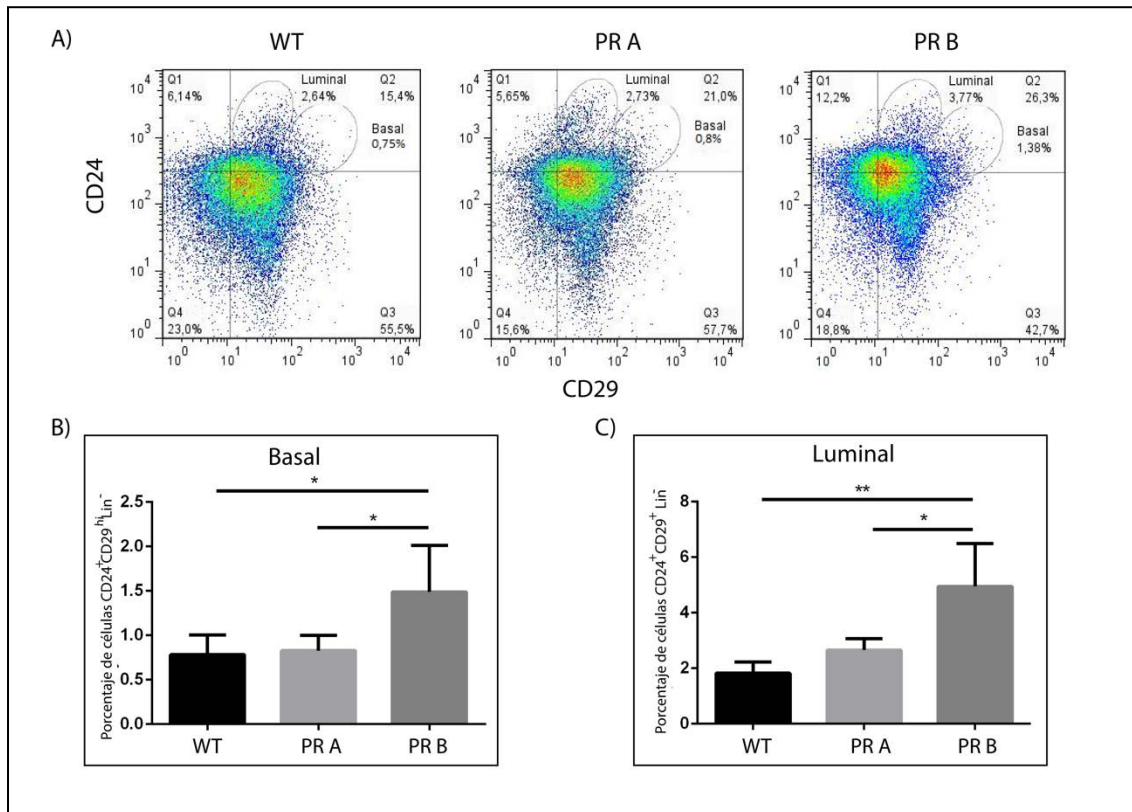


Figura 22. Las glándulas mamarias de ratones PR B presentan mayor porcentaje de células basales y luminales. A) Gráficos representativos del análisis de los datos a partir del citómetro de flujo para los marcadores CD24, CD29 en la población Lin<sup>-</sup>, de izquierda a derecha, WT, PR A y PR B. B) Porcentaje de células CD24<sup>+</sup>CD29<sup>hi</sup>Lin<sup>-</sup> (basales) en glándulas mamarias provenientes de ratones WT, PR A y PR B. N=4, ANOVA significativo (p=0,011) seguido por contrastes de Tukey (\*p<0,05). C) Porcentaje de células CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+/-low</sup> Lin<sup>-</sup> (progenitores luminales) en glándulas mamarias provenientes de ratones WT, PR A y PR B. N=4, ANOVA de 1 factor significativo (p=0,0014), seguido por contrastes de Tukey (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

A partir del análisis de estos datos se concluyó que las glándulas mamarias de los ratones PR B presentan mayor porcentaje de células madre y progenitoras basales y luminales que WT y PR A.

A continuación se realizó un ensayo de MFS que es un indicador funcional de la capacidad de auto-renovación de las células madre/progenitoras en el tejido (Dontu, Abdallah, et al. 2003; Tosoni et al. 2012).

Con el fin de estudiar la capacidad de formar MFS, las suspensiones unicelulares derivadas de ratones WT, PR A y PR B se sembraron en una concentración de 10.000 células/ml en placas de baja adherencia, en medio para MFS y se las dejó crecer durante 10 días. En la siguiente

figura se muestran los resultados obtenidos a partir de 5 ensayos independientes.

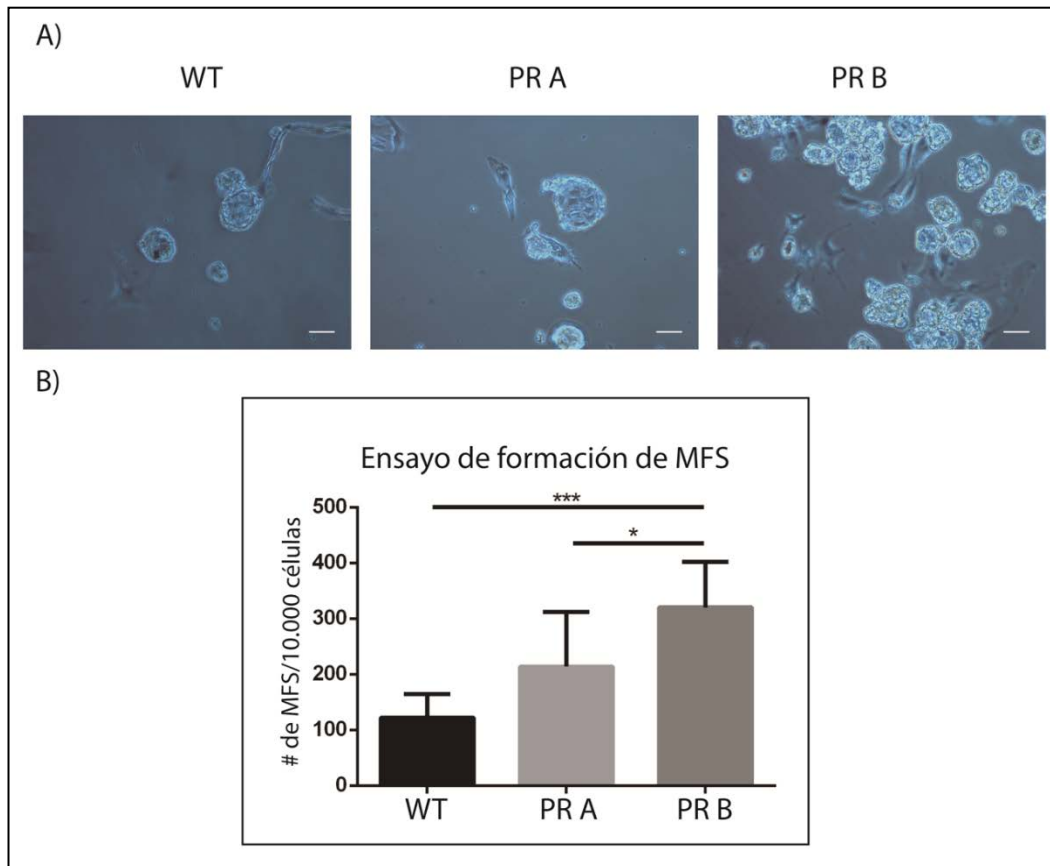


Figura 23: Las glándulas mamarias de ratones PR B presentan mayor capacidad de formas MFS. A partir de la suspensión unicelular obtenida de la disgregación mecánica y enzimática de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B, se sembraron 10.000 células/ml en placas de baja adherencia y en condiciones para mantenimiento de células madre (sin SFB, con B27 y EGF). A) Imágenes representativas de las MFS obtenidas para cada genotipo por medio de una cámara acoplada a un microscopio invertido con el objetivo10x. La barra de escala representa 50 $\mu$ m. B) Cuantificación y análisis estadístico del número de MFS obtenido para WT, PR A y PR B a partir de 5 experimentos independientes. ANOVA de un factor ( $p=0,0002$ ) seguido de contrastes de Tukey (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

En concordancia con lo observado por citometría de flujo, las glándulas mamarias de los ratones PR B presentaron mayor capacidad de formar MFS que WT ( $p<0,001$ ) y PR A ( $p<0,05$ ). Estos resultados sugieren que sobre expresar PR B lleva a un aumento de la población de células madre/progenitoras.

Con el fin de caracterizar las MFS en mayor profundidad, se realizaron inmunofluorescencias para PR, ER, CK14 y Oct4. Se ha establecido que las células madre son negativas para los receptores de

ER y PR (Joshi et al. 2010; Shackleton et al. 2006; Asselin-Labat et al. 2010). Sin embargo, éstas son capaces de responder a la P vía señales paracrinas a partir de células PR<sup>+</sup>. Las MFS surgen a partir de células madre/progenitoras que comienzan a dividirse en forma asimétrica dando lugar a nuevas progenitoras que continúan proliferando generando una MFS compuesta por células con distintos grados de diferenciación (Dontu, Al-Hajj, et al. 2003) dentro de las que se pueden encontrar células positivas para ER y PR (Dontu and Wicha 2005; Honeth et al. 2014). Se realizaron las tinciones correspondientes (como se describe en materiales y métodos). La figura 24 muestra los resultados obtenidos para la marcación de PR.

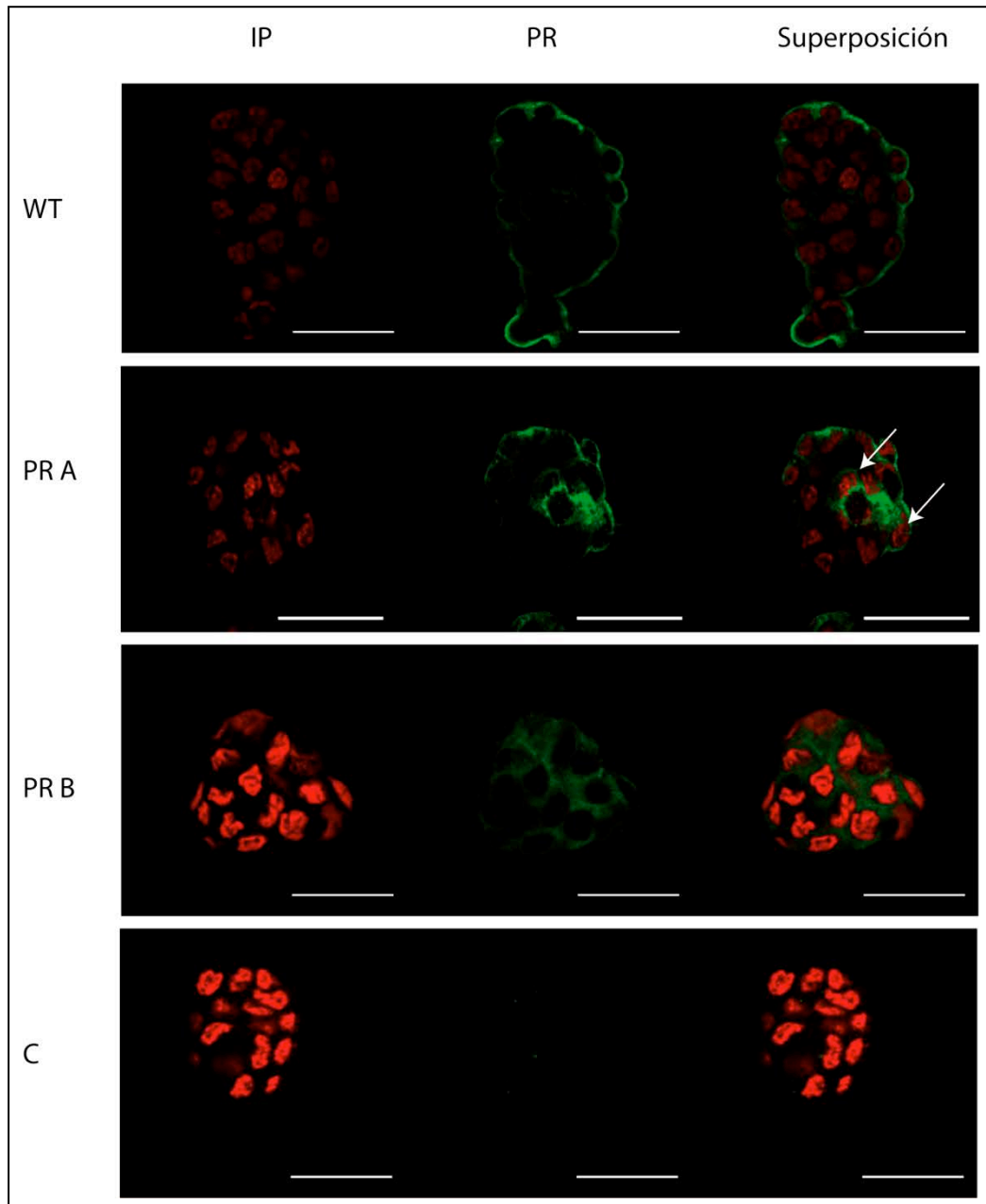


Figura 24. Las MFS derivadas de ratones PR A y PR B expresan mayores niveles de PR. Imágenes de confocal representativas de MFS provenientes de ratones WT, PR A y PRB, marcadas con anticuerpo para PR y yoduro de propidio para teñir los núcleos. La "C" corresponde al control sin anticuerpo primario. Estas imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal de fluorescencia con el objetivo 60x. La barra de escala representa 25µm. Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa Fiji.

Las MFS provenientes de las células derivadas de glándulas mamarias de los ratones transgénicos, como las derivadas de glándulas de ratones WT presentaron marca para PR. En ambos casos se observó marca tanto en el centro como en la periferia de las MFS. Su ubicación fue mayoritariamente en citoplasma y membrana, en las provenientes de PR A se observó marca nuclear (flechas).

A continuación, se determinó la presencia del ER $\alpha$  por inmunofluorescencia en las MFS provenientes de suspensiones celulares de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B.

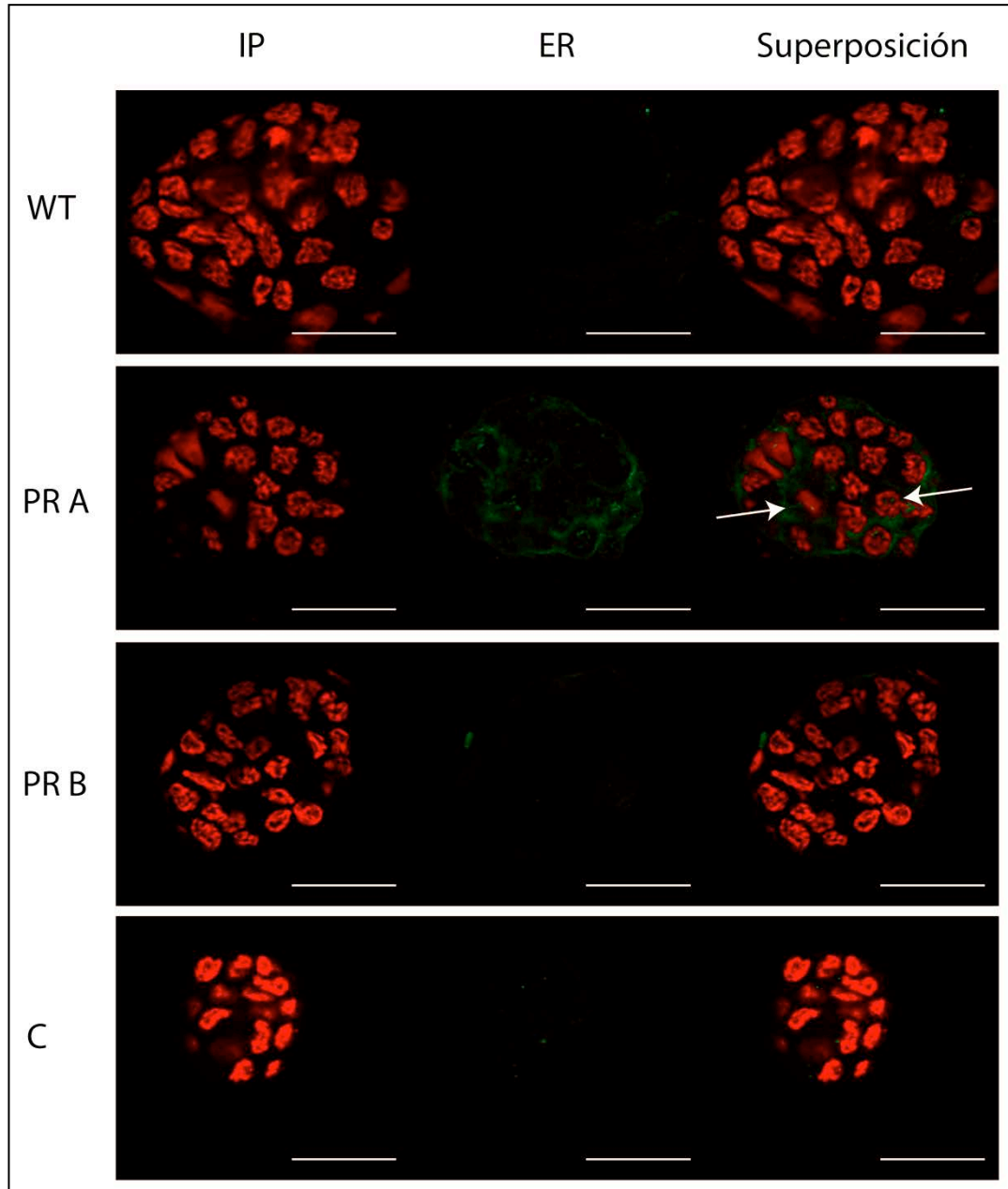


Figura 25. MFS provenientes de las glándulas mamarias de ratones PR A expresan mayores niveles de ER- $\alpha$ . Imágenes representativas de MFS provenientes de ratones WT, PR A y PR B, marcadas con anticuerpo para ER y yoduro de propidio para teñir los núcleos. Estas imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal de fluorescencia con el objetivo 60x. La barra de escala representa 25 $\mu$ m.

Prácticamente no se detectó expresión de ER- $\alpha$  en las MFS provenientes de suspensiones celulares de glándulas mamarias de ratones WT y PR B.

Sin embargo, en el caso de las MFS PR A la marca de ER- $\alpha$  fue más intensa e incluso se observó marca nuclear (flechas).

La expresión de citoqueratinas se utiliza para identificar las distintas poblaciones que conforman la glándula mamaria (Grimm, Hartig, and Edwards 2016; Klonisch et al. 2008). En este caso se evaluó la expresión de la citoqueratina 14 (CK14) que se expresa en células mioepiteliales/basales(Grimm, Hartig, and Edwards 2016). Se evaluó, por inmunofluorescencia, su expresión en las MFS provenientes de suspensiones celulares de glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PRB.



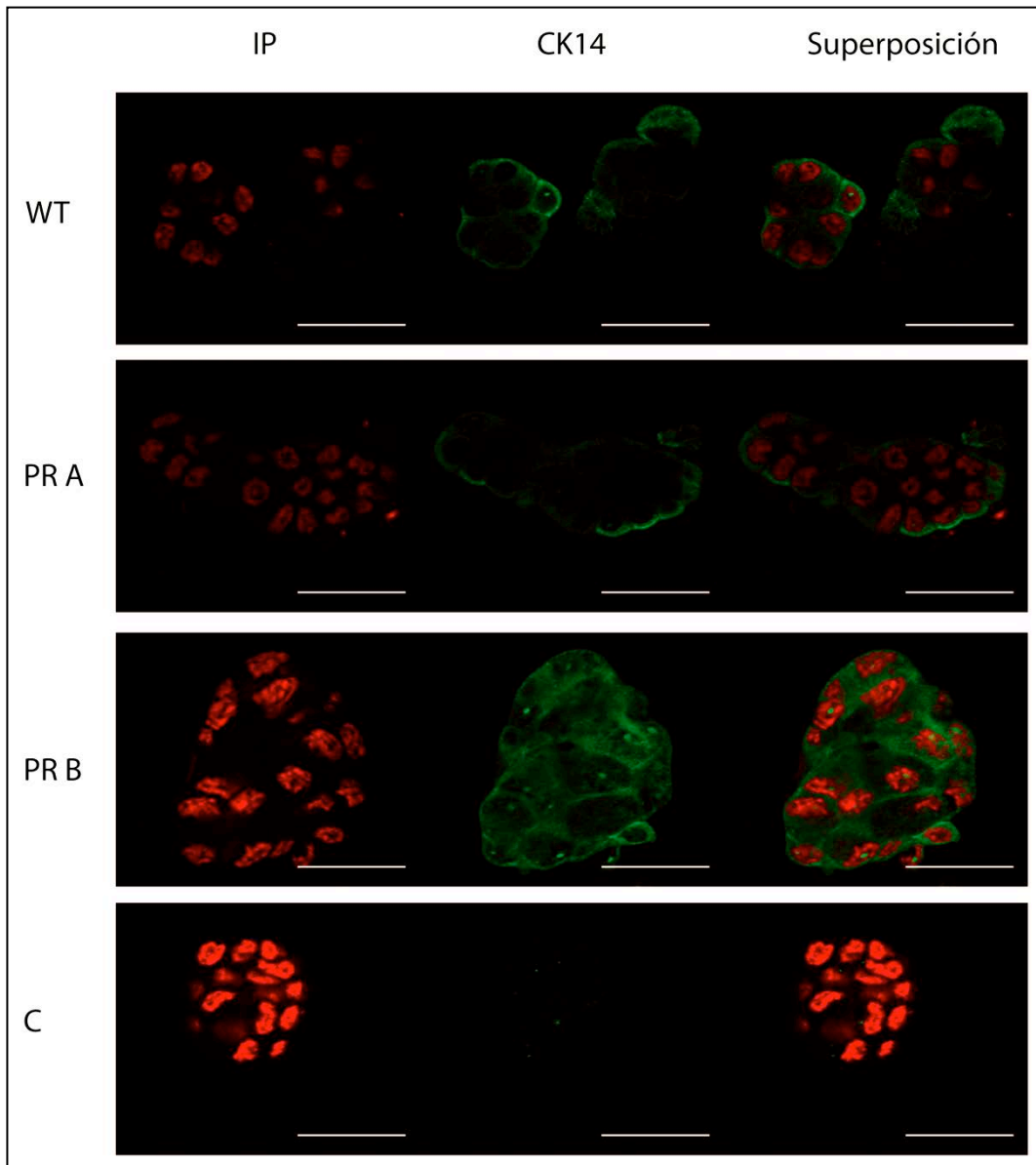


Figura 26. MFS PR B mayor expresión de citoqueratina 14. Imágenes representativas de MFS provenientes de ratones WT, PR A y PR B, marcadas con anticuerpo para CK14 y ioduro de propidio para teñir los núcleos. Estas imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal de fluorescencia con el objetivo 60x. La barra de escala representa 25µm. Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa Fiji.

Las MFS provenientes de las glándulas mamarias de los ratones transgénicos, así como los WT, presentaron marca para la CK14. En las MFS WT y PR A se observó una marca basal mientras que en las MFS PR B la marca perdió polaridad y se observó con mayor intensidad en toda la esfera.

Por último, se evaluó por esta técnica la presencia del factor de transcripción asociado a pluripotencialidad, Oct4. Oct4 regula la capacidad de autorenovación de las células madre embrionarias y adultas junto con Nanog y Sox2 (Hassiotou et al. 2013). La figura 27

muestra que en las MFS WT y PR A hay marca difusa nuclear y citoplasmática mientras que en PR B se la marca se concentra en el núcleo de una única célula (flecha).

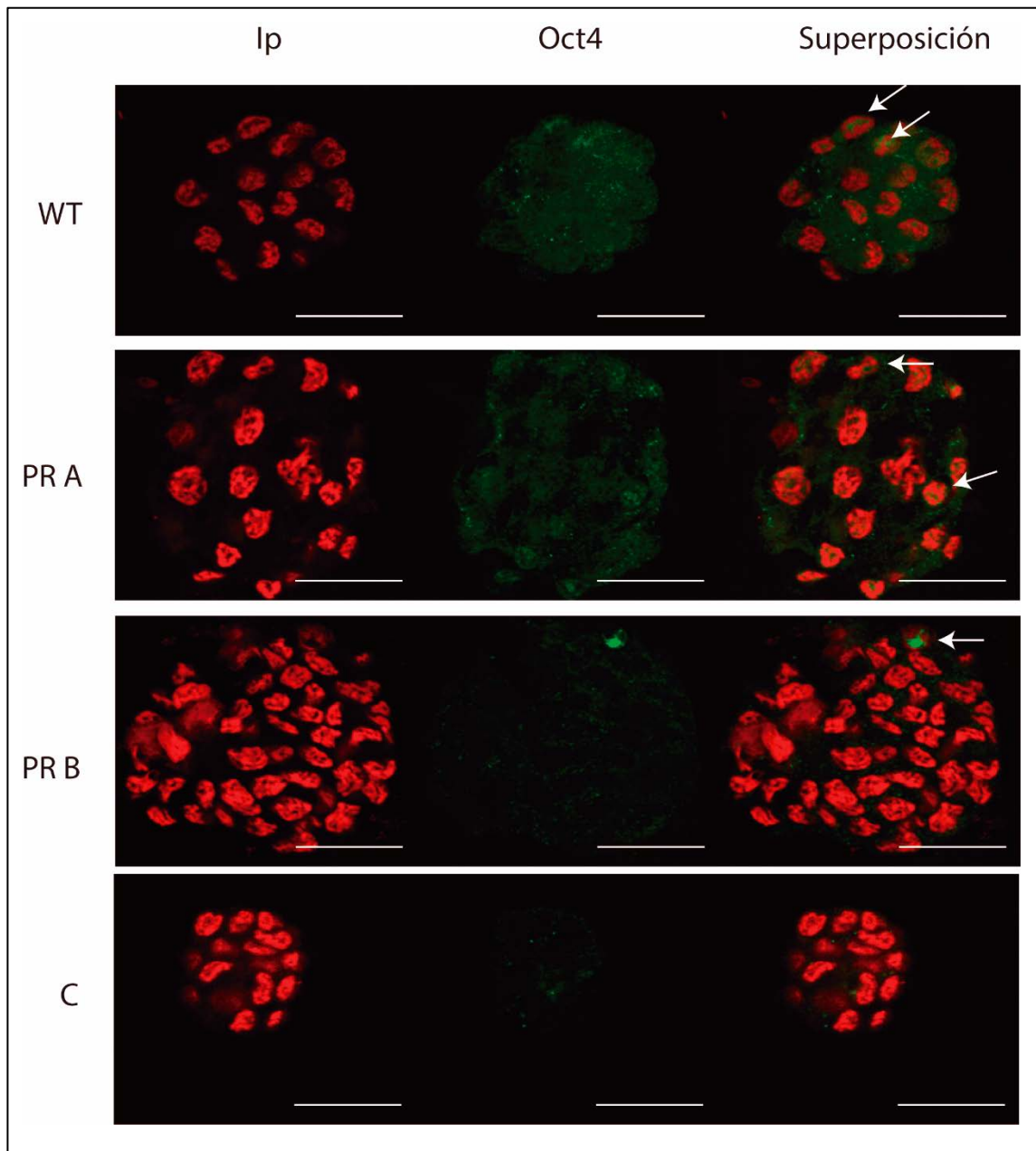


Figura 27. Expresión y localización de OCT4. Imágenes representativas de análisis por microscopía confocal de MFS provenientes de glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PRB, marcadas con anticuerpo para OCT4 y ioduro de propidio para teñir los núcleos. Estas imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal de fluorescencia con el objetivo 60x. La barra de escala representa 25 $\mu$ m. Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa Fiji.

Los resultados obtenidos en el primer objetivo sugieren que el desbalance en la relación PR A/PR B afecta no sólo el desarrollo normal de la glándula mamaria, sino también el reservorio de células madre/progenitoras de la misma. En particular estos experimentos revelan que sobre expresar PR B lleva a un aumento en el reservorio de células madre/progenitoras. Además, en cultivos de MFS se observó una pérdida de polaridad en la organización de las estructuras tridimensionales con el incremento de PR B. Por otra parte, la sobre expresión de PR A no modificó el reservorio de células madre/progenitoras respecto de un ratón WT, pero si aumentó la expresión de ER $\alpha$  en las MFS.

# Objetivo 2:

Investigar el papel de las hormonas ováricas sobre la población de células madre en el marco del desbalance de las isoformas del PR.

Regulación hormonal de la población de células madre en ratones que sobre expresan una u otra isoforma del PR.

Las hormonas ováricas E y P regulan el desarrollo normal de la glándula mamaria vía la acción de sus receptores ER y PR respectivamente. El papel que cumplen cada una durante este desarrollo ha sido ampliamente estudiado (Macias and Hinck 2012; Brisken and O'Malley 2010; Todd P. Knutson and Carol A. Lange\* 2012). En 2010 se publicaron dos trabajos en la revista Nature que revelan el papel de estas hormonas ováricas en la regulación de las células madre de la glándula mamaria murina (Joshi et al. 2010; Asselin-Labat et al. 2010). En ambos determinaron que la P estimula la expansión de la población de células madre a través de mecanismos paracrinós. Por otro lado, los E también jugarían un papel importante en esta regulación dado que la pérdida (por OVX o por tratamiento con un inhibidor de aromatasa) llevó a una disminución en la población progenitora luminal y afectó la funcionalidad de la población basal (Asselin-Labat et al. 2010).

Para investigar el efecto de las hormonas ováricas sobre el reservorio de células madre/progenitoras en el contexto de sobreexpresión de una u otra isoforma del PR se ovariectomizaron ratones hembra vírgenes WT, PR A y PR B de entre 18-20 semanas y luego de 14 días se sacrificaron y se extrajeron sus glándulas mamarias (torácicas e inguinales). A continuación, se muestran los montajes completos (MC) representativos de cada genotipo.

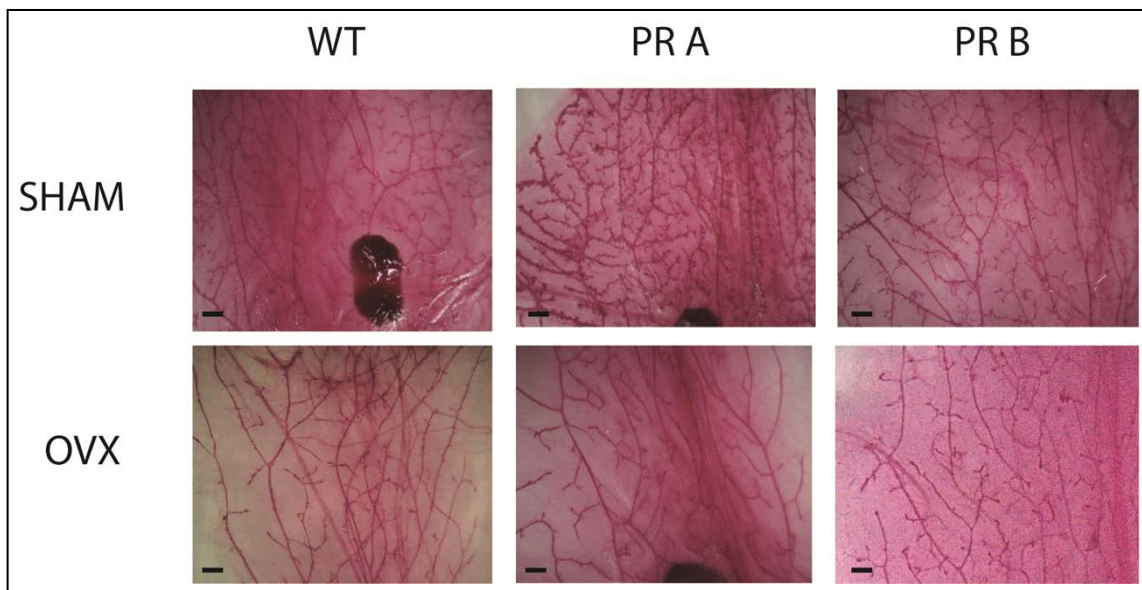


Figura 28: Efecto de la OVX en la glándula mamaria de ratones WT, PR A y PR B. Imágenes representativas de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B (izq. a der.) intactos (SHAM) u ovariectomizados (OVX) luego de la tinción con carmín-aluminio. La barra de escala corresponde a 500 $\mu$ m.

Los MC permitieron determinar la reducción del número de ramificaciones del árbol mamario en las glándulas mamarias de los ratones WT y los transgénicos como consecuencia de la OVX, como había sido descrito previamente por Shyamala y colaboradores (Shyamala et al. 1998).

Para evaluar el efecto sobre la población de células madre/progenitoras se disociaron mecánica y enzimáticamente las glándulas mamarias hasta obtener una suspensión unicelular, como se describió previamente. Luego se analizaron los porcentajes de células pertenecientes a cada población por citometría de flujo. En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos en 4 experimentos independientes.

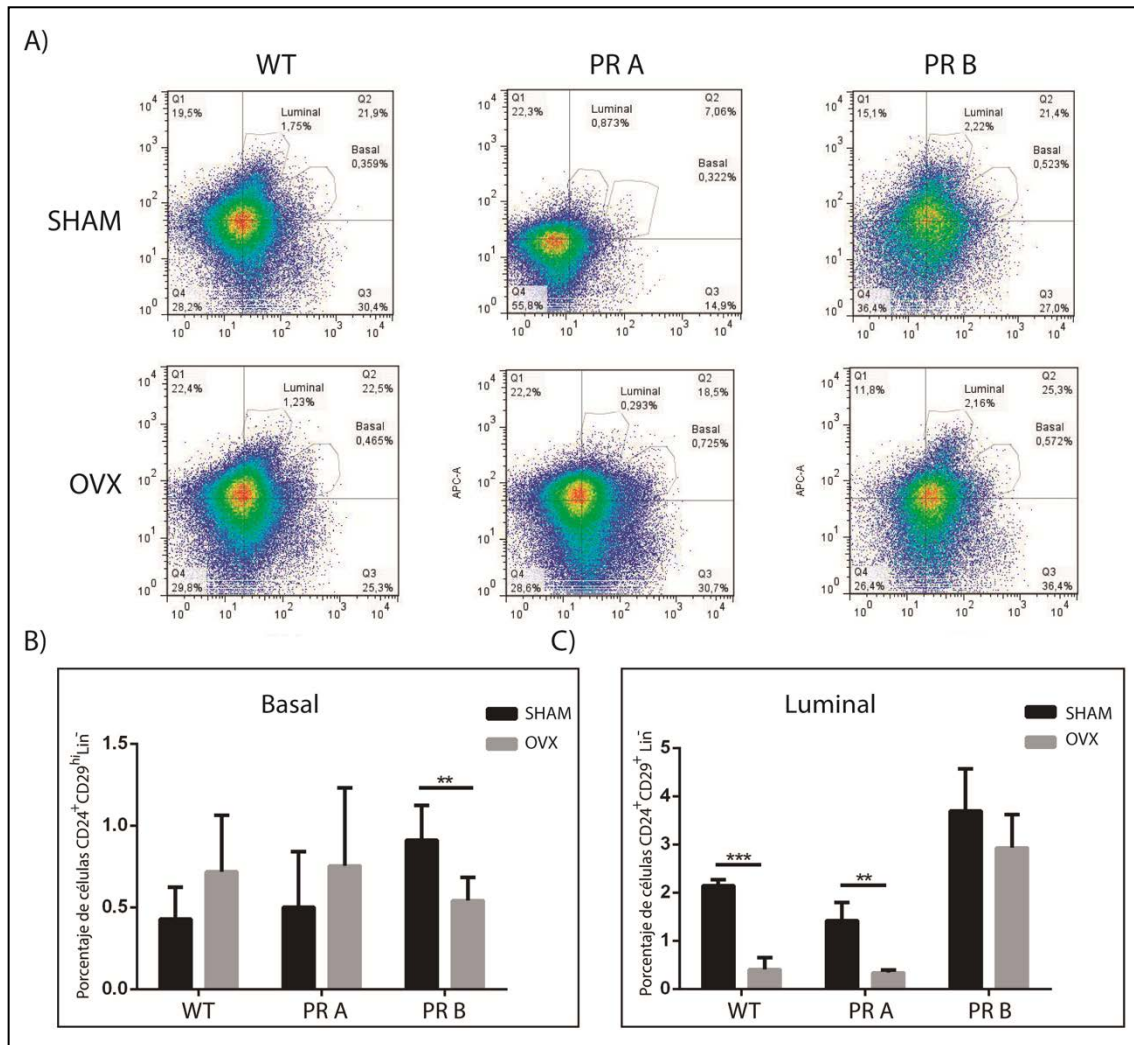


Figura 29. Efecto de la OVX sobre la población basal y luminal de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B. A) Gráficos representativos del análisis de las citometrías de flujo. Se muestra CD24 vs CD29 en la población Lin<sup>-</sup>. B) Porcentaje de células CD24<sup>+</sup>CD29<sup>hi</sup> (basales) de las glándulas mamarias provenientes de ratones WT, PR A y PR B intactos u OVX. Prueba t de Student dentro de cada grupo (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). C) Porcentaje de células CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+/low</sup> (progenitoras luminales) de las glándulas mamarias provenientes de ratones WT, PR A y PR B intactos u OVX. Prueba t de Student dentro de cada grupo (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Frente a la OVX, se obtuvo una disminución significativa en la población basal, enriquecida en células madre, para las glándulas mamarias provenientes de los ratones PR B, mientras que no se alteró en las glándulas mamarias de ratones WT y PR A, como había sido descrito previamente para ratones WT (Asselin-Labat et al. 2010). Respecto a la población progenitora luminal, se observó que luego de la OVX en ratones WT y PR A hubo una disminución significativa, en

concordancia con la disminución del árbol mamario. En cambio, en ratones PR B no hubo alteraciones en esta población.

Con el fin de evaluar por medio de un ensayo funcional la presencia de células madre/progenitoras en las glándulas mamarias de los ratones OVX, se realizaron ensayos de MFS a partir de las suspensiones celulares obtenidas de las glándulas mamarias de los ratones WT, PR A y PR B intactos u OVX. En la figura 30 se muestran los resultados obtenidos.

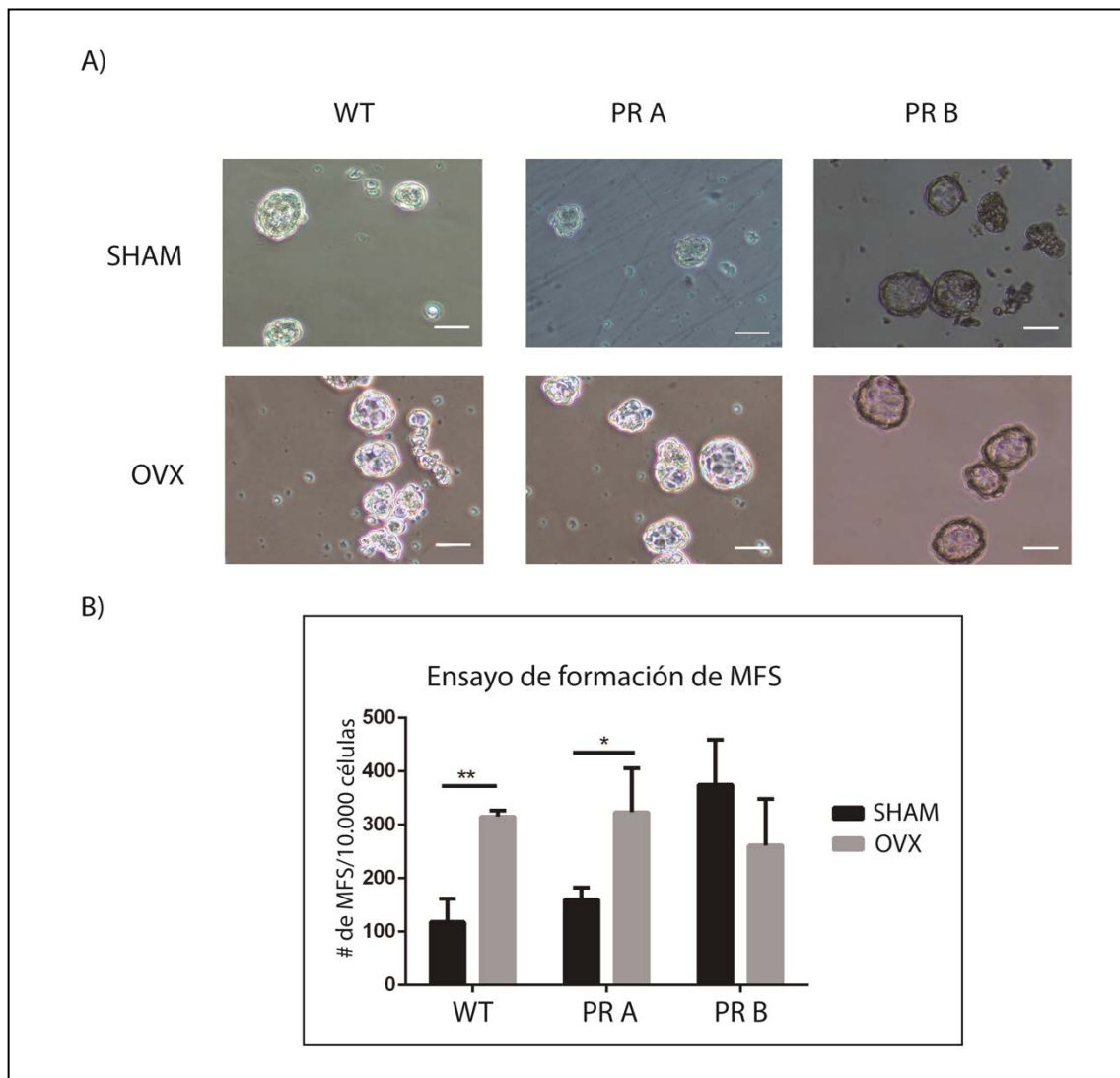


Figura 30: La OVX incrementa la capacidad de formar MFS de las células provenientes de ratones WT y PR A. A partir de la suspensión unicelular obtenida de la disgregación mecánica y enzimática de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B, SHAM u OVX, se sembraron 10.000 células/ml en placas de baja adherencia y en condiciones para mantenimiento de células madre (sin SFB, con B27 y EGF). La barra de escala representa 50µm. A) Imágenes representativas de las MFS obtenidas para cada genotipo por medio de un microscopio invertido en aumento 10x. B) Gráfico de barras de la cuantificación del número de MFS y análisis estadístico de 4 ensayos



independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas para un t de Student dentro de cada grupo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

La OVX llevó a un aumento significativo en el número de MFS en las suspensiones celulares derivadas de las glándulas mamarias de ratones WT y PR A, mientras que en las de ratones PR B el número de MFS no se vio afectado. Al analizar las MFS, se observó que las provenientes de las glándulas mamarias de ratones WT y PR A presentaron una morfología sólida o hueca en una proporción 1:3, mientras que las provenientes de las glándulas mamarias de ratones PR B fueron mayormente huecas (1:12). Este fenómeno había sido observado previamente (Figura 23), pero llamó nuestra atención especialmente al realizar estos experimentos. Luego de la OVX tanto en WT como en PR A se detectaron mayormente MFS huecas, indicando un cambio en estas proporciones asociado a la pérdida del control ovárico.

Ensayos preliminares de crecimiento en cultivos en 3 dimensiones (3D) en Matrigel, no mostraron diferencias en las estructuras formadas por las células provenientes de las suspensiones unicelulares de ratones WT, PR A y PR B, intactos u ovariectomizados, como se muestra a continuación.

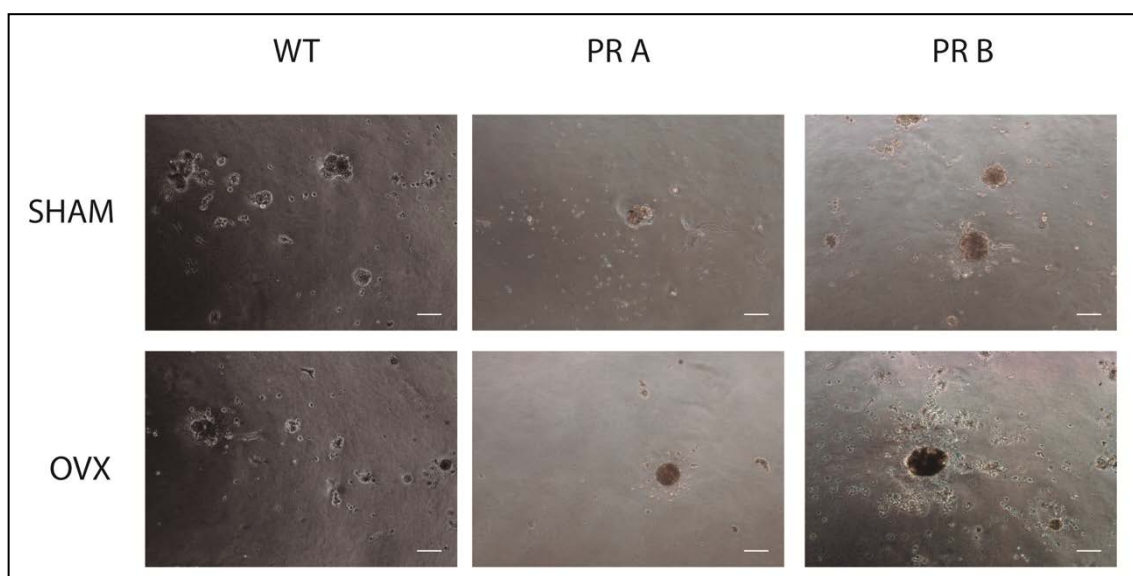


Figura 31. Las células derivadas de ratones WT, PR A y PR B desarrollan estructuras similares en cultivos 3D. Los cultivos unicelulares provenientes de la disgregación mecánica y enzimática de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B, intactos

u ovariectomizados fueron plaquedas en Laptex, que contenían Matrigel, en medio con 2%SFB, 2%matrigel y EGF 20nM. Las células crecieron bajo estas condiciones durante 7 días. Se muestran imágenes representativas tomadas bajo microscopio. La barra de escala representa 50µm.

Impacto del tratamiento con el anti estrógeno Fulvestran sobre la población de células madre.

A continuación, se evaluó el efecto del anti estrógeno Fulvestran (ICI 182 780) de ahora en más llamado ICI, sobre la población de células madre provenientes de ratones WT, PR A y PR B. Como se comentó en la introducción, este anti estrógeno bloquea por completo la actividad del ER llevándolo a su degradación (Nathan and Schmid 2017). Antecedentes en este modelo indican que el tratamiento con ICI en ratones PR A lleva a una reversión del fenotipo hiperplásico (Simian et al. 2009), al igual que la OVX. Además, la exposición prolongada a E está asociada al desarrollo de tumores mamarios en humanos (Eliassen et al. 2006). Resultó entonces interesante estudiar cómo afecta al reservorio de células madre/progenitoras tanto en glándulas mamarias de ratones que sobre expresan PR A como su efecto, no antes explorado, en ratones que sobre expresan PR B.

Con el objetivo de estudiar el impacto del ICI sobre la población de células madre en las glándulas mamarias de los ratones WT, PR A y PR B se trataron ratones hembra vírgenes de 20 semanas durante cuatro días seguidos con ICI o vehículo (ETOH). Al quinto día se sacrificaron los animales y se recolectaron las glándulas mamarias (inguinales y torácicas como se describió previamente). La figura 32 muestra los MC representativos luego de estos tratamientos:

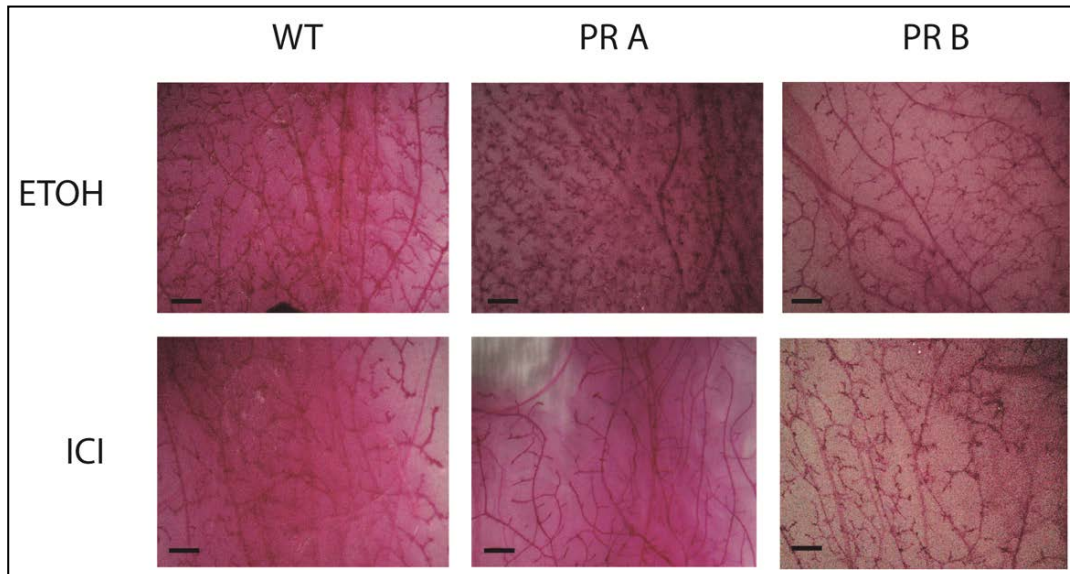


Figura 32. El tratamiento con ICI revierte el fenotipo hiperplásico de ratones PR A. Imágenes representativas de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B (de izquierda a derecha), control (ETOH) o tratados con ICI durante 4 días, teñidas con carmin-aluminio. La barra de escala representa 300 $\mu$ m

A través de la técnica del MC se observó el impacto del tratamiento con ICI sobre la morfología de la glándula mamaria. En el caso de las mamas provenientes de ratones PR A se observó una reversión del fenotipo hiperplásico, evidenciado por una disminución en el número de ductos y de brotes terminales. Sin embargo, en el caso de las mamas provenientes de ratones WT y PR B no se observaron prácticamente cambios. Para evaluar el efecto del ICI sobre la población de células madre/progenitoras de las glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B, evaluamos los marcadores CD24, CD29 en la población Lin<sup>-</sup> por citometría de flujo en las suspensiones unicelulares. La figura 32 resume los resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes.

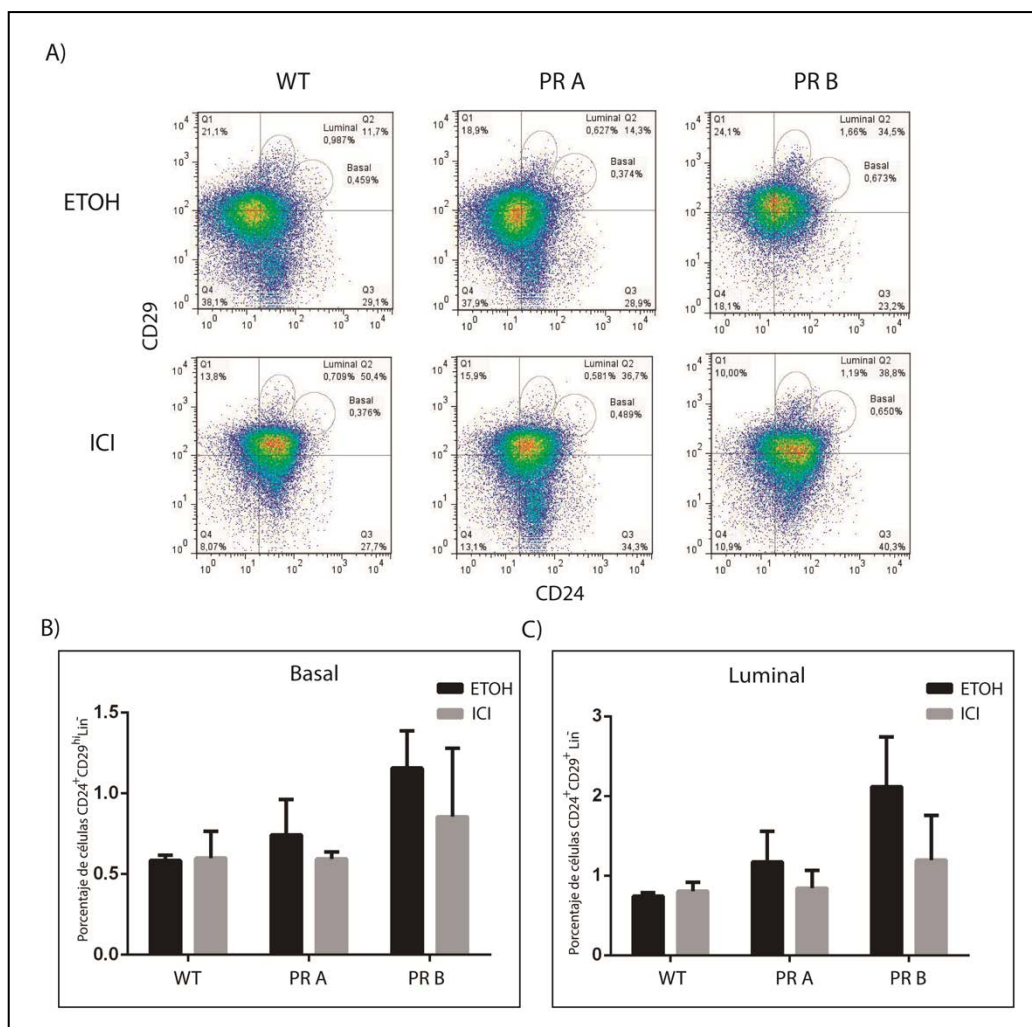


Figura 33. El tratamiento *in vivo* con ICI no afecta la proporción de las poblaciones basal ni progenitora luminal. A) Gráficos representativos del análisis de las citometrías de flujo obtenidas para cada ratón. Se muestra CD24 vs CD29 en la población Lin<sup>-</sup>. B) Porcentaje de células CD24<sup>+</sup>CD29<sup>hi</sup> (basales) de las glándulas mamarias provenientes de ratones WT, PR A y PR B tratados con ETOH o ICI. No se observaron diferencias significativas. C) Porcentaje de células CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+/-low</sup> (progenitoras luminales) de las glándulas mamarias provenientes de ratones WT, PR A y PR B tratados con ETOH o ICI. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

El tratamiento con ICI no modificó significativamente el reservorio de células madre/progenitoras en ninguna de las glándulas mamarias provenientes de los distintos ratones. Para estudiar si funcionalmente existen diferencias en el número de células madre realizamos ensayos de MFS a partir de las suspensiones celulares derivadas de las glándulas mamarias de los ratones WT, PR A y PR B tratados con ETOH o ICI.

A pesar de no observarse cambios en la población de células madre/progenitoras por citometría de flujo, se obtuvo un aumento significativo en el número de MFS frente al tratamiento con ICI en WT y

PR A, no así en PR B. La siguiente figura muestra los resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes.

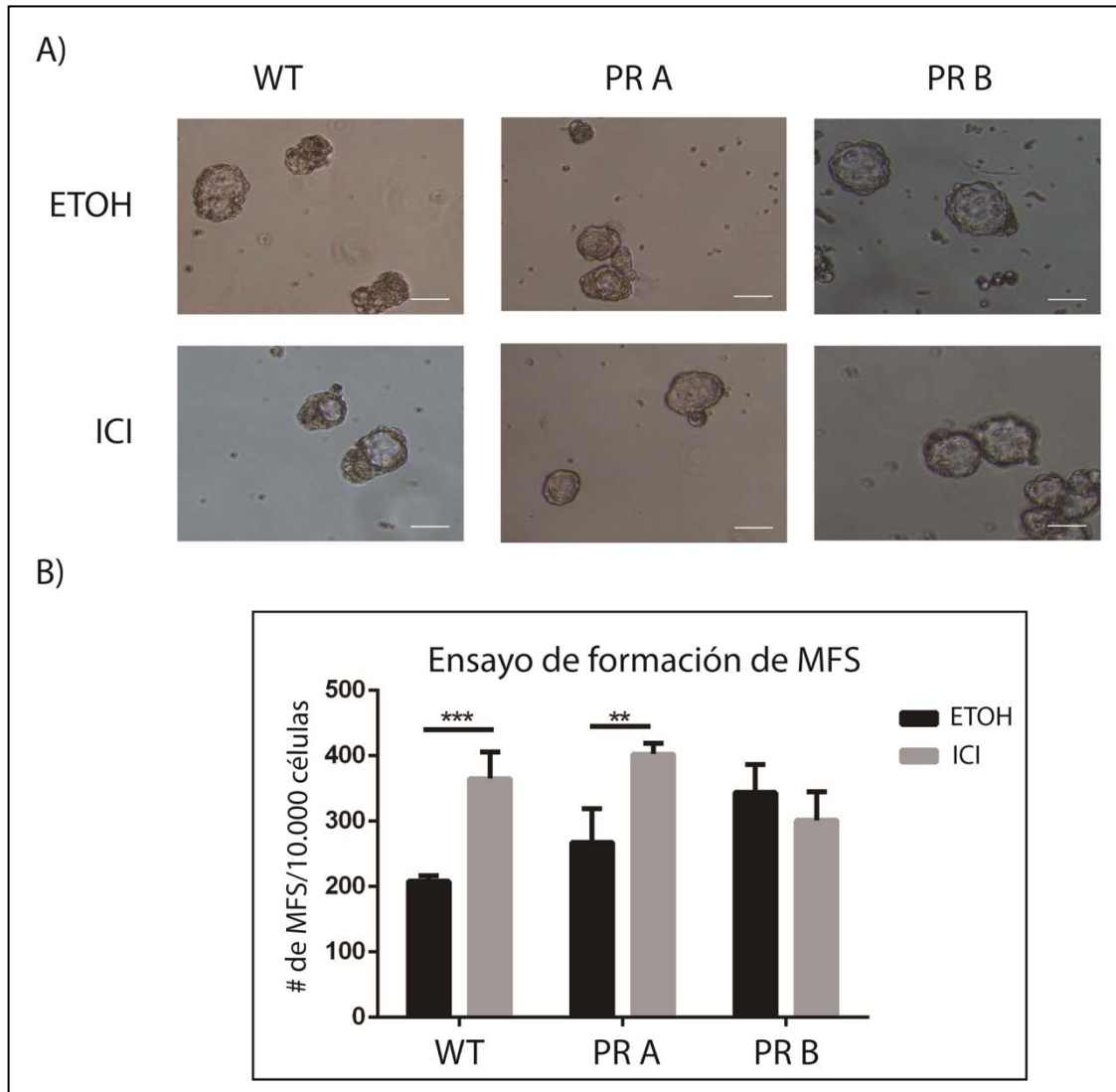


Figura 34. El tratamiento in vivo con ICI genera un aumento en la formación de MFS en ratones WT y PR A. Se plaquearon 10.000 células/ml en medio para MFS (sin SFB con B27 y EGF) y se dejaron crecer por 10 días, cuando se contaron y se tomaron fotos bajo microscopio. A) Imágenes representativas de las MFS obtenidas luego de los tratamientos ETOH e ICI. La barra de escala representa 50 $\mu$ m. El gráfico de barras corresponde a 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas para un t de Student dentro de cada grupo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Este resultado indica que el tratamiento con ICI aumenta el número de células madre/progenitoras, aunque no se observen cambios por citometría de flujo. Esto podría deberse a que la población basal/progenitora está formada por distintas subpoblaciones y cambios en estas no se pueden evaluar con los marcadores utilizados.

Con respecto a la morfología de las MFS se encontraron MFS sólidas y huecas en WT y PR A, con un aumento de las huecas con el tratamiento. En el caso de PR B siempre fueron huecas.

Impacto de tratamientos hormonales *in vitro* sobre la población de células madre/progenitoras

Por último, el tercer enfoque para estudiar el efecto de los E sobre la población de células madre se realizó tratando directamente las suspensiones unicelulares provenientes de glándulas mamarias de ratones WT, PR A y PR B con: Vehículo, 17- $\beta$ -Estradiol  $10^{-8}$ M y sus antagonistas: Tam (4-OH-tamoxifeno)  $10^{-6}$ M y Fulvestran  $10^{-6}$ M. Para ello se plaquearon 10.000 células/ml en condiciones para MFS, (DMEM F12 sin rojo fenol, sin SFB, con EGF y B27) en placas de baja adherencia en presencia de los distintos tratamientos, y se las cultivó durante 10 días. La figura 35 muestra los resultados obtenidos a partir de 3 ensayos independientes.

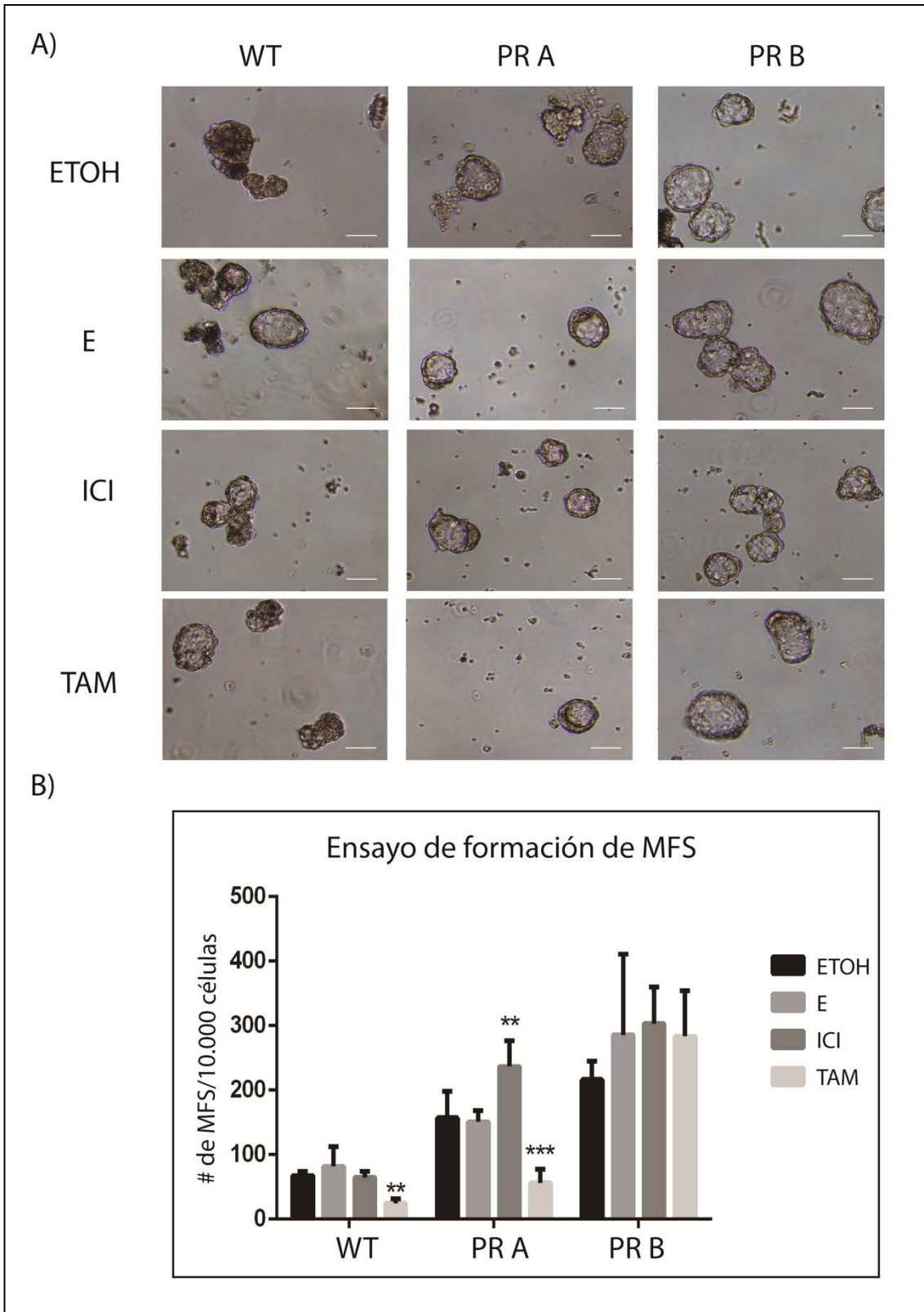


Figura 35: El TAM reduce la capacidad de formar MFS *in vitro* en WT y PR A. Se plaquearon 10.000 células/ml en placas de baja adherencia en medio para MFS (DMEM F12 sin rojo fenol, sin SFB, con B27 y EGF), se dejaron crecer durante 10 días, y se contaron bajo microscopio. La barra de escala representa 50µm. A) Imágenes representativas de las MFS obtenidas luego de los 10 días de tratamiento. B) Gráfico de barras correspondiente a 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas para ANOVA de un factor dentro de cada grupo (WT

p=0,0005; PR A p<0,0001; PR B p=n.s), seguido de contrastes de Dunnet (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

El tratamiento con TAM llevó a una disminución significativa de la formación de MFS de las células provenientes de ratones WT y PR A. Por el contrario, el tratamiento con ICI llevó a un aumento significativo en el número de MFS de las células provenientes de ratones PR A. Este efecto contradictorio entre ambos anti estrógenos puede deberse a que los mecanismos de acción que median sus efectos son diferentes. El resultado obtenido con ICI indicaría que inducir la degradación del ER llevaría a un aumento en la capacidad de formar MFS, en concordancia con los resultados obtenidos por el tratamiento *in vivo* con este anti estrógeno. En el caso de las células provenientes de los ratones PR B la formación de MFS no se vio alterada por ningún tratamiento. El tratamiento con E no afectó la capacidad de formar MFS de las células madre en ninguno de los 3 casos.

Los resultados obtenidos en los objetivos 1 y 2 sugerirían que los ratones que sobre expresan la isoforma B del PR presentan una mayor cantidad de células madre/ progenitoras basales y progenitoras luminales. Además, la respuesta a la manipulación hormonal es diferencial de acuerdo a cuál isoforma de PR se sobre exprese.



## Objetivo 3:

Estudiar el papel de las isoformas del PR sobre la población de células madre tumorales (CSC) en un modelo *in vitro* de células tumorales humanas.

## Modelo tumoral de expresión diferencial de las isoformas del PR

El rol diferencial de las isoformas del PR en cáncer de mama sigue siendo controversial. Trabajos en modelos de líneas celulares indican que sobre expresar PR B lleva a fenotipos más agresivos (Sequeira et al. 2014; Bellance et al. 2013), mientras que trabajos en muestras de pacientes indican que es más frecuente el aumento de PR A y que esto está asociado a peor pronóstico (Hopp et al. 2004). Por otra parte, el trabajo de Bonneterre y colaboradores indica que el desbalance tanto hacia una isoforma o la otra lleva a tumores más agresivos comparado con tumores que expresan niveles similares de ambas isoformas. Sin embargo, los que sobre expresan PR B están asociados con estadios más avanzados de la enfermedad (Bonneterre et al. 2016).

Dado que las células madre son candidatas a sufrir alteraciones que lleven al desarrollo de tumores (Wicha, Liu, and Dontu 2006; Azizi and Wicha 2012) y que la P media la expansión de esta población (Axlund et al. 2013; Hilton et al. 2014; Finlay-Schultz et al. 2015), es que resultó de interés estudiar en un contexto tumoral humano el impacto de cada isoforma del PR sobre la población de células madre tumorales o CSC, por sus siglas en inglés.

Para abordar este objetivo se contó con la línea celular tumoral humana derivada de un adenocarcinoma mamario, T47D (de ahora en más T47D WT). Esta línea se caracteriza por expresar ambas isoformas del PR en proporciones similares. A partir de la misma se generaron 3 sub líneas: T47D Y (no expresa PR), T47D YA (expresa sólo la isoforma A) y T47D YB (expresa sólo la Isoforma B)(C. a. Sartorius et al. 1994).

Al recibir las líneas, se comprobó por WB e IF la correcta expresión de PR, ER y E-cadherina (E-cad) como se muestra a continuación.

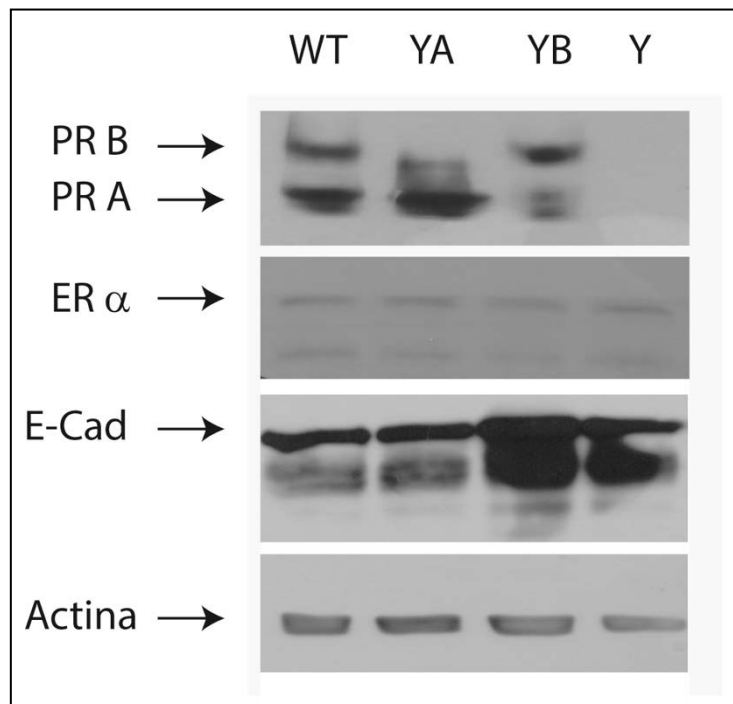


Figura 36. Expresión de PR, ER- $\alpha$  y E-Cad en T47D. Geles representativos de la expresión del PR, ER- $\alpha$  y E-cadherina en las líneas T47D WT, Y, YA e YB. La actina se utilizó como control de carga.

Los niveles de E-cad se evaluaron con el fin de conocer la posibilidad de las líneas de formar MFS; se ha reportado que la falta de expresión de la misma no permite el crecimiento en las condiciones para MFS (Manuel Iglesias et al. 2013). La figura 37 muestra la expresión de PR y E-cadherina por IF.

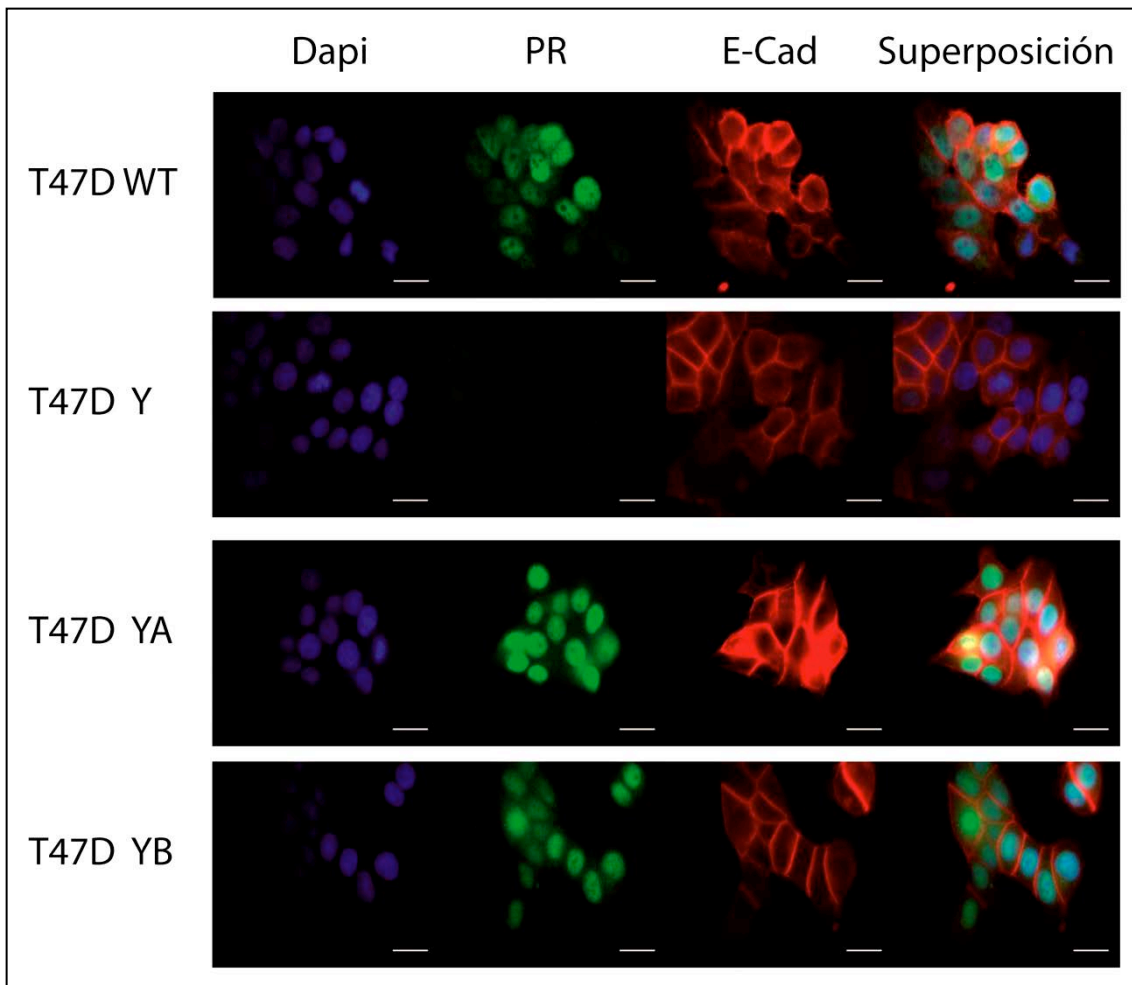


Figura 37: Expresión y localización de PR y E-Cad en T47D. Células T47D WT, Y, YA e YB fueron crecidas sobre vidrios (cubre objetos). Se utilizaron anticuerpos específicos para PR (verde) y E-cad (rojo) acoplados a los fluoróforos correspondientes. Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). Se tomaron las fotos en un microscopio invertido de fluorescencia con el objetivo 40x. La barra de escala representa 40µm.

La IF no sólo reconfirmó lo observado por WB, sino que además nos brindó información sobre la localización de las proteínas en estudio. El PR se encontró en el núcleo en las 3 líneas sugiriendo que estaba transcripcionalmente activo.

Identificación de células madre tumorales (CSC) en el modelo tumoral T47D.

Una vez confirmado el modelo, se estudiaron las características de las células madre de la línea parental y sus derivados. Las CSCs de tumores de mama humanos se pueden identificar con distintos marcadores de superficie, en este caso se utilizaron los marcadores

CD24 (antígeno de calor estable) y CD44 (glicoproteína de superficie) que han sido ampliamente utilizados en la literatura (Muhammad Al-Hajj and Clarke 2004; M. Al-Hajj et al. 2003). Las CSCs se caracterizan por ser CD24<sup>-/low</sup>CD44<sup>+</sup>. Con el fin de identificar esta población las células fueron levantadas con tripsina, obteniendo una suspensión unicelular. Esta suspensión unicelular fue marcada con los anticuerpos correspondientes y las células se analizaron por un citómetro de flujo.

La figura 38 muestra los resultados obtenidos para las 4 líneas celulares en 3 experimentos independientes.

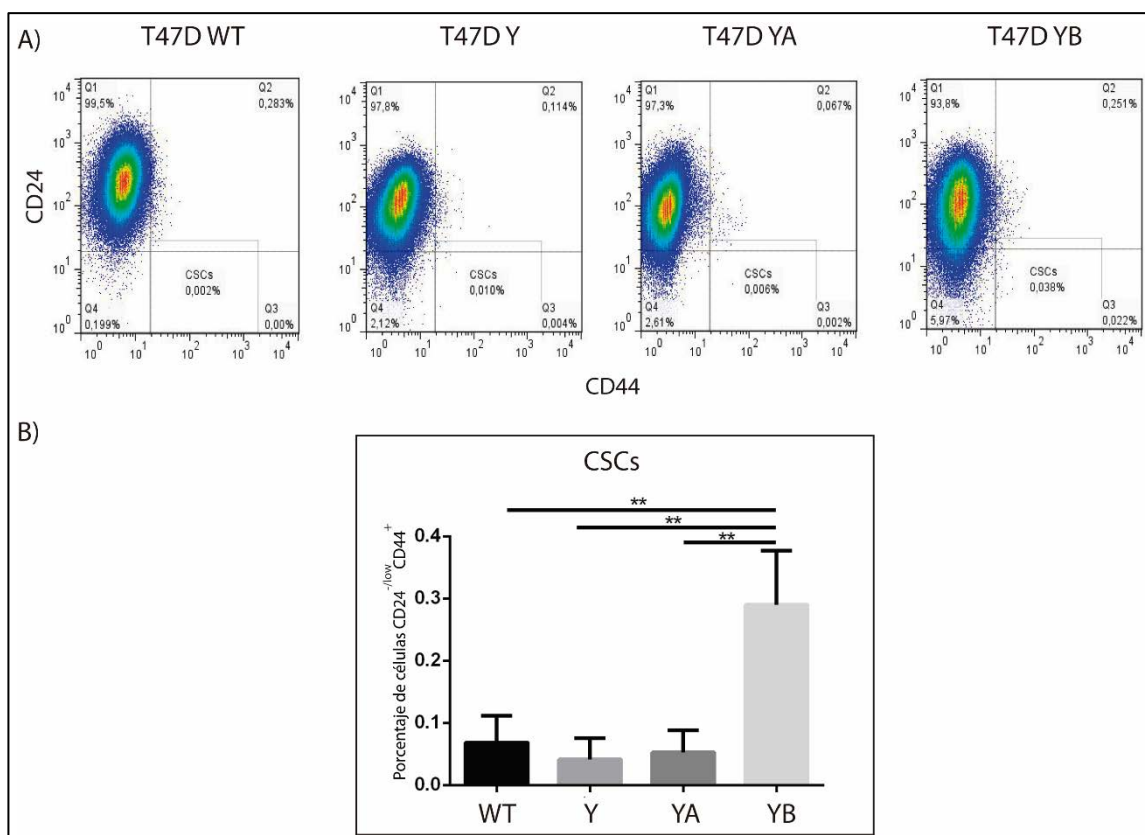


Figura 38. La línea T47D YB presenta mayor porcentaje de CSCs. Las líneas T47D WT, Y, YA e YB fueron tripsinizadas hasta obtener una suspensión unicelular que se incubó con los anticuerpos CD44-FITC y CD24-APC. A) Gráficos representativos de la citometría de flujo para cada línea celular. B) Cuantificación y análisis estadístico a partir de 3 ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas para un ANOVA de 1 factor ( $p=0,015$ ) seguido de contrastes de Tukey (\*\* $p<0,01$ ).

Como fue reportado previamente, la línea T47D presentó un muy bajo porcentaje de células CD24<sup>-/low</sup>CD44<sup>+</sup> (Finlay-Schultz et al. 2015; Goyette et al. 2017). Las líneas derivadas T47D Y y T47D YA mantuvieron

similares niveles de CSCs respecto a WT, en cambio la línea T47D YB presentó un porcentaje significativamente mayor comprado con las otras tres líneas.

Al igual que las células madre mamarias normales, las CSC son capaces de crecer en condiciones de baja adherencia y formar mamoesferas u "oncoesferas". Se ha descrito previamente que la línea T47D es capaz de formar MFS (Manuel Iglesias et al. 2013). A diferencia de las MFS provenientes del tejido normal, las MFS de estas líneas celulares crecieron más rápido y alcanzaron mayor tamaño. En este sentido fue necesario establecer la cantidad de células a sembrar para obtener MFS y no agrupaciones celulares. Se realizaron pruebas con 5000, 1000, 500 y 200 células/ml y se encontró que las condiciones óptimas eran 500 células/ml, cultivándolas durante 7 días. Otra característica de las MFS tumorales es que pueden sobrevivir a sucesivos pasajes obteniendo MFS secundarias, terciaras, y así sucesivamente.

Con el fin de evaluar la capacidad de formar MFS de las líneas T47D Y, T47D YA y T47D YB, se incubaron 500 células/ml en condiciones para MFS durante 7 días, en este momento se tomaron fotografías para evaluar su tamaño y forma. Estas MFS se disgregaron por tripsinización y se volvieron a sembrar en las mismas condiciones para generar MFS secundarias.

En la figura 39 puede observarse que, a pesar de encontrar diferencias por citometría de flujo, el número de MFS obtenido fue similar para las 4 líneas tanto primarias como secundarias; se muestran los resultados de 4 ensayos independientes.

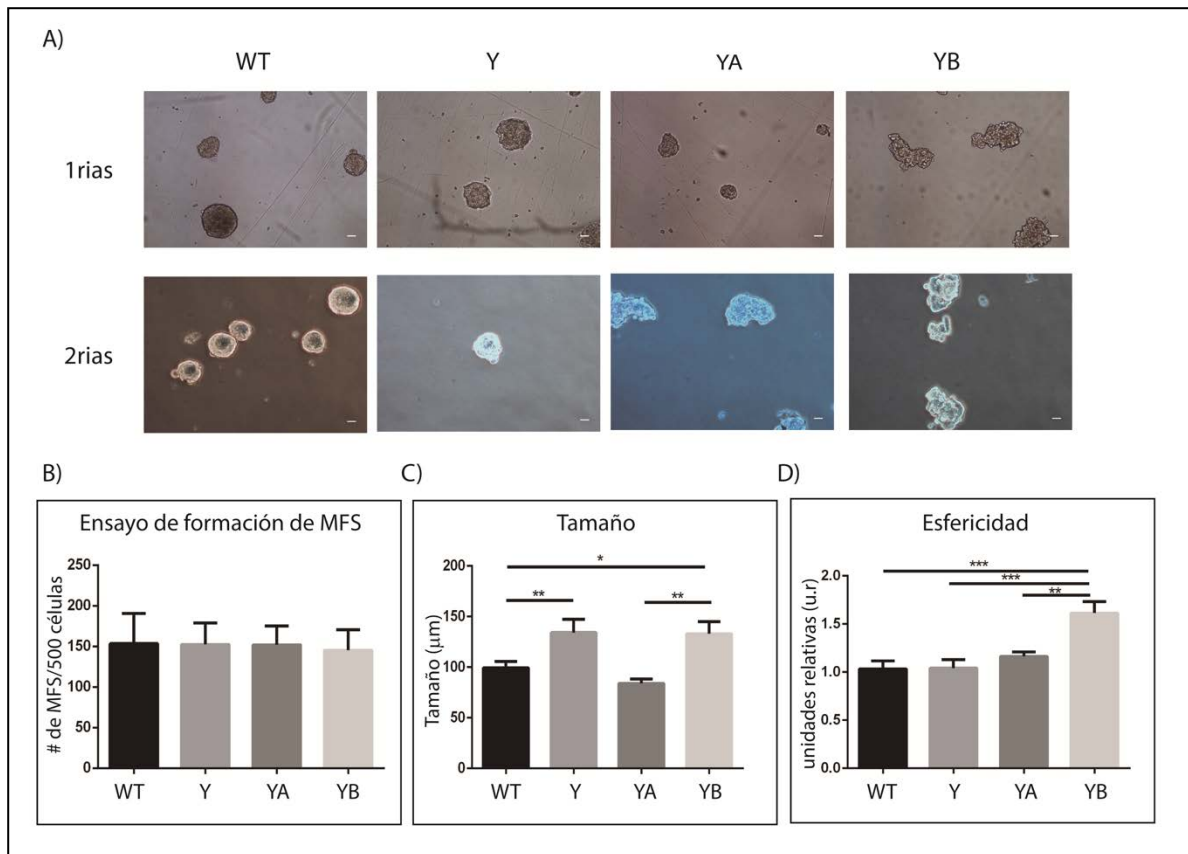


Figura 39: Las MFS de la línea T47D YB presentaron mayor tamaño e irregularidad. se plaquearon 500 células/ml en placas de baja adherencia en medio DMEM F12, sin rojo fenol, sin SFB con el agregado de B27 y EGF. A) Imágenes representativas de las MFS obtenidas para las líneas T47D WT, Y, YA e YB. Arriba la primera generación, abajo la segunda (se disgregaron las MFS primarias y se volvieron a plaquear). La barra de escala representa 50μm. B) Cuantificación y estadística del número de MFS a partir de 4 ensayos independientes (cada uno con 3 réplicas). No se encontraron diferencias significativas. C) Tamaño de MFS. El tamaño de las MFS se midió a partir de las fotos tomadas (5 por pocillo, 3 pocillos por línea) de tres ensayos independientes. Se utilizó el programa Fiji para el análisis de las imágenes. Los asteriscos indican diferencias significativas para un ANOVA de un factor ( $p=0,0005$ ) seguido de contrastes de Tukey ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ). D) Esfericidad. Esta medida se tomó nuevamente por medio del programa Fiji, midiendo ambos diámetros de cada esfera y luego calculando el cociente (diámetro mayor/diámetro menor). Los asteriscos indican diferencias significativas para un ANOVA de un factor ( $p<0,0001$ ) seguido de contrastes de Tukey ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ).

Quando se analizó el tamaño y la forma de las MFS obtenidas se encontraron diferencias entre las cuatro líneas. La MFS obtenidas a partir de la línea T47D YB fueron de mayor tamaño y más irregulares (o menos esféricas) que las WT e YA. La esfericidad se considera un índice de malignidad en cultivos de células en Matrigel (Kenny et al. 2007): cuanto más irregulares son las estructuras se asocian a un mayor grado de malignidad.

Otra aproximación para estudiar la malignidad de una línea celular es evaluar su capacidad clonogénica. Este ensayo estudia la capacidad de una célula aislada de formar una colonia. Con este fin se disgregaron las MFS obtenidas a partir de cada línea, y se plaquearon 1000 células por pocillo de 35mm (baja confluencia) en medio completo (con suero). A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

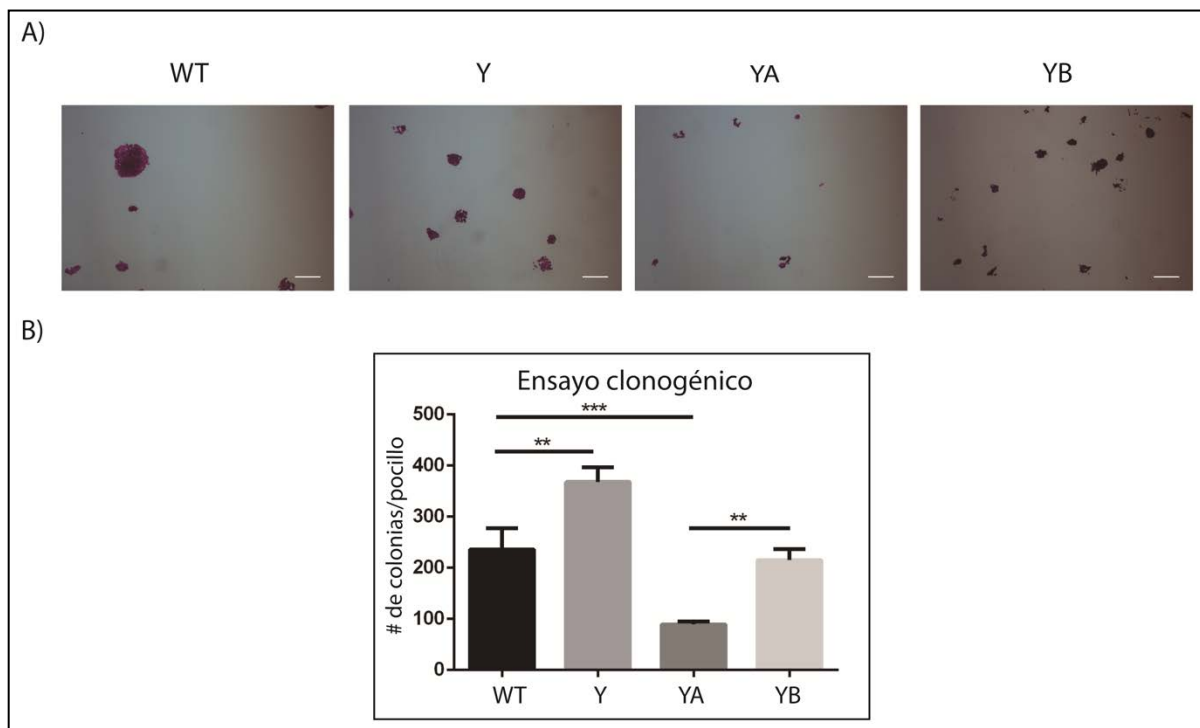


Figura 40. Las células T47D YB tienen mayor capacidad clonogénica que las YA. Las MFS de las 4 líneas (T47D, T47D Y, T47D YA, T47D YB) fueron disgregadas por tripsinización y plaqueadas en baja confluencia (1000células/pocillo). A los 10 días los cultivos se tiñeron con cristal violeta y se contaron las colonias bajo microscopio. La barra de escala representa 50 $\mu$ m. A) Imágenes representativas de las colonias obtenidas a partir de las MFS. B) Cuantificación del número de colonias por pocillo en tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas para un ANOVA de 1 factor ( $p=0,001$ ), seguido por contrastes de Tukey (\*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

La línea T47D Y es la que presentó mayor capacidad clonogénica, así como también el mayor tamaño en las MFS. Estos resultados sugieren que la línea Y resulta más agresiva que las líneas que expresan al menos una de las dos isoformas del PR, lo cual concuerda con la literatura (Wenger, C and Clark 1998; Lange, C 2008). Tumores negativos para PR están asociados a peor pronóstico, además los tumores que forman las



T47D-Y son de mayor tamaño que los YA, YB y WT (Carol A. Sartorius, Shen, and Horwitz 2003).

Al comparar entre WT, YA e YB se observó que T47D YA presentó la menor capacidad clonogénica. Este resultado indicaría que la falta de la isoforma B del PR llevaría a un fenotipo menos agresivo. Esto se evidenció al comparar la capacidad clonogénica de la línea WT respecto de la línea YB e YA. Además, es coherente con el resultado obtenido respecto al tamaño y esfericidad de las MFS obtenidas para cada línea celular.

### Expresión y localización de genes pluripotenciales.

Como se describió previamente, otra característica de las células madre es la expresión de genes pluripotenciales, principalmente SOX2, OCT4 y NANOG (Hassiotou et al. 2013). Con el fin de determinar los niveles de expresión de estos tres genes se realizaron extractos de ARN tanto para la monocapa como para las MFS de las líneas T47D WT, Y, YA e YB. A partir de estos extractos se realizaron ensayos de retro-transcripción seguidos de qPCR, con primers específicos para cada uno de los genes pluripotenciales. La figura 41 muestra los resultados obtenidos para 3 ensayos independientes.

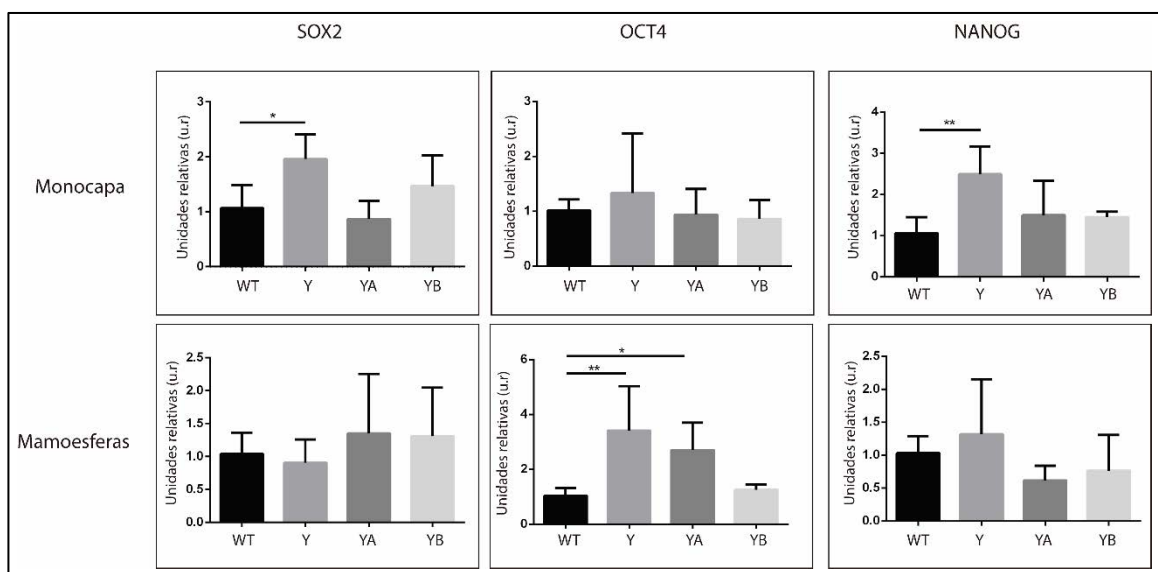


Figura 41. Expresión de genes pluripotenciales. A) Monocapa. A partir de RNA extraído de la monocapa se realizó RT seguida de qPCR con primers específicos para SOX2, OCT3/4, NANOG y GAPDH. Este último se usó como gen de referencia para el análisis de los datos a través del método delta CT. Los asteriscos implican diferencias significativas respecto del control. ANOVA de 1 factor N=3, SOX2:  $p=0,0001$ ; OCT4:  $p=n.s$ ; NANOG:  $p=0,0006$ ; seguido por contrastes de Tukey ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ). B) MFS. A partir de RNA extraído de las MFS se realizó RT seguida de qPCR con primers específicos para SOX2, OCT3/4, NANOG y GAPDH. Este último se usó como gen de referencia para el análisis de los datos a través del método de delta CT. Los asteriscos implican diferencias significativas respecto del control. ANOVA de 1 factor N=3; SOX2:  $p=n.s$ ; OCT3/4:  $p=0,0024$ ; NANOG:  $p=n.s$ ; seguidos por contrastes de Tukey ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ).

Los resultados obtenidos por qPCR fueron diferentes según las condiciones de cultivo. Al evaluar la monocapa se observó que la línea T47D Y presentó mayor expresión de SOX2 y NANOG, mientras que OCT4 no varió al comparar cada mensajero con la expresión de la línea T47D WT. Por otro lado, en las MFS no se encontraron cambios en la expresión de SOX2 y NANOG, pero OCT4 aumentó en T47D Y e YA respecto de las MFS de la línea T47D WT.

Se estudió la localización celular de las proteínas Sox2 y Oct4 dado que el nivel de expresión no provee información sobre su actividad. La siguiente figura muestra la localización de Oct4 en la monocapa de las 4 líneas celulares en estudio.

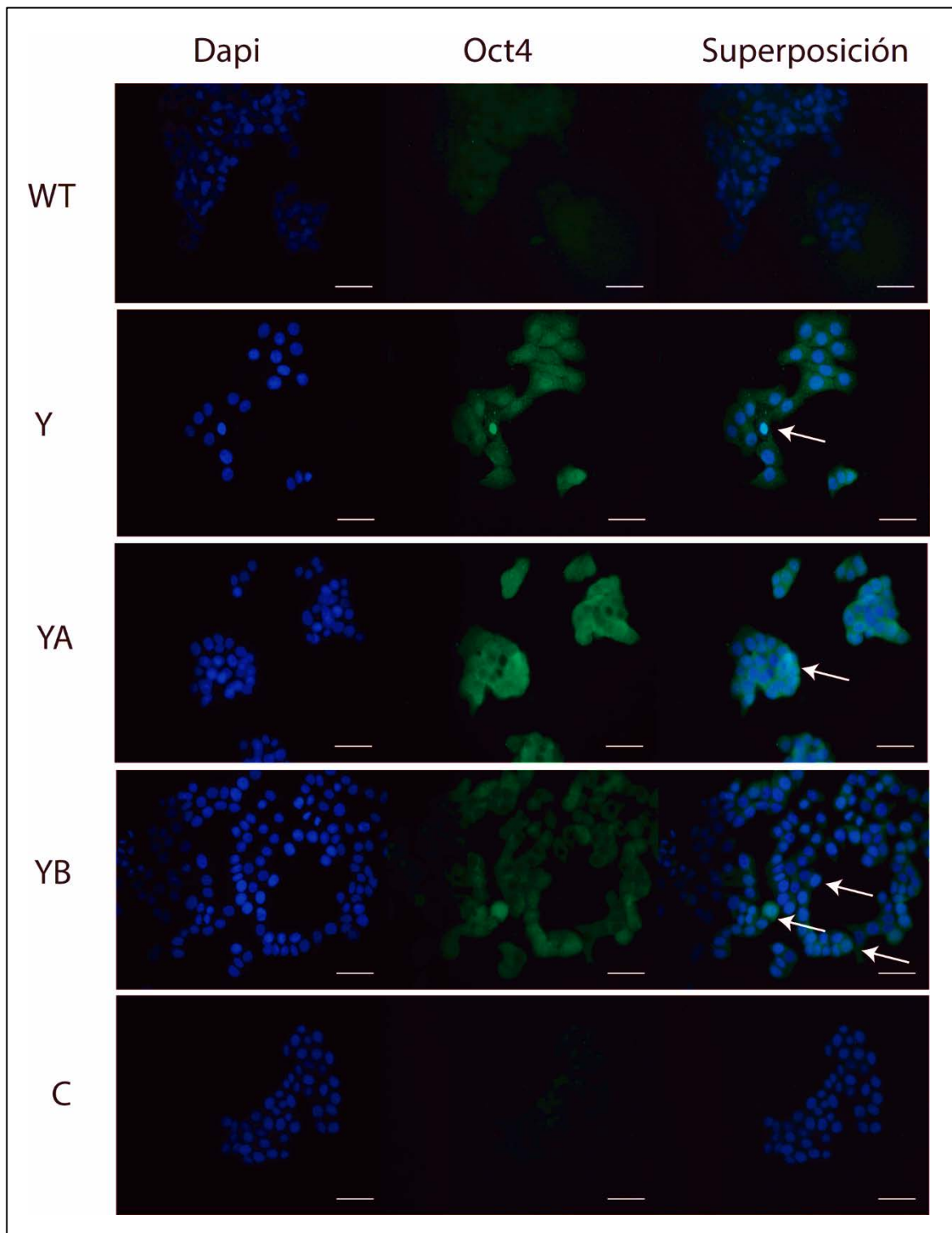


Figura 42. Inmunofluorescencia Oct4 en monocapa. Células T47D WT, Y, YA e YB fueron crecidas sobre cubreobjetos, donde se realizaron las incubaciones correspondientes para IF, como se describe en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo contra Oct4 y se tiñeron los núcleos con Dapi. En el control no se utilizó el anticuerpo primario. Las fotos se tomaron en un microscopio invertido de fluorescencia con el objetivo 40X. La barra de escala representa 20µm.

Para Oct4 se observó una marca difusa y suave en WT en concordancia con la baja expresión detectada por qPCR. En las líneas Y, YA e YB se observó mayor intensidad con una distribución uniforme entre el núcleo y el citoplasma excepto por células (flechas blancas) en las que ocasionalmente se encontró a Oct4 en el núcleo.

Para evaluar la expresión y localización de Oct4 en las MFS se realizó inmunofluorescencia de las mismas.

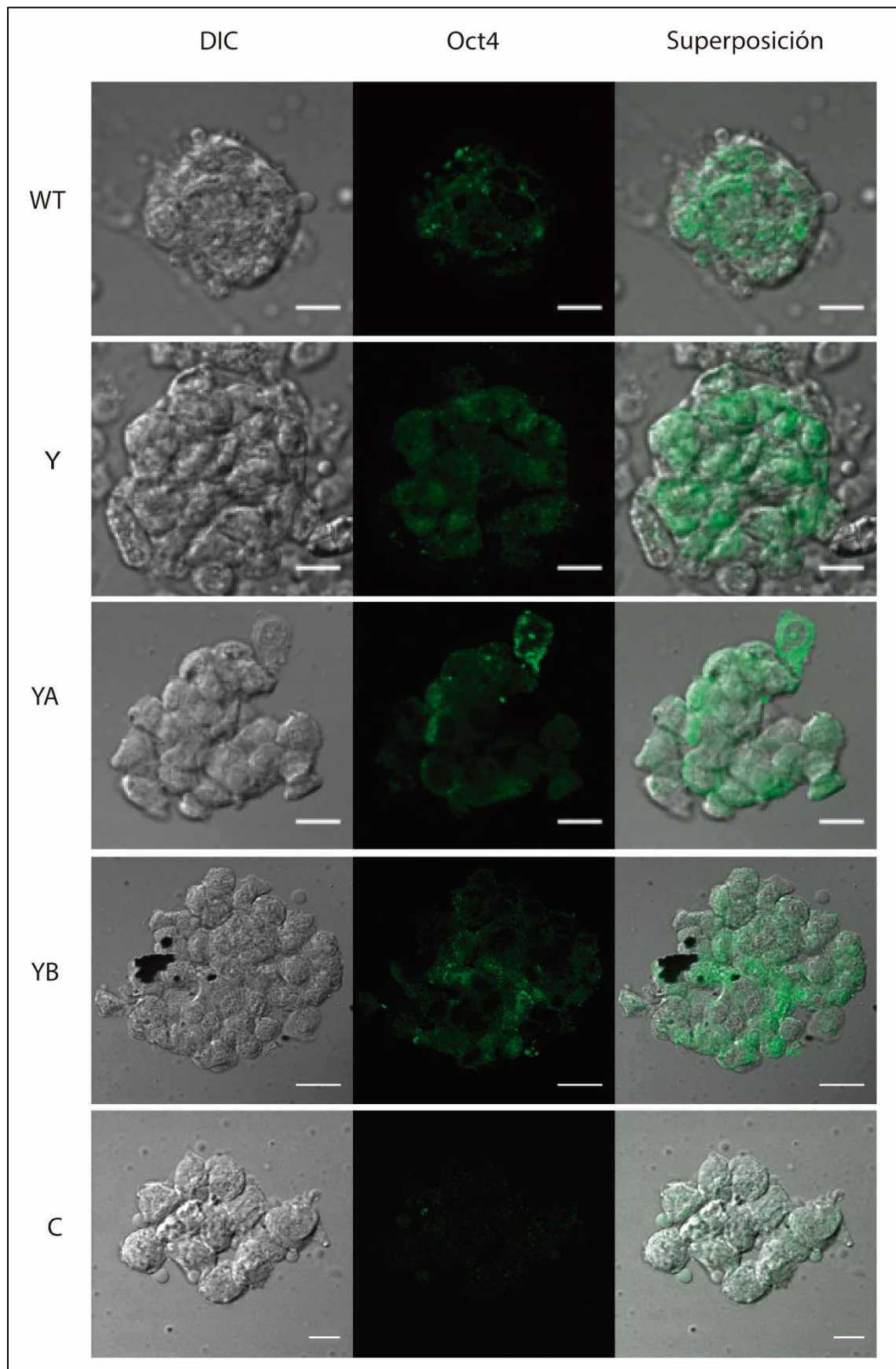


Figura 43. Inmunofluorescencia Oct4 en MFS. Las MFS derivadas de T47D WT, Y, YA e YB fueron fijadas sobre vidrios cargados, donde se realizaron las incubaciones correspondientes para IF, como se describe en materiales y métodos. Se utilizó un

anticuerpo específico contra Oct4. C se refiere al control sin anticuerpo 1rio. Las fotos se tomaron en un microscopio confocal de fluorescencia con el objetivo 60X. La barra de escala representa 20µm.

La expresión de Oct4 fue difusa entre el núcleo y el citoplasma en las MFS provenientes de las 4 líneas, siendo las MFS WT las que presentaron menor expresión. A continuación, se muestran la tinción de Sox2 en la monocapa (figura 44) y en las MFS (figura 45).

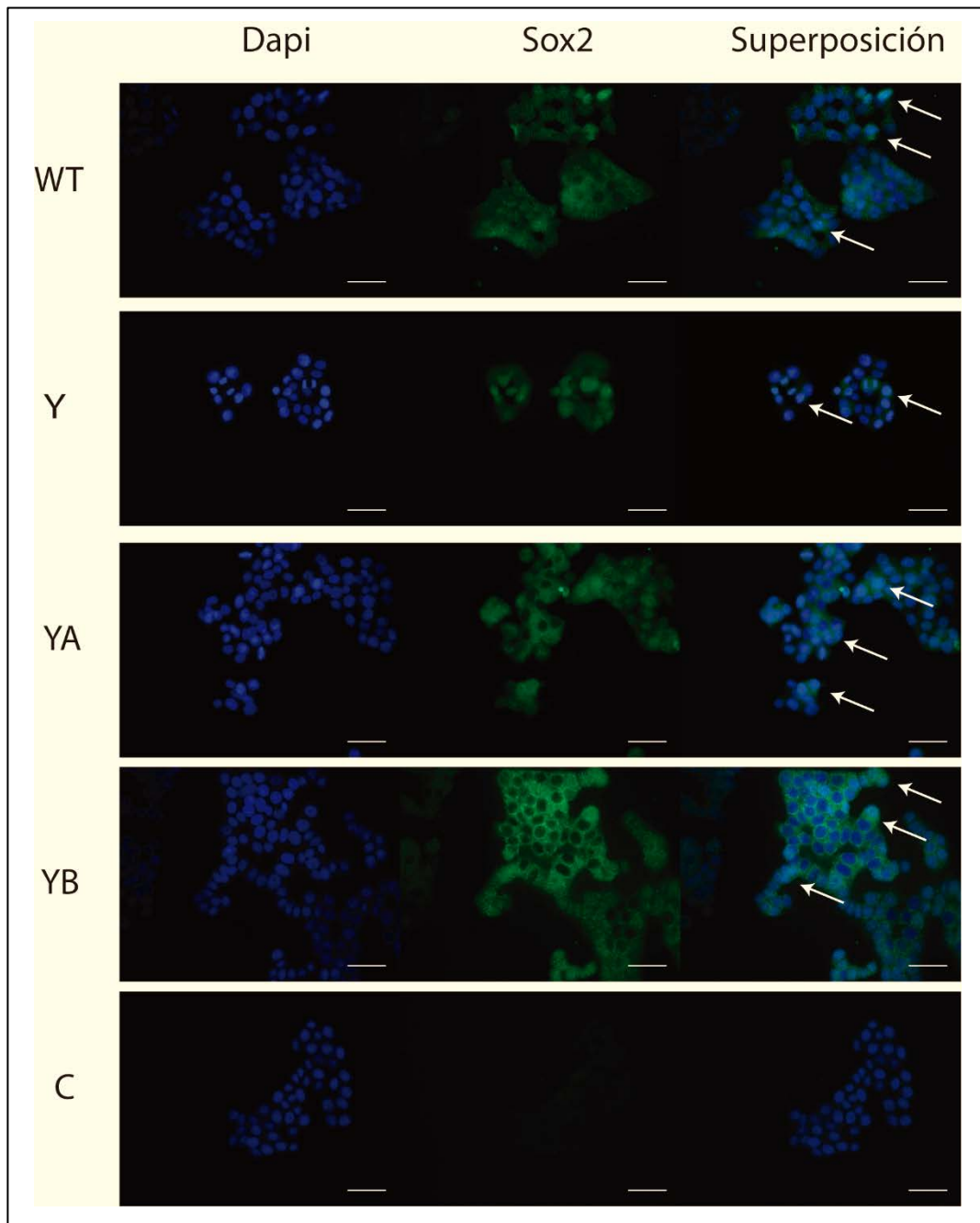


Figura 44. Inmunofluorescencia Sox2 en monocapa. Células T47D WT, Y, YA e YB fueron crecidas sobre cubreobjetos, donde se realizaron las incubaciones correspondientes para IF, como se describe en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo contra

Sox2 y se tiñeron los núcleos con Dapi. Se realizó como control un vidrio sin anticuerpo primario. Las fotos se tomaron en un microscopio invertido de fluorescencia con el objetivo 40X. La barra de escala representa 20µm.

En el caso de Sox2 se observó que en las líneas WT e Y la marca fue más difusa entre núcleo y citoplasma, en cambio en YA y especialmente en YB se detectaron células con marca claramente nuclear o citoplasmática.

La siguiente figura muestra la expresión de Sox2 en las MFS.

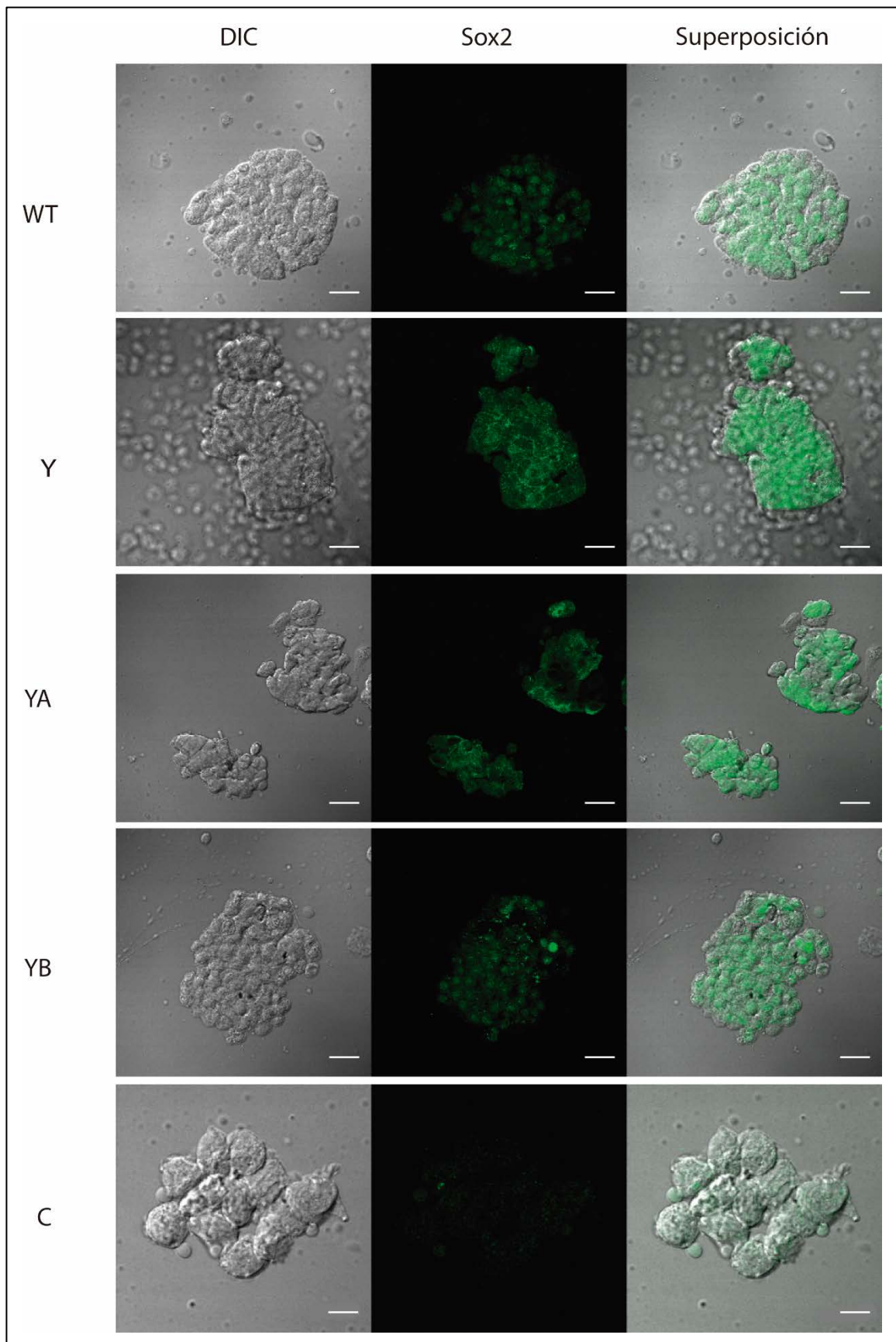


Figura 45. Inmunofluorescencia Sox2 en MFS. Las MFS provenientes de las líneas celulares T47D WT, Y, YA e YB fueron fijadas sobre vidrios cargados, donde se realizaron las incubaciones correspondientes para IF, como se describe en materiales y métodos.



Se utilizó un anticuerpo contra Sox2 (verde). C se refiere al control sin anticuerpo 1rio. Las fotos se tomaron en un microscopio confocal de fluorescencia con aumento 60x. La barra de escala representa 25µm.

En las MFS se observó marca nuclear de Sox2 tanto en la línea WT como en YB, mientras que en Y fue más difusa y en YA mayormente citoplasmática.

#### Efecto del tratamiento con E y anti estrógenos sobre las CSC del modelo T47D

Con el fin estudiar el efecto de la vía del ER sobre las CSCs del modelo T47D y sus líneas derivadas T47D Y, T47D YA y T47D YB, se efectuaron dos tipos de aproximaciones: en primer lugar, se trató la monocapa de cada línea con Etanol, 17-β-Estradiol 10<sup>-8</sup>M (E), Fulvestran 10<sup>-6</sup>M (ICI) o Tam 10<sup>-6</sup>M durante 72hs en medio sin rojo fenol con el agregado de suero charcolizado al 2%, para evaluar el efecto indirecto sobre la población de CSCs. En segundo lugar, se trató directamente la suspensión unicelular luego de disgregar la monocapa, al momento de plaquear en condiciones de formación de MFS.

#### Efecto de tratamientos hormonales sobre la monocapa.

Luego de las 72hs de tratamiento se levantó la monocapa y se realizaron los ensayos de citometría de flujo y formación de MFS a partir de las cuatro líneas celulares. La siguiente figura muestra los resultados obtenidos por citometría de flujo de 3 ensayos independientes.

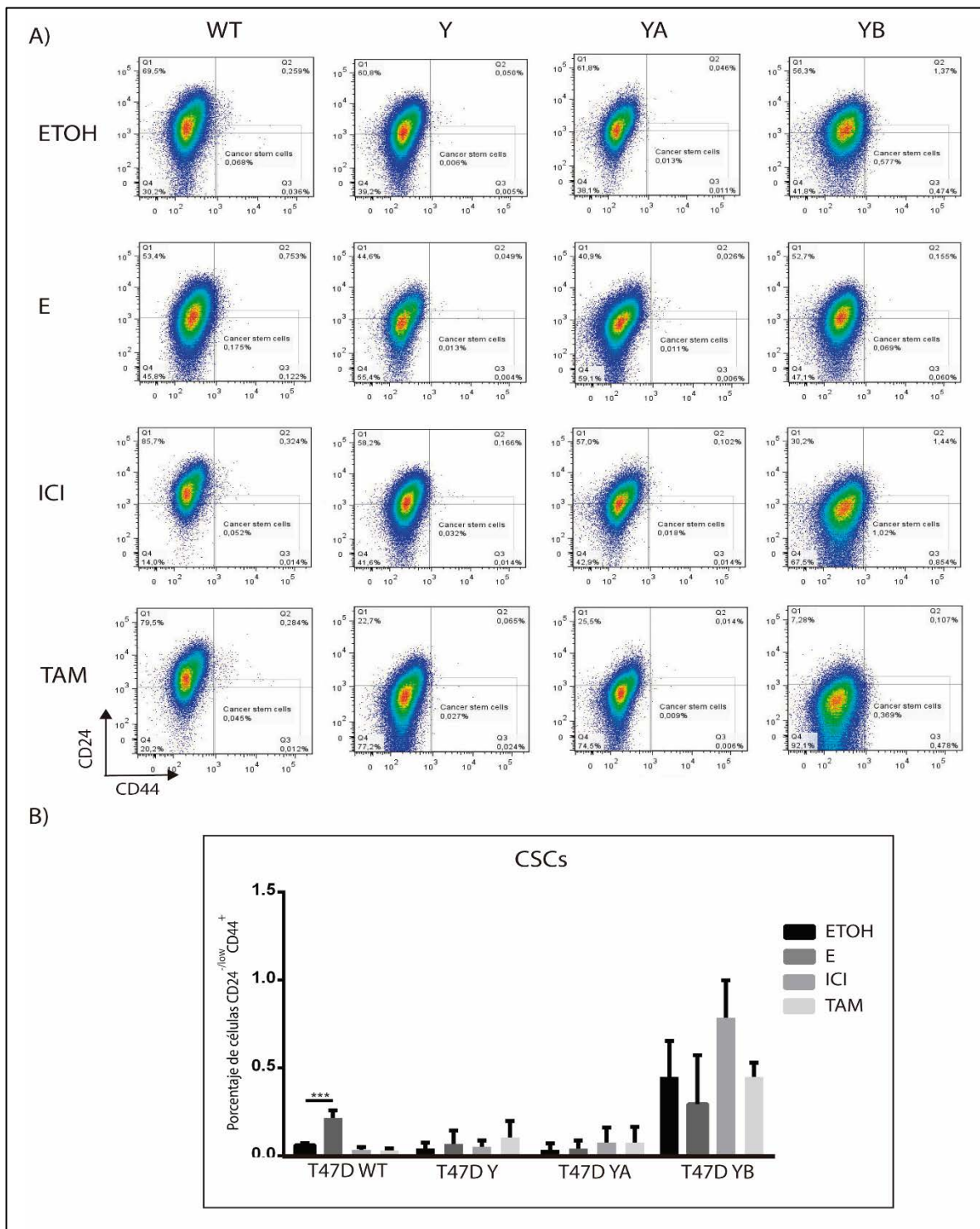


Figura 44. El E expande la población de CSCs en la línea WT. Las líneas T47D WT, Y, YA e YB fueron tripsinizadas luego de las 72hs de tratamiento. Se incubaron con los anticuerpos CD44-FITC y CD24-APC. A) Gráficos del análisis de los datos obtenidos por citometría para cada tratamiento en las 4 líneas. B) Cuantificación y el análisis estadístico a partir de 3 ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas para un ANOVA de 1 factor dentro de cada grupo (sólo significativo para T47D WT con  $p < 0,001$ ) seguido por contrastes de Dunnet (\*\* $p < 0,001$ ).

La población CD24<sup>-low</sup> CD44<sup>+</sup> que identifica a las CSCs se vio alterada únicamente por el tratamiento con E en la línea WT.

Para evaluar el impacto de estos tratamientos sobre la capacidad de formar MFS en las líneas T47D WT, Y, YA e YB, se plaquearon 500 células/ml en condiciones para MFS y se dejaron crecer durante 7 días. En ese momento se cuantificó el número de MFS formadas cada 500 células sembradas, y se tomaron fotografías. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para 3 experimentos independientes.

Figura 45. Los tratamientos con E y Anti-E afectan particularmente a las células que expresan PR A. Se plaquearon 500 células/ml en placas de baja adherencia en medio DMEM F12, sin rojo fenol, sin SFB con el agregado de B27 y EGF. A) Imágenes representativas de las MFS obtenidas para las líneas T47D WT, Y, YA e YB bajos los distintos tratamientos (ETOH, E, ICI, TAM). La barra de escala representa 50µm. B) Cuantificación y estadísticas del número de MFS a partir de 3 ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas para ANOVA de 1 factor dentro de cada grupo (WT  $p=0,0033$ ; Y  $p=0,0053$ ; YA  $p=0,0015$ ; YB  $p=n.s$ ) seguido de comparaciones de Dunnet ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ). C) Cuantificación del tamaño de las MFS. Los asteriscos indican diferencias significativas para ANOVA de 1 factor dentro de cada grupo (WT  $p<0,0001$ ; Y  $p=0,0003$ ; YA  $p=0,0004$ ; YB  $p=n.s$ ) seguido de comparaciones de Dunnet ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ;  $***p<0,001$ ).

Al evaluar la capacidad de formar MFS de las líneas T47D WT, Y, YA e YB frente a los tratamientos hormonales se observó que el E aumentó en número y tamaño las MFS de las líneas WT e YA. Por el contrario, el ICI llevó al efecto contrario sólo en la línea WT, lo que concuerda con su efecto antagonista a los estrógenos. Por su parte el TAM disminuyó el número y el crecimiento (evidenciado por un menor tamaño) de las MFS YA. Las MFS provenientes de la línea T47D YB no respondieron a estos tratamientos, sugiriendo la independencia de los E.

Estos resultados en su conjunto indicarían que las células que expresan la isoforma A del PR son más sensibles a tratamientos con E y anti estrógenos como el ICI o el TAM.

#### Efecto directo de los tratamientos hormonales sobre la formación de MFS

Para profundizar en el estudio del efecto del E y sus antagonistas sobre las CSCs de estas líneas celulares, se trató directamente la suspensión celular al momento de generar las MFS.

La figura 46 muestra os resultados obtenidos.

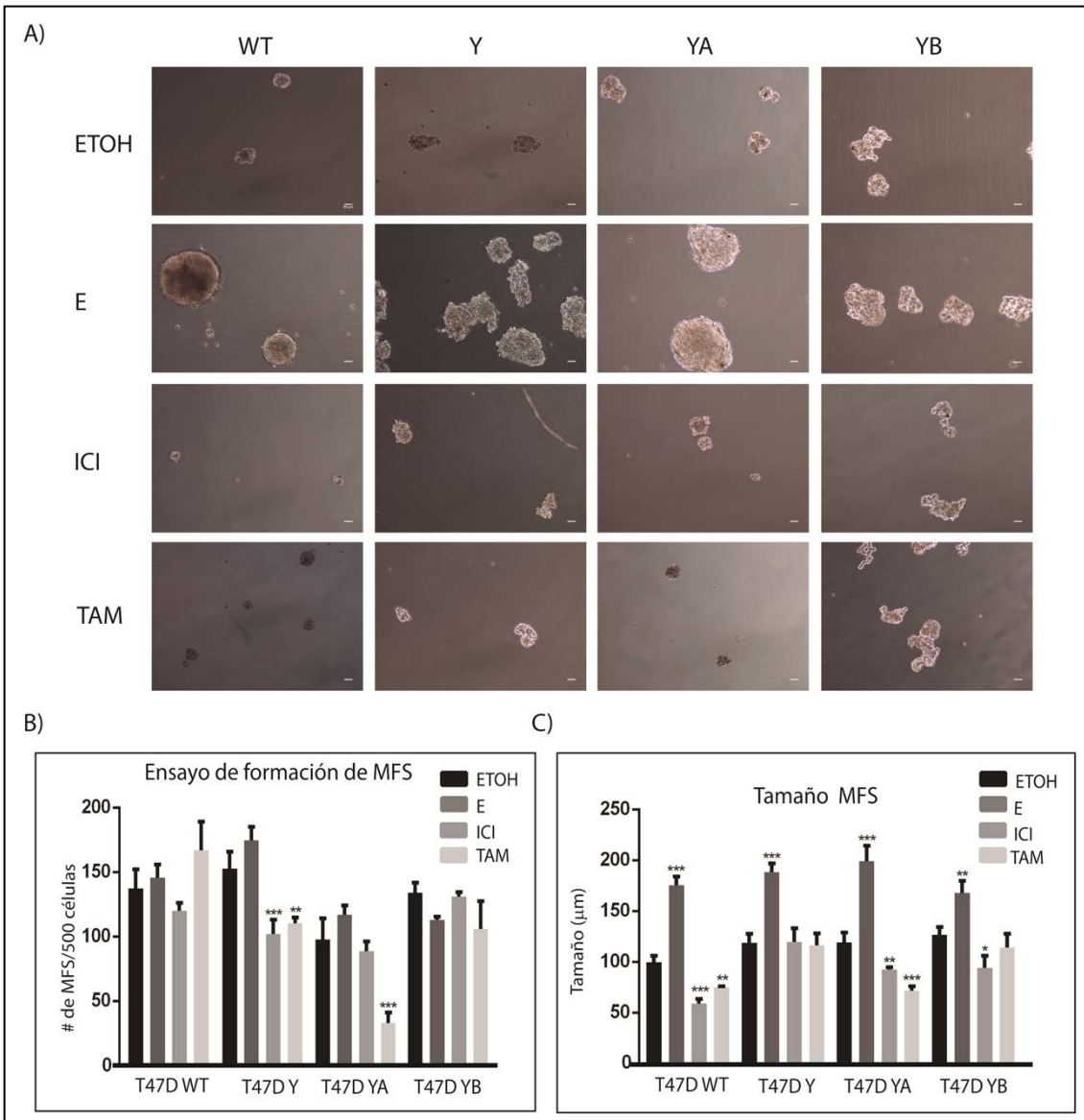


Figura 46. Tratamientos in vitro con E y anti estrógenos afectan principalmente el crecimiento de las MFS. Se plaquearon 500 células/ml en placas de baja adherencia en medio DMEM F12, sin rojo fenol, sin SFB con el agregado de B27 y EGF y los tratamientos correspondientes (ETOH, E, ICI, TAM) durante 7 días. La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ . A) Imágenes representativas de las MFS obtenidas luego del tratamiento directo con las distintas hormonas. Las imágenes se tomaron con una cámara acoplada a un microscopio invertido con contraste de fase. B) Cuantificación y estadística del número de MFS de tres ensayos independientes. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el tratamiento con ETOH dentro de cada línea, para un ANOVA de 1 factor seguido de contrastes de Dunnet (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). C) Cuantificación y análisis estadístico del tamaño de las MFS luego de los tratamientos hormonales. Se utilizó el programa Image J para analizar las fotos. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el tratamiento con ETOH dentro de cada línea, para un ANOVA de 1 factor seguido de contrastes de Dunnet (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

A diferencia de lo observado al tratar la monocapa, el E no afectó el número de MFS bajo estas condiciones. En cambio, aumentó el tamaño de las MFS en las 4 líneas, implicando su efecto sobre la

proliferación de las células que conforman las MFS. Por otro lado, el ICI sólo afectó en número a la línea Y, pero disminuyó el crecimiento de las MFS en WT, YA e YB en contraposición al efecto del E. Por su parte, el TAM llevó a una disminución significativa en la capacidad de formar MFS y en el crecimiento de las mismas en la línea YA, mientras que afectó sólo el crecimiento en WT y sólo el número en Y. Las MFS provenientes de la línea YB no se vieron afectadas por el tratamiento con TAM, indicando nuevamente que serían resistentes a este tratamiento.

Los resultados obtenidos en este capítulo ponen en evidencia que el correcto balance de las isoformas del PR no sólo juega un papel importante en la regulación de la población de células madre/progenitoras en la glándula mamaria normal, sino que también afecta a las células iniciadores de tumor o CSCs.

---

# DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar el impacto del desbalance de las isoformas del PR sobre la población de células madre adultas en la glándula mamaria normal y tumoral. Entender la biología normal de las células madre contribuye a dilucidar los mecanismos que llevan al desarrollo de células madre tumorales o CSC. Se postula que estas células serían las implicadas en la regulación de la progresión tumoral y la adquisición de resistencia a las terapias (Simoes et al. 2015; D'Angelo and Wicha 2010; Azizi and Wicha 2012). Las mismas no responden a los tratamientos que eliminan la masa tumoral gracias a su baja tasa proliferativa, y a la capacidad de expulsar drogas a través de transportadores de membrana del tipo ABC (Bunting 2002; Cojoc et al. 2015). Por otra parte, expresan altos niveles de factores anti apoptóticos, que evitan el desencadenamiento de la muerte celular programada a pesar de la adquisición de mutaciones en el ADN (Tiberio et al. 2002). Son, además, resistentes a la radiación (Phillips, McBride, and Pajonk 2006; Woodward et al. 2007). Por último, carecen de la expresión de receptores hormonales, por lo que no responden a terapias endocrinas (Wicha, Liu, and Dontu 2006; Simões and Vivanco 2011; Simoes et al. 2015). El conjunto de estos fenómenos provoca que las CSC no sean eliminadas y puedan quedar latentes hasta que un nuevo estímulo induzca su diferenciación y la generación de nuevos tumores o metástasis.

El impacto de las hormonas ováricas en la progresión del cáncer ha sido ampliamente estudiado; entre otras evidencias, se conoce que la exposición prolongada a E y P está asociada al riesgo de desarrollar esta enfermedad (Henderson and Feigelson 2000; Lanari et al. 2009; Hilton, Graham, and Clarke 2015). Las terapias antitumorales hormonales que apuntan a bloquear la vía de señalización del ER han producido grandes avances en la clínica; sin embargo, un alto porcentaje de pacientes son resistentes a estos tratamientos o desarrollan resistencia

luego de varios años (Simoies et al. 2015). En los últimos años se ha acumulado una creciente cantidad de evidencia que sugiere que los tratamientos con anti progestágenos podrían ser una terapia conjunta que beneficie a pacientes con ciertos tipos de tumores. En este sentido, se ha reportado que un desbalance en la proporción de las isoformas del PR puede llevar a tumores más agresivos que aquellos con expresión normal (Bonneterre et al. 2016; Wargon et al. 2015). Un estudio reciente indica que pacientes con alta expresión de PR A se beneficiarían de un tratamiento conjunto de TAM con anti progestágenos (Rojas et al. 2017).

Para estudiar el impacto de modificaciones en los niveles de expresión de las isoformas del PR sobre la regulación de las células madre normales y tumorales analizamos dos modelos: el de ratones transgénicos PR A y PR B (Shyamala et al. 1998, 2000) y la línea celular tumoral T47D y las sublíneas derivadas de la misma (C. a. Sartorius et al. 1994).

En el modelo de ratones transgénicos observamos que la sobre expresión de PR A prácticamente no modificó los parámetros estudiados respecto a las glándulas mamarias provenientes de ratones WT. Sólo observamos diferencias en la expresión de ER $\alpha$  en las MFS y en la respuesta al tratamiento con ICI *in vitro*. Por lo tanto, el fenotipo hiperplásico no estaría asociado a cambios en el reservorio de células madre y progenitoras. El fenotipo en ratones PR A sólo se observa en hembras adultas de más de 20 semanas de vida, lo cual sugiere que sería necesaria la exposición prolongada en el tiempo a P para que las hiperplasias se desarrollen. Este fenómeno estaría asociado al efecto mitogénico de la P sobre las células luminales (Tanos et al. 2012; Brisken and Ataca 2015). En las glándulas mamarias de los ratones WT y PR A la OVX llevó a una disminución de la población progenitora luminal sin alterar la población basal, como ha sido reportado previamente (Asselin-Labat et al. 2010). Esto concuerda con una disminución en el número de ramificaciones laterales del árbol mamario y con el hecho de que son las hormonas ováricas las que mantienen a esta población



celular (Tanos et al. 2012). En el caso del tratamiento con ICI no se observó una modificación en la estructura mamaria en los ratones WT, pero si en los PR A, como se reportó previamente (Simian et al. 2009). Sin embargo, este anti estrógeno no modificó el reservorio de células madre y progenitoras. En ambos casos llevó a un aumento en el número de MFS, y lo mismo se observó con la OVX. En el trabajo de Asselin Labat y colaboradores (Asselin-Labat et al. 2010) se observó que luego de la OVX o del tratamiento con el inhibidor de aromatasa Letrozole, disminuyó la capacidad de repoblar la almohadilla grasa de la población basal sin verse afectada en número. En este sentido nosotros no realizamos un sorting de las células a la hora de hacer la MFS, sino que cuantificamos 10.000 células provenientes del cultivo primario y las plaqueamos en condiciones óptimas para el desarrollo de MFS. El efecto de la OVX y del tratamiento con ICI podría indicar dos cosas: que los E regulan en forma negativa a las poblaciones celulares con capacidad de formar MFS, o que al disminuir los niveles de E se pierden células diferenciadas y al momento de plaquear cantidades iguales de células para realizar el ensayo de MFS, se incrementa la proporción de células con esta capacidad. Este argumento, sin embargo, no contemplaría el hecho de que prácticamente no se observaron cambios en las glándulas mamarias de los ratones WT al tratar con ICI durante 4 días. En todo caso, sería necesario realizar un examen más exhaustivo de las poblaciones de células progenitoras, utilizando marcadores como CD49b o CD61 (Shehata et al. 2012; Rios et al. 2014), para entender por qué se incrementó el número de células con capacidad de crecer en estas condiciones.

El tratamiento con ICI revirtió el fenotipo hiperplásico de los ratones PR A, pero no mostró ningún efecto en el árbol mamario de ratones WT y PR B. En este sentido, no se encontró bibliografía que muestre el efecto del tratamiento con ICI durante 4 días sobre el tejido mamario normal murino. Este resultado puede deberse a que el tratamiento no sea suficientemente prolongado para observar cambios en el árbol

mamario, o que debido a su mecanismo de acción sólo afecte a las células que están proliferando, estando éstas aumentadas en los ratones PR A (Shyamala et al. 1998).

La siguiente estrategia consistió en realizar los cultivos de células provenientes de ratones sin tratar, en presencia de E y los anti estrógenos ICI y TAM. Los E no modificaron el número de MFS generadas a partir de los cultivos primarios de glándulas mamarias provenientes de ratones PR A o WT. Por otra parte, el tratamiento con ICI aumentó la capacidad de formar MFS sólo en el caso de PR A, y el TAM redujo el número de MFS en ambos casos. Este efecto contradictorio entre ambos anti estrógenos podría deberse a que sus mecanismos de acción son diferentes (Jordan 2014)(Nathan and Schmid 2017). El resultado obtenido con ICI indicaría que, bajo estas condiciones de cultivo, inducir la degradación del ER llevaría a un aumento en la capacidad de formar MFS.

Las glándulas mamarias provenientes de los ratones transgénicos PR B presentaron un mayor porcentaje de células madre/progenitoras basales y progenitoras luminales en comparación a las glándulas mamarias de los ratones PR A y WT. Este resultado se observó tanto al realizar los ensayos de citometría de flujo, como al estudiar la capacidad de las células de crecer en suspensión. Al analizar las MFS llamó la atención que fueran en su mayoría huecas (1:12 relación sólidas:huecas). Este fenómeno no ha sido descrito previamente para estas condiciones de cultivo. Sin embargo, otros autores han observado la formación diferencial de este tipo de esferas cuando las células son crecidas en una matriz extracelular reconstituida (Matrigel), donde el surgimiento del lumen se asocia a progenitores luminales (Dong et al. 2013). Por otra parte, al analizar las MFS llamó la atención la pérdida de polaridad que se reflejó por la tinción contra CK14. La pérdida de polaridad se asocia a la transformación maligna (Muthuswamy and Xue 2012), al igual que la expresión aumentada de MMPs (Planagumà et al. 2011; Simian et al. 2001), que también se observó en las glándulas

mamarias de los ratones PR B. La ubicación diferencial de OCT4 en las mamosferas provenientes de las suspensiones celulares de las glándulas mamarias de los ratones PR B también merece profundización. Sugeriría que en este caso las MFS están compuestas por una única célula madre/progenitora y que el resto de las células poseen mayor grado de diferenciación(Dontu, Abdallah, et al. 2003).

La OVX en los ratones PR B llevó a una disminución en la población basal sin alterar la luminal ni la formación de MFS, mientras que el tratamiento con el anti estrógeno ICI no afectó ninguno de estos parámetros. Estos resultados sugerirían que la disminución observada en la población basal se debe a la disminución de la P circulante generada por la remoción de los ovarios, y no por la caída de los E. Este resultado apoyaría el papel que se le confiere a la P en el mantenimiento del reservorio de células madre de la glándula mamaria.

Como se describió previamente, la P regula la población de células madre a través de sus actores paracrinos RANKL y WNT4 (Asselin-Labat et al. 2010; Joshi et al. 2010; Rajaram et al. 2015). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que PR B jugaría un papel central en el mantenimiento de la homeostasis de la población de células madre en la glándula mamaria. En este sentido, ratones knock out para PR B, es decir que sólo expresan PR A, no son capaces de señalizar por vía paracrina a través de RANK-RANKL (Mulac-Jericevic et al. 2003). A su vez, la vía de RANK-RANKL está involucrada en la alveologénesis mediada por P al momento de la preñez (Fata et al. 2000), lo cual coincide con el aumento de la expresión de PR B (Schneider et al. 1991; Kariagina, Aupperlee, and Haslam 2008). Para confirmar esta hipótesis, sería necesario tratar ratones OVX con agonistas y ratones intactos con antagonistas de la P y evaluar el efecto sobre la población de células madre.

Una glándula mamaria enriquecida en células basales podría ser considerada más indiferenciada, lo que concuerda con el fenotipo observado en los ratones PR B. Por el contrario, que el porcentaje de

células progenitoras luminales sea mayor en las glándulas mamarias de los ratones PR B en comparación con los WT y PR A es contradictorio. Sería necesario utilizar otros marcadores como CD49b o CD61 para profundizar en este aspecto (Shehata et al. 2012; Rios et al. 2014). Por último, es interesante mencionar que estudios epidemiológicos sugieren que mujeres con un incremento en los niveles de PR B en sus glándulas mamarias tienen mayor riesgo de contraer cáncer de mama (De Vivo et al. 2002; Chaudhary et al. 2013). En el marco de nuestros resultados se podría hipotetizar que este fenómeno podría estar asociado a alteraciones en el correcto mantenimiento de la jerarquización de las poblaciones celulares en la glándula mamaria normal.

A continuación, el objetivo fue estudiar en un modelo de células de cáncer de mama humano el impacto de la expresión diferencial de las isoformas de PR sobre la población de CSC.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que las células tumorales que expresan sólo PR B presentan características asociadas a mayor malignidad al comparar con las que expresan sólo PR A o ambas isoformas. Esto fue evaluado por medio de distintas técnicas: por citometría de flujo se observó un mayor porcentaje de células con el perfil de expresión CD24<sup>-/low</sup> CD44<sup>+</sup> que caracteriza a las CSCs; a través del ensayo de formación de MFS se obtuvieron esferas de mayor tamaño y más irregulares al sobre expresar PR B. Además, estas MFS presentaron mayor capacidad clonogénica al comparar con la línea YA y similar a la línea WT. Por último, la capacidad de formar MFS de esta línea no se vio afectada por los tratamientos con E y anti estrógenos. Estos resultados concuerdan con los resultados de otros trabajos que utilizan las mismas líneas como modelos tumorales en ratones (Carol A. Sartorius, Shen, and Horwitz 2003; Sequeira et al. 2014), y publicaciones donde se analizan muestras de pacientes, en los cuales tumores con mayor expresión de PR B están asociados a mayor grado histológico y mayor tamaño (Bonnetterre et al. 2016).

Con respecto a la línea T47D Y, distintos experimentos demostraron que son más agresivas que cualquiera de las líneas que expresa al menos una isoforma del PR. En la bibliografía se ha reportado que tumores negativos para PR son más malignos y asociados a fenotipos basales (Clark et al. 1993; Carol A. Sartorius, Shen, and Horwitz 2003). Por otro lado, las líneas WT e YA fueron las más sensibles a los tratamientos con E y anti estrógenos; por lo tanto, en un contexto en el que se expresa PR A, la vía de ER sería más respondedora a estímulos con agonistas y antagonistas.

El ensayo de pre-tratamiento con E indujo un aumento en el porcentaje de CSCs de la línea WT, evaluado por citometría de flujo. Este aumento se vio acompañado por un incremento en el tamaño de las esferas, en comparación a las células tratadas con vehículo. Este último fenómeno también se observó al cultivar las células de la línea YA. En este sentido, existen resultados contradictorios en la bibliografía: mientras que Simoes y colaboradores demuestran que en células MCF7 los E inhiben la formación de MFS (Simões et al. 2011), Deng y colaboradores indican que E aumenta el número y tamaño de las MFS tanto de la línea MCF7 como en T47D (Deng et al. 2014). Esta diferencia puede deberse a las distintas técnicas utilizadas para estudiar este fenómeno. En el trabajo de Simoes, el tratamiento con E se realizó de manera permanente durante 3 pasajes sucesivos de las MFS (1 pasaje cada 7 días). Este tratamiento difiere enormemente del realizado por Deng y colaboradores (Deng et al. 2014), quienes, al igual que nosotros, trataron a la monocapa durante 72hs, o directamente a las MFS al plaquearlas durante 7 días y estudiaron el efecto en el primer pasaje. Estos resultados podrían implicar que un tratamiento prolongado con E llevaría a una disminución en esta capacidad, mientras que a corto plazo su efecto sería proliferativo. Lo importante sería entender su implicancia en la biología de las CSC de tumores positivos para ER, donde los E tienen un claro efecto proliferativo sobre la masa tumoral y están asociados a peor pronóstico (Henderson and Feigelson 2000;

Lanari et al. 2009; Hilton, Graham, and Clarke 2015). En cuanto a los anti estrógenos, el ICI llevó a una disminución significativa en el número y el crecimiento (evaluado por el tamaño) de las MFS sólo en la línea WT, mientras que el TAM afectó el número y crecimiento de las MFS sólo en la línea YA. El TAM no afectó a las líneas que expresan PR B (la línea WT e YB) indicando que expresar dicha isoforma lleva a mayor resistencia frente a este tratamiento. Distintos trabajos indican que el tratamiento con TAM lleva a mayor formación de MFS, tanto en células MCF7 (Simões et al. 2011; Raffo et al. 2013; Simões et al. 2015) como en T47D (Simões et al. 2015). Aunque en el presente trabajo no observamos este aumento, tampoco observamos una disminución, sino que la capacidad de formar MFS no varió respecto al control. Esta diferencia puede deberse a diferencias en el protocolo que sensibilicen en distinto grado a las células frente a este tratamiento. En este sentido, en el trabajo que utiliza la línea T47D los autores no especifican cómo es el medio que utilizan para generar las MFS (Simões et al. 2015). A pesar de esta diferencia, es evidente que el TAM no afecta a la población de CSC en células que expresan PR B en la línea T47D. En cambio, los resultados en este trabajo indicarían que expresar sólo PR A llevaría a CSCs más sensibles a este tratamiento. En este sentido, el trabajo de Sartorius y colaboradores indica que los tumores derivados de la línea T47D YA son más sensibles al tratamiento con TAM que los derivados de las células WT e YB (Carol A. Sartorius, Shen, and Horwitz 2003), en concordancia con nuestros resultados. Además, estudios en muestras de pacientes también indican que aquellos tumores con mayor expresión de PR A son más sensibles al tratamiento con TAM que los que tienen mayor expresión de PR B o niveles similares de ambas isoformas (Bonnetterre et al. 2016; Rojas et al. 2017).

La adquisición de resistencia al tratamiento con TAM podría deberse a que el mismo sólo elimina a las células proliferativas del tumor y no a las CSCs que lo mantienen. Esto ha sido planteado previamente (Raffo et al. 2013; Brantley et al. 2016) e implicaría que son necesarias nuevas

terapias que tengan como objetivo eliminar específicamente este pool de células para erradicar por completo este tipo de tumores.

A partir de los resultados descritos se podría concluir que el tratamiento con anti estrógenos como ICI o TAM no debería recomendarse para tratar cualquier tumor de mama positivo para ER y PR, sino que sería importante estudiar los niveles de cada isoforma del PR para seleccionar el tratamiento más adecuado. Estos resultados en su conjunto indicarían que las células que expresan PR A son más sensibles a tratamientos con anti estrógenos como el ICI o el TAM.

Los tratamientos directos sobre la formación de MFS evidencian la diferencia de tratar a las células en distintos contextos. En contraposición a las células en monocapa, las células sembradas para formar MFS se encuentran aisladas una de otras, y estas condiciones pueden llevar a activar mecanismos de supervivencia frente a los distintos tratamientos. Por un lado, que haya diferencias en el número y crecimiento de las MFS bajo los distintos tratamientos implica que hay células capaces de responder a los mismos. Este resultado nos lleva a hipotetizar dos posibilidades: o las CSCs son positivas para el ER, o el tratamiento comienza a afectar, luego de cierto número de divisiones asimétricas, a células más diferenciadas positivas para ER. Dado los antecedentes en la literatura, la segunda opción sería la teoría más aceptada hasta el momento.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de la expresión de los genes SOX2, NANOG y OCT4 por qPCR difieren de lo esperado. En este sentido, creemos que sería necesario realizar un análisis más profundo con mayor número de muestras para disminuir la variabilidad en este ensayo y además evaluar la expresión de otros genes involucrados en el mantenimiento de las células madre, como SOX 9 y SLUG (Sflomos et al. 2016; Wang et al. 2017). A pesar de esto, evaluamos la expresión y localización de estos blancos en la monocapa y las MFS de las 4 líneas en estudio. Estos ensayos revelaron que las MFS de T47D YB presentaron mayor cantidad de células con marca nuclear para Sox2.

SOX2, NANOG y OCT4 se encuentran silenciados en la mayoría de las células somáticas y la re-expresión lleva a la desdiferenciación de las mismas. Tumores con alta expresión de OCT4 están asociados a fenotipos más agresivos como el triple negativo (Hassiotou et al. 2013). Además, un trabajo reciente describe que la expresión de SOX2 participa de la adquisición de resistencia a terapias endocrinas (Piva et al. 2014).

### CONCLUSIONES FINALES

Los resultados obtenidos en esta tesis revelan el papel fundamental de la expresión adecuada de cada una de las isoformas del PR para el mantenimiento del reservorio de células madre/progenitoras de la glándula mamaria normal, y su impacto sobre las CSC en contextos malignos. Tanto en el modelo transgénico murino, como en el modelo de líneas celulares tumorales humanas, se observó que sobre expresar la isoforma B del PR lleva a la expansión de la población de células madre/progenitoras, y a un fenotipo independiente de la vía del ER. Postulamos que conocer si las isoformas de PR se están expresando en sus niveles adecuados puede tener implicancias en la determinación del riesgo de desarrollar cáncer de mama, y en la respuesta a tratamientos endócrinos.





## BILIOGRAFÍA

- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke. 2003. "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (7): 3983–88. doi:10.1073/pnas.0530291100.
- Al-Hajj, Muhammad, and Michael F. Clarke. 2004. "Self-Renewal and Solid Tumor Stem Cells." *Oncogene* 23 (43 REV. ISS. 6): 7274–82. doi:10.1038/sj.onc.1207947.
- Ali, Simak, and R. Charles Coombes. 2002. "Endocrine-Responsive Breast Cancer and Strategies for Combating Resistance." *Nature Reviews Cancer* 2 (2): 101–12. doi:10.1038/nrc721.
- Andrechek, Eran R, Seiichi Mori, Rachel E Rempel, Jeffrey T Chang, and Joseph R Nevins. 2008. "Patterns of Cell Signaling Pathway Activation That Characterize Mammary Development." *Development*

- (Cambridge, England) 135 (14): 2403–13. doi:10.1242/dev.019018.
- Asselin-Labat, Marie-Liesse, Mark Shackleton, John Stingl, François Vaillant, Natasha C Forrest, Connie J Eaves, Jane E Visvader, and Geoffrey J Lindeman. 2006. "Steroid Hormone Receptor Status of Mouse Mammary Stem Cells." *Journal of the National Cancer Institute* 98 (14): 1011–14. doi:10.1093/jnci/djj267.
- Asselin-Labat, Marie-Liesse, François Vaillant, Julie M Sheridan, Bhupinder Pal, Di Wu, Evan R Simpson, Hisataka Yasuda, et al. 2010. "Control of Mammary Stem Cell Function by Steroid Hormone Signalling." *Nature* 465 (7299): 798–802. doi:10.1038/nature09027.
- Aupperlee, Mark D., Kyle T. Smith, Anastasia Kariagina, and Sandra Z. Haslam. 2005. "Progesterone Receptor Isoforms A and B: Temporal and Spatial Differences in Expression during Murine Mammary Gland Development." *Endocrinology* 146 (8): 3577–88. doi:10.1210/en.2005-0346.
- Aupperlee, Mark D, and Sandra Z Haslam. 2007. "Differential Hormonal Regulation and Function of Progesterone Receptor Isoforms in Normal Adult Mouse Mammary Gland." *Endocrinology* 148 (5): 2290–2300. doi:10.1210/en.2006-1721.
- Axlund, SD, BH Yoo, RB Rosen, J Schaack, P Kabos, DV LaBarbera, and CA Sartorius. 2013. "Progesterone-Inducible Cytokeratin 5 Positive Cells in Luminal Breast Cancer Exhibit Progenitor Properties." *Horm Cancer* 4 (1): 36–49. doi:10.1007/s12672-012-0127-5.Progesterone-inducible.
- Azizi, E., and M. S. Wicha. 2012. "Point: Cancer Stem Cells--The Evidence Accumulates." *Clinical Chemistry* 59 (1): 205–7. doi:10.1373/clinchem.2012.195990.
- Bellance, Catherine, Junaid a Khan, Geri Meduri, Anne Guiochon-Mantel, Marc Lombès, and Hugues Loosfelt. 2013. "Progesterone Receptor Isoforms PRA and PRB Differentially Contribute to Breast Cancer Cell Migration through Interaction with Focal Adhesion Kinase Complexes." *Molecular Biology of the Cell* 24 (9): 1363–74.

doi:10.1091/mbc.E12-11-0807.

- Bonneterre, Jacques, Jacques Bosq, Philippe Jamme, Alexander Valent, Erard M Gilles, Alexander A Zukiwski, Suzanne A W Fuqua, Carol A Lange, and Joyce O'Shaughnessy. 2016. "Tumour and Cellular Distribution of Activated Forms of PR in Breast Cancers: A Novel Immunohistochemical Analysis of a Large Clinical Cohort." *ESMO Open* 1 (4): e000072. doi:10.1136/esmooopen-2016-000072.
- Boonyaratanakornkit, Viroj, Yan Bi, Michael Rudd, and Dean P. Edwards. 2008. "The Role and Mechanism of Progesterone Receptor Activation of Extra-Nuclear Signaling Pathways in Regulating Gene Transcription and Cell Cycle Progression." *Steroids* 73 (9–10): 922–28. doi:10.1016/j.steroids.2008.01.010.
- Boonyaratanakornkit, Viroj, Nalo Hamilton, Diana C. Márquez-Garbán, Prangwan Pateetin, Eileen M. McGowan, and Richard J. Pietras. 2017. "Extranuclear Signaling by Sex Steroid Receptors and Clinical Implications in Breast Cancer." *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd. doi:10.1016/j.mce.2017.11.010.
- Boonyaratanakornkit, Viroj, Margaret Porter Scott, Vered Ribon, Lori Sherman, Steven M. Anderson, James L. Maller, W. Todd Miller, and Dean P. Edwards. 2001. "Progesterone Receptor Contains a Proline-Rich Motif That Directly Interacts with SH3 Domains and Activates c-Src Family Tyrosine Kinases." *Molecular Cell* 8 (2): 269–80. doi:10.1016/S1097-2765(01)00304-5.
- Bracke, Marc, and Olivier De Wever. 2011. "Mammary Gland in Development & Cancer" 55.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72 (1–2): 248–54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bradley, R., J. Burrett, M. Clarke, C. Davies, F. Duane, V. Evans, L. Gettins, et al. 2015. "Aromatase Inhibitors versus Tamoxifen in Early Breast Cancer: Patient-Level Meta-Analysis of the Randomised Trials." *The*

- Lancet 386 (10001). Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Open Access article distributed under the terms of CC BY: 1341–52. doi:10.1016/S0140-6736(15)61074-1.
- Brantley, Eileen, Mariana A. Callero, Damian E. Berardi, Petreena Campbell, Leah Rowland, Dain Zylstra, Louisa Amis, et al. 2016. "AhR Ligand Aminoflavone Inhibits  $\alpha$ 6-Integrin Expression and Breast Cancer Sphere-Initiating Capacity." *Cancer Letters* 376 (1). Elsevier Ireland Ltd: 53–61. doi:10.1016/j.canlet.2016.03.025.
- Bray, Freddie, Jian Song Ren, Eric Masuyer, and Jacques Ferlay. 2013. "Global Estimates of Cancer Prevalence for 27 Sites in the Adult Population in 2008." *International Journal of Cancer* 132 (5): 1133–45. doi:10.1002/ijc.27711.
- Briskin, Cathrin, and Dalya Ataca. 2015. "Endocrine Hormones and Local Signals during the Development of the Mouse Mammary Gland." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4 (3): 181–95. doi:10.1002/wdev.172.
- Briskin, Cathrin, and Bert O'Malley. 2010. "Hormone Action in the Mammary Gland." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (12): a003178. doi:10.1101/cshperspect.a003178.
- Briskin C, Rajaram RD. 2006. "Alveolar and Lactogenic Differentiation." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11: 239–48.
- Brodie, Angela, Luciana Macedo, and Gauri Sabnis. 2010. "Aromatase Resistance Mechanisms in Model Systems in Vivo." *J Steroid Biochem Mol Biol* 118 (410): 283–87. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.09.004.Aromatase.
- Bunting, Kevin D. 2002. "ABC Transporters as Phenotypic Markers and Functional Regulators of Stem Cells." *Stem Cells* 20 (1): 11–20. doi:10.1002/stem.200011.
- Chabbert-Buffet, N. 2009. "Moduladores Del Receptor de La Progesterona." *EMC - Ginecología-Obstetricia* 45 (4): 1–12. doi:10.1016/S1283-081X(09)70779-9.
- Chaudhary, Sanjib, Aditya K. Panda, Dipti Ranjan Mishra, and Sandip K.

- Mishra. 2013. "Association of +331G/A PgR Polymorphism with Susceptibility to Female Reproductive Cancer: Evidence from a Meta-Analysis." *PLoS ONE* 8 (1). doi:10.1371/journal.pone.0053308.
- Chumsri, Saranya, and Angela Brodie. 2012. "Aromatase Inhibitors and Breast Cancer." *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 9 (2): 119–26. doi:10.1515/hmbci-2012-0001.
- Clark, Gary M., and William L. McGuire. 1983. "Progesterone Receptors and Human Breast Cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 3 (2): 157–63. doi:10.1007/BF01803558.
- Clark, Gary M, Charlotte R Wenger, Susan Beardslee, M A Owens, G Pounds, T Oldaker, P Vendely, M R Pandian, D Harrington, and W L McGuire. 1993. "How to Integrate Steroid Hormone Receptor, Flow Cytometric, and Other Prognostic Information in Regard to Primary Breast Cancer 5531." *Cancer* 19 (8): 6–2162.
- Clayton, Helen, Ian Titley, and Maria d.M. Vivanco. 2004. "Growth and Differentiation of Progenitor/stem Cells Derived from the Human Mammary Gland." *Experimental Cell Research* 297 (2): 444–60. doi:10.1016/j.yexcr.2004.03.029.
- Cojoc, Monica, Katrin Mäbert, Michael H. Muders, and Anna Dubrovskaja. 2015. "A Role for Cancer Stem Cells in Therapy Resistance: Cellular and Molecular Mechanisms." *Seminars in Cancer Biology* 31. Elsevier Ltd: 16–27. doi:10.1016/j.semcancer.2014.06.004.
- Conneely, Orla M., and John P. Lydon. 2000. "Progesterone Receptors in Reproduction: Functional Impact of the A and B Isoforms." *Steroids* 65 (10–11): 571–77. doi:10.1016/S0039-128X(00)00115-X.
- D'Angelo, Rosemarie Chirco, and Max S. Wicha. 2010. "Stem Cells in Normal Development and Cancer." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 95 (C): 113–58. doi:10.1016/B978-0-12-385071-3.00006-X.
- Debnath, J. 2003. "Morphogenesis and Oncogenesis of MCF-10A Mammary Epithelial Acini Grown in Three-Dimensional Basement Membrane Cultures." *Methods* 30 (3): 256–68. doi:10.1016/S1046-

2023(03)00032-X.

- Deng, Hao, Xin Tian Zhang, Mo Lin Wang, Hong Yan Zheng, Li Jiang Liu, and Zhao Yi Wang. 2014. "ER-36-Mediated Rapid Estrogen Signaling Positively Regulates Er-Positive Breast Cancer Stem/progenitor Cells." *PLoS ONE* 9 (2). doi:10.1371/journal.pone.0088034.
- Desprez, P Y, E Hara, M J Bissell, and J Campisi. 1995. "Suppression of Mammary Epithelial Cell Differentiation by the Helix-Loop-Helix Protein Id-1." *Molecular and Cellular Biology* 15 (6): 3398–3404. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dey, Devaveena, Meera Saxena, Anurag N. Paranjape, Visalakshi Krishnan, Rajashekhar Giraddi, M. Vijaya Kumar, Geetashree Mukherjee, and Annapoorni Rangarajan. 2009. "Phenotypic and Functional Characterization of Human Mammary Stem/Progenitor Cells in Long Term Culture." *PLoS ONE* 4 (4). doi:10.1371/journal.pone.0005329.
- Dick, John E. 2008. "Stem Cell Concepts Renew Cancer Research." *Stem Cells* 112 (13): 4793–4807. doi:10.1182/blood-2008-08-077941.
- Dong, Qiaoxiang, Danhan Wang, Abhik Bandyopadhyay, Hui Gao, Karla M. Gorena, Kim Hildreth, Vivienne I. Rebel, Christi a. Walter, Changjiang Huang, and Lu Zhe Sun. 2013. "Mammospheres from Murine Mammary Stem Cell-Enriched Basal Cells: Clonal Characteristics and Repopulating Potential." *Stem Cell Research* 10 (3): 396–404. doi:10.1016/j.scr.2013.01.007.
- Dontu, Gabriela, Wissam M Abdallah, Jessica M Foley, Kyle W Jackson, Michael F Clarke, Mari J Kawamura, and Max S Wicha. 2003. "In Vitro Propagation and Transcriptional Profiling of Human Mammary Stem / Progenitor Cells," 1253–70. doi:10.1101/gad.1061803.potential.
- Dontu, Gabriela, Muhammad Al-Hajj, Wissam M. Abdallah, Michael F. Clarke, and Max S. Wicha. 2003. "Stem Cells in Normal Breast Development and Breast Cancer." *Cell Proliferation* 36 (s1): 59–72.

doi:10.1046/j.1365-2184.36.s.1.6.x.

- Dontu, Gabriela, and Max S. Wicha. 2005. "Survival of Mammary Stem Cells in Suspension Culture: Implications for Stem Cell Biology and Neoplasia." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 10 (1): 75–86. doi:10.1007/s10911-005-2542-5.
- Edwards<sup>1</sup>, Alison Obr<sup>1</sup> and Dean P. 2013. "The Biology of Progesterone Receptor in the Normal Mammary Gland and in Breast Cancer." *Mol Cell Endocrinol* 357: 4–17. doi:10.1016/j.mce.2011.10.030.The.
- Eliassen, A. Heather, Stacey A. Missmer, Shelley S. Tworoger, Donna Spiegelman, Robert L. Barbieri, Mitch Dowsett, and Susan E. Hankinson. 2006. "Endogenous Steroid Hormone Concentrations and Risk of Breast Cancer among Premenopausal Women." *Journal of the National Cancer Institute* 98 (19): 1406–15. doi:10.1093/jnci/djj376.
- Fabian, C, L Tilzer, and L Sternson. 1981. "Comparative Binding Affinities of Tamoxifen, 4-Hydroxytamoxifen, and Desmethyltamoxifen for Estrogen Receptors Isolated from Human Breast Carcinoma: Correlation with Blood Levels in Patients with Metastatic Breast Cancer." *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 2 (4): 381–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7317574>.
- Fata, Jimmie E, Young-Yun Kong, Ji Li, Takehiko Sasaki, Junko Irie-Sasaki, Roger A Moorehead, Robin Elliott, et al. 2000. "The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development." *Cell* 103 (1): 41–50. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00103-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00103-3).
- Finlay-Schultz, J, DM Cittelly, P Hendricks, P Patel, P Kabos, BM Jacobsen, JK Richer, and CA Sartorius. 2015. "Progesterone Downregulation of miR-141 Contributes to Expansion of Stem-like Breast Cancer Cells through Maintenance of Progesterone Receptor and Stat5a" 1 (3): 1–21. doi:10.1126/sciadv.1500175.The.
- Flouriot, Gilles, Heike Brand, Stefanie Denger, Raphaël Metivier, Martin Kos, George Reid, Vera Sonntag Buck, and Frank Gannon. 2000. "Identification of a New Isoform of the Human Estrogen Receptor-



- Alpha (hER-Alpha) That Is Encoded by Distinct Transcripts and That Is Able to Repress hER-Alpha Activation Function 1." *The EMBO Journal* 19 (17): 4688–4700. doi:10.1093/emboj/19.17.4688.
- Fu, Nai Yang, Anne C. Rios, Bhupinder Pal, Charity W. Law, Paul Jamieson, Ruijie Liu, François Vaillant, et al. 2017. "Identification of Quiescent and Spatially Restricted Mammary Stem Cells That Are Hormone Responsive." *Nature Cell Biology* 19 (3): 164–76. doi:10.1038/ncb3471.
- Fu, N, G Lindeman, and J Visvader. 2014. *The Mammary Stem Cell Hierarchy*. *Current Topics in Developmental Biology*. 1sted. Vol. 107. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-416022-4.00005-6.
- Gao, Hui, Qiaoxiang Dong, Yuanhong Chen, Fuchuang Zhang, Anqi Wu, Yuanshuo Shi, Abhik Bandyopadhyay, Benjamin J. Daniel, Changjiang Huang, and Lu Zhe Sun. 2016. "Murine Mammary Stem/progenitor Cell Isolation: Different Method Matters?" *SpringerPlus* 5 (1). Springer International Publishing: 1–5. doi:10.1186/s40064-016-1787-3.
- Giangrande, P H, E A Kimbrel, D P Edwards, and D P McDonnell. 2000. "The Opposing Transcriptional Activities of the Two Isoforms of the Human Progesterone Receptor Are due to Differential Cofactor Binding." *Molecular and Cellular Biology* 20 (9): 3102–15. doi:10.1128/MCB.20.9.3102-3115.2000.
- Giuliano, Mario, Meghana V. Trivedi, and Rachel Schiff. 2013. "Bidirectional Crosstalk between the Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Signaling Pathways in Breast Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications." *Breast Care* 8 (4): 256–62. doi:10.1159/000354253.
- Goldman, Jerome M, Ashley S Murr, and Ralph L Cooper. 2007. "The Rodent Estrous Cycle : Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies" 97: 84–97. doi:10.1002/bdrb.
- Goyette, Sandy, Yayun Liang, Benford Mafuvadze, Matthew T. Cook, Moiz Munir, and Salman M. Hyder. 2017. "Natural and Synthetic

- Progesterins Enrich Cancer Stem Cell-like Cells in Hormone-Responsive Human Breast Cancer Cell Populations in Vitro." *Breast Cancer: Targets and Therapy* 9: 347–57. doi:10.2147/BCTT.S135371.
- Graham, J Dinny, Christine Yeates, Rosemary L Balleine, Suzanna S Harvey, Jane S Milliken, A Michael Bilous, and Christine L Clarke. 1995. "Characterization of Progesterone Receptor A and B Expression in Human Breast Cancer." *Cancer Research*, 5063–68. <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.8.10.7854352>.
- Greene, Geoffrey L, Paul Gilna, Michael Waterfield, Andrew Baker, Yvonne Hort, and John Shine. 1986. "Sequence and Expression of Human Estrogen Receptor Complementary DNA." *Science* 231 (4742): 1150–54.
- Grimm, Sandra L., Sean M. Hartig, and Dean P. Edwards. 2016. "Progesterone Receptor Signaling Mechanisms." *Journal of Molecular Biology*. doi:10.1016/j.jmb.2016.06.020.
- Hagan, Christy R, Tarah M Regan, Gwen E Dressing, and Carol a Lange. 2011. "ck2-Dependent Phosphorylation of Progesterone Receptors (PR) on Ser81 Regulates PR-B Isoform-Specific Target Gene Expression in Breast Cancer Cells." *Molecular and Cellular Biology* 31 (12): 2439–52. doi:10.1128/MCB.01246-10.
- Hassiotou, Foteini, Anna R Hepworth, Adriana S Beltran, Michelle M Mathews, Alison M Stuebe, Peter E Hartmann, Luis Filgueira, and Pilar Blancafort. 2013. "Expression of the Pluripotency Transcription Factor OCT4 in the Normal and Aberrant Mammary Gland." *Frontiers in Oncology* 3 (April): 79. doi:10.3389/fonc.2013.00079.
- Heldring, Nina, Ashley Pike, Sandra Andersson, Jason Matthews, Guojun Cheng, Eckardt Treuter, Margaret Warner, Johan Hartman, Michel Tujague, and Anders Stro. 2007. "Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets." *Physiology Review* 87: 905–31. doi:10.1152/physrev.00026.2006.
- Henderson, Brian E, and Heather Spencer Feigelson. 2000. "Hormonal

- Carcinogenesis." *Carcinogenesis* 21 (3): 427–33. doi:10.1093/carcin/21.3.427.
- Hilton, Heidi N., Christine L. Clarke, and J. Dinny Graham. 2017. "Estrogen and Progesterone Signalling in the Normal Breast and Its Implications for Cancer Development." *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd. doi:10.1016/j.mce.2017.08.011.
- Hilton, Heidi N., J. Dinny Graham, and Christine L. Clarke. 2015. "Minireview: Progesterone Regulation of Proliferation in the Normal Human Breast and in Breast Cancer: A Tale of Two Scenarios?" *Molecular Endocrinology* 29 (9): 1230–42. doi:10.1210/me.2015-1152.
- Hilton, Heidi N., N. Santucci, a. Silvestri, S. Kantimm, L. I. Huschtscha, J. D. Graham, and C. L. Clarke. 2014. "Progesterone Stimulates Progenitor Cells in Normal Human Breast and Breast Cancer Cells." *Breast Cancer Research and Treatment* 143 (3): 423–33. doi:10.1007/s10549-013-2817-2.
- Honeth, Gabriella, Sara Lombardi, Christophe Ginstier, Minhee Hur, Rebecca Marlow, Bharath Buchupalli, Ireneusz Shinomiya, et al. 2014. "Aldehyde Dehydrogenase and Estrogen Receptor Define a Hierarchy of Cellular Differentiation in the Normal Human Mammary Epithelium." *Breast Cancer Research* 16 (3): R52. doi:10.1186/bcr3663.
- Hopp, Torsten a, Heidi L Weiss, Susan G Hilsenbeck, Yukun Cui, D Craig Allred, Kathryn B Horwitz, and Suzanne a W Fuqua. 2004. "Breast Cancer Patients with Progesterone Receptor PR-A-Rich Tumors Have Poorer Disease-Free Survival Rates Breast Cancer Patients with Progesterone Receptor PR-A-Rich Tumors Have Poorer Disease-Free Survival Rates" 10 (713): 2751–60. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0141.
- Jacobsen, Britta M., Stephanie A. Schittone, Jennifer K. Richer, and Kathryn B. Horwitz. 2005. "Progesterone-Independent Effects of Human Progesterone Receptors (PRs) in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: PR Isoform-Specific Gene Regulation and Tumor Biology." *Molecular Endocrinology* 19 (3): 574–87.

doi:10.1210/me.2004-0287.

- Jordan, V. Craig. 2014. "Tamoxifen as the First Targeted Long-Term Adjuvant Therapy for Breast Cancer." *Endocrine-Related Cancer* 21 (3): 1–20. doi:10.1530/ERC-14-0092.
- Joshi, PA, H Jackson, A Beristain, M Di Grappa, P Mote, C Clarke, J Stingl, P Waterhouse, and R Khokha. 2010. "Progesterone Induces Adult Mammary Stem Cell Expansion." *Nature* 465.
- Kariagina, Anastasia, Mark D Aupperlee, and Sandra Z Haslam. 2008. "Progesterone Receptor Isoform Functions in Normal Breast Development and Breast Cancer." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 18 (1): 11–33.
- . 2010. "Progesterone Receptor Isoform Functions in Normal Breast Development and Breast Cancer." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18 (1): 11–33.
- Kenny, Paraic A., Genee Y. Lee, Connie A. Myers, Richard M. Neve, Jeremy R. Semeiks, Paul T. Spellman, Katrin Lorenz, et al. 2007. "The Morphologies of Breast Cancer Cell Lines in Three-Dimensional Assays Correlate with Their Profiles of Gene Expression." *Molecular Oncology* 1 (1): 84–96. doi:10.1016/j.molonc.2007.02.004.
- Klonisch, Thomas, Emilia Wiechec, Sabine Hombach-Klonisch, Sudharsana R. Ande, Sebastian Wesselborg, Klaus Schulze-Osthoff, and Marek Los. 2008. "Cancer Stem Cell Markers in Common Cancers - Therapeutic Implications." *Trends in Molecular Medicine* 14 (10): 450–60. doi:10.1016/j.molmed.2008.08.003.
- Kordon, E C, and G H Smith. 1998. "An Entire Functional Mammary Gland May Comprise the Progeny from a Single Cell." *Development* 125 (10): 1921–30. doi:9550724.
- Korkaya, Hasan, Suling Liu, and Max S Wicha. 2011. "Review Series Breast Cancer Stem Cells , Cytokine Networks , and the Tumor Microenvironment." *Self* 121 (10). doi:10.1172/JCI57099.3804.
- Kraus, W L, M M Montano, and B S Katzenellenbogen. 1993. "Cloning of the Rat Progesterone Receptor Gene 5'-region and Identification of

- Two Functionally Distinct Promoters." *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.) 7 (12): 1603–16. doi:10.1210/mend.7.12.8145766.
- Kuiper, G G, E Enmark, M Pelto-Huikko, S Nilsson, and J A Gustafsson. 1996. "Cloning of a Novel Receptor Expressed in Rat Prostate and Ovary." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (12): 5925–30. doi:10.1073/pnas.93.12.5925.
- Lamote I, Meyer E, Massart-Leën AM, Burvenich C. 2004. "Sex Steroids and Growth Factors in the Regulation of Mammary Gland Proliferation, Differentiation, and Involution." *Steroids* 69 (3): 145–59.
- Lanari, Claudia, Caroline A. Lamb, Victoria T. Fabris, Luisa A. Helguero, Rocío Soldati, María Cecilia Bottino, Sebastián Giulianelli, Juan Pablo Cerliani, Victoria Wargon, and Alfredo Molinolo. 2009. "The MPA Mouse Breast Cancer Model: Evidence for a Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer." *Endocrine-Related Cancer* 16 (2): 333–50. doi:10.1677/ERC-08-0244.
- Lange, C, and Douglas Yee. 2008. "Progesterone and Breast Cancer." *Womens Health* 4 (2): 151–62. doi:10.2217/17455057.4.2.151.Progesterone.
- Lange, C A, J K Richer, T Shen, and K B Horwitz. 1998. "Convergence of Progesterone and Epidermal Growth Factor Signaling in Breast Cancer. Potentiation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways." *J Biol Chem* 273 (47): 31308–16. doi:10.1074/jbc.273.47.31308.
- Li, Xiaoxian, Michael T. Lewis, Jian Huang, Carolina Gutierrez, C. Kent Osborne, Meng Fen Wu, Susan G. Hilsenbeck, et al. 2008. "Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy." *Journal of the National Cancer Institute* 100 (9): 672–79. doi:10.1093/jnci/djn123.
- Liu, R, X Wang, G Chen, P Dalerba, A Gurney, T Hoey, G Sherlock, J Lewicki, K Shedden, and MF Clarke. 2007. "The Prognostic Role of a Gene Signature from Tumorigenic Breast-Cancer Cells," 1315–23.

doi:10.1056/NEJMoa063994.

- Liu, Rong, Peiguo Shi, Zhi Nie, Huichun Liang, Zhongmei Zhou, Wenlin Chen, Haijun Chen, et al. 2016. "Mifepristone Suppresses Basal Triple-Negative Breast Cancer Stem Cells by down-Regulating KLF5 Expression." *Theranostics* 6 (4): 533–44. doi:10.7150/thno.14315.
- Liu, Suling, Gabriela Dontu, and Max S. Wicha. 2005. "Mammary Stem Cells, Self-Renewal Pathways, and Carcinogenesis." *Breast Cancer Research* 7 (3): 86–95. doi:10.1186/bcr1021.
- Macias, Hector, and Lindsay Hinck. 2012. "Mammary Gland Development." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1 (4): 533–57. doi:10.1002/wdev.35.Mammary.
- Manuel Iglesias, Juan, Izaskun Beloqui, Francisco Garcia-Garcia, Olatz Leis, Alejandro Vazquez-Martin, Arrate Eguiara, Silvia Cufi, et al. 2013. "Mammosphere Formation in Breast Carcinoma Cell Lines Depends upon Expression of E-Cadherin." *PLoS ONE* 8 (10): 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0077281.
- McDaniel, Shauntae M, Kristen K Rumer, Sandra L Biroc, Richard P Metz, Meenakshi Singh, Weston Porter, and Pepper Schedin. 2006. "Remodeling of the Mammary Microenvironment after Lactation Promotes Breast Tumor Cell Metastasis." *The American Journal of Pathology* 168 (2): 608–20. doi:10.2353/ajpath.2006.050677.
- Mote, P. A., S. Bartow, N. Tran, and C. L. Clarke. 2002. "Loss of Co-Ordinate Expression of Progesterone Receptors A and B Is an Early Event in Breast Carcinogenesis." *Breast Cancer Research and Treatment* 72 (2): 163–72. doi:10.1023/A:1014820500738.
- Mote, Patricia A., Rebecca L. Arnett-Mansfield, Natalie Gava, Anna DeFazio, Biserka Mulac-Jericevic, Orla M. Conneely, and Christine L. Clarke. 2006. "Overlapping and Distinct Expression of Progesterone Receptors A and B in Mouse Uterus and Mammary Gland during the Estrous Cycle." *Endocrinology* 147 (12): 5503–12. doi:10.1210/en.2006-0040.
- Mulac-Jericevic, Biserka, John P Lydon, Francesco J DeMayo, and Orla

- M Conneely. 2003. "Defective Mammary Gland Morphogenesis in Mice Lacking the Progesterone Receptor B Isoform." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (17): 9744–49. doi:10.1073/pnas.1732707100.
- Mulac-Jericevic, Biserka, Robert A Mullinax, Francesco J Demayo, John P Lydon, and Orla M Conneely. 2000. "Subgroup of Reproductive Functions of Progesterone Mediated by Progesterone Receptor-B Isoform." *Science* 289.
- Muthuswamy, SK, and B Xue. 2012. "Cell Polarity As A Regulator of Cancer Cell Behavior Plasticity." *Annu Rev Cell Dev Biol* 31 (9): 1713–23. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154244. Cell.
- Nathan, Mark R., and Peter Schmid. 2017. "A Review of Fulvestrant in Breast Cancer." *Oncology and Therapy* 5 (1). Springer Healthcare: 17–29. doi:10.1007/s40487-017-0046-2.
- Pathiraja, T, P Shetty, J Jelinek, R He, R Hartmaie, A Margossian, S Hilsenbeck, JP Issa, and S Oesterreich. 2011. "Progesterone Receptor Isoform-Specific Promoter Methylation — Association of PRA Promoter Methylation with Worse Outcome in Breast Cancer Patients." *Clin Cancer Res* 17 (12): 4177–86. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2950.Progesterone.
- Pelekanou, Vassiliki, and Guy Leclercq. 2011. "Recent Insights into the Effect of Natural and Environmental Estrogens on Mammary Development and Carcinogenesis." *The International Journal of Developmental Biology* 55 (7–9): 869–78. doi:10.1387/ijdb.113369vp.
- Phillips, Tiffany M., William H. McBride, and Frank Pajonk. 2006. "The Response of CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>+</sup> Breast Cancer-Initiating Cells to Radiation." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 98 (24): 1777–85. doi:10.1093/jnci/djj495.
- Piva, Marco, Giacomo Domenici, Oihana Iriando, R Miriam, Ignacio Zabalza, Robert Kypta, Valentine Comaills, Inmaculada Barredo, a L Jose, and Maria M Vivanco. 2014. "Sox 2 Promotes Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Cells." *EMBO Molecular Medicine* 6 (1):

66–79. doi:10.1002/emmm.201303411.

- Planagumà, Jesús, Mikko Liljeström, Francesc Alameda, Ralf Bützow, Ismo Virtanen, Jaume Reventós, and Mika Hukkanen. 2011. "Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 Codistribute with Transcription Factors RUNX1/AML1 and ETV5/ERM at the Invasive Front of Endometrial and Ovarian Carcinoma." *Human Pathology* 42 (1). Elsevier Inc.: 57–67. doi:10.1016/j.humpath.2010.01.025.
- Radisky, Derek C, and Lynn C Hartmann. 2009. "Mammary Involution and Breast Cancer Risk: Transgenic Models and Clinical Studies." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 14 (2): 181–91. doi:10.1007/s10911-009-9123-y.
- Raffo, Diego, Damian E. Berardi, Osvaldo Pontiggia, Laura Todaro, Elisa Bal De Kier Joffé, and Marina Simian. 2013. "Tamoxifen Selects for Breast Cancer Cells with Mammosphere Forming Capacity and Increased Growth Rate." *Breast Cancer Research and Treatment* 142 (3): 537–48. doi:10.1007/s10549-013-2760-2.
- Rajaram, R, D Buric, M Caikovski, A Ayyanan, J Rougemont, J Shan, S Vainio, O Yalcin-Ozuysal, and C Brisken. 2015. "Progesterone and Wnt4 Control Mammary Stem Cells via Myoepithelial Crosstalk." *The Embo Journal*.
- Razandi, Mahnaz, Philip Oh, Ali Pedram, Jan Schnitzer, and Ellis R Levin. 2002. "ERs Associate with and Regulate the Production of Caveolin: Implications for Signaling and Cellular Actions." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 16 (1): 100–115. doi:10.1210/me.16.1.100.
- Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM. 2000. "An Atlas of Mouse Mammary Gland Development." *J Mammary Gland Biol Neoplasia*.
- Rios, Anne C., Nai Yang Fu, Geoffrey J. Lindeman, and Jane E. Visvader. 2014. "In Situ Identification of Bipotent Stem Cells in the Mammary Gland." *Nature* 506 (7488). Nature Publishing Group: 322–27. doi:10.1038/nature12948.



- Rojas, Paola A., María May, Gonzalo R. Sequeira, Andrés Elia, Michelle Alvarez, Paula Martínez, Pedro Gonzalez, et al. 2017. "Progesterone Receptor Isoform Ratio: A Breast Cancer Prognostic and Predictive Factor for Antiprogestin Responsiveness." *Journal of the National Cancer Institute* 109 (7): 1–9. doi:10.1093/jnci/djw317.
- Sartorius, C A, M Y Melville, A R Hovland, L Tung, G S Takimoto, and K B Horwitz. 1994. "A Third Transactivation Function (AF3) of Human Progesterone Receptors Located in the Unique N-Terminal Segment of the B-Isoform." *Molecular Endocrinology* 8 (10): 1347–60. doi:10.1210/mend.8.10.7854352.
- Sartorius, Carol a., Steve D Groshong, Louise a. Miller, Roger L Powell, Lin Tung, Glenn S Takimoto, Kathryn B Horwitz, and and Kathryn B. Horwitz@ Carol A. Sartorius, Steve D. Groshong, Louise A. Miller, Roger L. Powell, Lin Tung, Glenn S. Takimoto. 1994. "New T47D Breast Cancer Cell Lines for the Independent Study of Progesterone B- and A-Receptors: Only Antiprogestin-Occupied B-Receptors Are Switched to Transcriptional Agonists by cAMP." *Cancer Research* 54 (c): 3868–77.
- Sartorius, Carol A., Tianjie Shen, and Kathryn B. Horwitz. 2003. "Progesterone Receptors A and B Differentially Affect the Growth of Estrogen-Dependent Human Breast Tumor Xenografts." *Breast Cancer Research and Treatment* 79. doi:10.1023/A:1024031731269.
- Schneider, W., C. Ramachandran, P. G. Satyaswaroop, and G. Shyamala. 1991. "Murine Progesterone Receptor Exists Predominantly as the 83-Kilodalton 'A' Form." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 38 (3): 285–91. doi:10.1016/0960-0760(91)90099-Q.
- Sequeira, Gonzalo, Silvia I Vanzulli, Paola Rojas, Caroline Lamb, Lucas Colombo, Maria May, Alfredo Molinolo, and Claudia Lanari. 2014. "The Effectiveness of Nano Chemotherapeutic Particles Combined with Mifepristone Depends on the PR Isoform Ratio in Preclinical Models of Breast Cancer." *Oncotarget* 5 (10): 3246–60. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=410280>

7&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

- Sflomos, George, Valerian Dormoy, Tauno Metsalu, Rachel Jeitziner, Laura Battista, Valentina Scabia, Wassim Raffoul, et al. 2016. "A Preclinical Model for ER -Positive Breast Cancer Points to the Epithelial Microenvironment as Determinant of Luminal Phenotype and Hormone Response." *Cancer Cell* 29 (3). Elsevier Inc.: 407–22. doi:10.1016/j.ccell.2016.02.002.
- Shackleton, Mark, François Vaillant, Kaylene J Simpson, John Stingl, Gordon K Smyth, Marie-Liesse Asselin-Labat, Li Wu, Geoffrey J Lindeman, and Jane E Visvader. 2006. "Generation of a Functional Mammary Gland from a Single Stem Cell." *Nature* 439 (7072): 84–88. doi:10.1038/nature04372.
- Shehata, Mona, Andrew Teschendorff, Gemma Sharp, Nikola Novcic, I. Alasdair Russell, Stefanie Avril, Michael Prater, Peter Eirew, Carlos Caldas, and Christine J. Watson. 2012. "Phenotypic and Functional Characterisation of the Luminal Cell Hierarchy of the Mammary Gland." *Breast Cancer Research* 14 (5). BioMed Central Ltd: R134. doi:10.1186/bcr3334.
- Shyamala, G, E Yang, ED Silberteint, MH Barcellos-Hoff, and E Dale. 1998. "Transgenic Mice Carrying an Imbalance in the Native Ratio of A to B Forms of Progesterone Receptor Exhibit Developmental Abnormalities in Mammary Glands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (January): 696–701.
- Shyamala, G, X Yang, R D Cardiff, and E Dale. 2000. "Impact of Progesterone Receptor on Cell-Fate Decisions during Mammary Gland Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (7): 3044–49. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16189&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Simian, M, M Bissell, M Barcellos-Hoff, and G Shyamala. 2009. "Estrogen and Progesterone Receptors Have Distinct Roles in the Establishment of the Hyperplastic Phenotype in PR-A Transgenic Mice." *Breast*

- Cancer Research : BCR 11 (5): R72. doi:10.1186/bcr2408.
- Simian, M, Y Hirai, M Navre, Z Werb, a Lochter, and M J Bissell. 2001. "The Interplay of Matrix Metalloproteinases, Morphogens and Growth Factors Is Necessary for Branching of Mammary Epithelial Cells." *Development (Cambridge, England)* 128 (16): 3117–31.
- Simoës, Bruno M., Denis G. Alferez, Sacha J. Howell, and Robert B. Clarke. 2015. "The Role of Steroid Hormones in Breast Cancer Stem Cells." *Endocrine-Related Cancer* 22 (6): T177–86. doi:10.1530/ERC-15-0350.
- Simões, Bruno M., Ciara S. O'Brien, Rachel Eyre, Andreia Silva, Ling Yu, Aida Sarmiento-Castro, Denis G. Alférez, et al. 2015. "Anti-Estrogen Resistance in Human Breast Tumors Is Driven by JAG1-NOTCH4-Dependent Cancer Stem Cell Activity." *Cell Reports* 12 (12): 1968–77. doi:10.1016/j.celrep.2015.08.050.
- Simões, Bruno M., Marco Piva, Oihana Iriondo, Valentine Comaills, Jose A. López-Ruiz, Iñaki Zabalza, Jon A. Mieza, Olga Acinas, and Maria D.M. Vivanco. 2011. "Effects of Estrogen on the Proportion of Stem Cells in the Breast." *Breast Cancer Research and Treatment* 129 (1): 23–35. doi:10.1007/s10549-010-1169-4.
- Simões, Bruno M, and Maria Dm Vivanco. 2011. "Cancer Stem Cells in the Human Mammary Gland and Regulation of Their Differentiation by Estrogen." *Future Oncology (London, England)* 7 (8): 995–1006. doi:10.2217/fon.11.80.
- Sleeman, Katherine E., Howard Kendrick, Alan Ashworth, Clare M. Isacke, and Matthew J. Smalley. 2005. "CD24 Staining of Mouse Mammary Gland Cells Defines Luminal Epithelial, Myoepithelial/basal and Non-Epithelial Cells." *Breast Cancer Research* 8 (1): 6–11. doi:10.1186/bcr1371.
- Sleeman, Katherine E., Howard Kendrick, David Robertson, Clare M. Isacke, Alan Ashworth, and Matthew J. Smalley. 2007. "Dissociation of Estrogen Receptor Expression and in Vivo Stem Cell Activity in the Mammary Gland." *The Journal of Cell Biology* 176 (1): 19–26. doi:10.1083/jcb.200604065.

- Sorrell, David A., Malgorzata Szymanowska, Marion Boutinaud, Claire Robinson, Richard W E Clarkson, Torsten Stein, David J. Flint, and Andreas F. Kolb. 2005. "Regulation of Genes Encoding Proteolytic Enzymes during Mammary Gland Development." *Journal of Dairy Research* 72 (4): 433–41. doi:10.1017/S0022029905001202.
- Sternlicht, Mark D. 2005. "Key Stages in Mammary Gland Development: The Cues That Regulate Ductal Branching Morphogenesis." *Breast Cancer Research* 8 (1). doi:10.1186/bcr1368.
- Stingl, John, Peter Eirew, Ian Ricketson, Mark Shackleton, François Vaillant, David Choi, Haiyan I. Li, and Connie J. Eaves. 2006. "Purification and Unique Properties of Mammary Epithelial Stem Cells." *Nature* 439 (7079): 993–97. doi:10.1038/nature04496.
- Talhouk, Rabih S., Mina J. Bissell, and Zena Werb. 1992. "Coordinated Expression of Extracellular Matrix-Degrading Proteinases and Their Inhibitors Regulates Mammary Epithelial Function during Involution." *Journal of Cell Biology* 118 (5): 1271–82. doi:10.1083/jcb.118.5.1271.
- Tanos, Tamara, Lucia Jimenez Rojo, Pablo Echeverria, and Cathrin Brisken. 2012. "ER and PR Signaling Nodes during Mammary Gland Development." *Breast Cancer Research*.
- Tiberio, Rossana, Alessandra Marconi, Chiara Fila, Cristiana Fumelli, Marco Pignatti, Stan Krajewski, Alberto Giannetti, John C. Reed, and Carlo Pincelli. 2002. "Keratinocytes Enriched for Stem Cells Are Protected from Anoikis via an Integrin Signaling Pathway in a Bcl-2 Dependent Manner." *FEBS Letters* 524 (1–3): 139–44. doi:10.1016/S0014-5793(02)03040-5.
- Todd P. Knutson and Carol A. Lange\*. 2012. "Tracking Progesterone Receptor-Mediated Actions in Breast Cancer." *Changes* 29 (6): 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- Tosoni, Daniela, Pier Paolo, Di Fiore, and Salvatore Pece. 2012. "Functional Purification of Human and Mouse Mammary Stem Cells." Edited by Kimberly A. Mace and Kristin M. Braun, *Methods in Molecular Biology*, 916. Totowa, NJ: Humana Press: 59–79.

doi:10.1007/978-1-61779-980-8.

- Visvader, J E, and G H Smith. 2011. "Murine Mammary Epithelial Stem Cells: Discovery, Function, and Current Status." *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a004879. doi:10.1101/cshperspect.a004879.
- Visvader, Jane E., and Geoffrey J. Lindeman. 2006. "Mammary Stem Cells and Mammopoiesis." *Cancer Research* 66 (20): 9798–9801. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2254.
- Vivo, I. De, G. S. Huggins, S. E. Hankinson, P. J. Lescault, M. Boezen, G. A. Colditz, and D. J. Hunter. 2002. "A Functional Polymorphism in the Promoter of the Progesterone Receptor Gene Associated with Endometrial Cancer Risk." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (19): 12263–68. doi:10.1073/pnas.192172299.
- Wakeling, A. E. 2000. "Similarities and Distinctions in the Mode of Action of Different Classes of Antioestrogens." *Endocrine-Related Cancer* 7 (1): 17–28. doi:10.1677/erc.0.0070017.
- Wakeling, Alan E, Michael Dukes, and Jean Bowler. 1991. "A Potent Specific Pure Antiestrogen with Clinical Potential A Potent Specific Pure Antiestrogen with Clinical Potential." *American Association for Cancer Research*, 3867–73. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3121.
- Walter, Philippe, Stephen Green, Geoffrey Greenet, Andrte Krust, Jean-Marc Bornert, Jean-Marc Jeltsch, Adrien Staub, et al. 1985. "Cloning of the Human Estrogen Receptor cDNA (AgtlI Expression Screening/oligonucleotide Screening/in Vito Translation/hybrid-Selection/monoclonal Antibody)." *Biochemistry* 82 (December): 7889–93. doi:10.1073/pnas.82.23.7889.
- Wang, C, J Christin, M Oktay, and W Guo. 2017. "Lineage-Biased Stem Cells Maintain Estrogen Receptor Positive and Negative Mouse Mammary Luminal Lineages Chunhui." *Cell Reports* 18 (12): 2825–2835. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.071.
- Wargon, V, M Riggio, S Giulianelli, G Sequeira, P Rojas, M May, M Polo, et al. 2015. "Progestin and Antiprogestin Responsiveness in Breast Cancer Is Driven by the PRA/PRB Ratio via AIB1 or SMRT Recruitment

- to the CCND1 and MYC Promoters Victoria." *International Journal of Cancer* 136 (11). doi:doi:10.1002/ijc.29304.
- Watson, Christine J. 2006. "Involution: Apoptosis and Tissue Remodelling That Convert the Mammary Gland from Milk Factory to a Quiescent Organ." *Breast Cancer Research: BCR* 8 (2): 203. doi:10.1186/bcr1401.
- Wenger, C and Clark, G. 1998. "S-Phase Fraction and Breast Cancer.pdf."
- Wicha, Max S. 2008. "Cancer Stem Cell Heterogeneity in Hereditary Breast Cancer." *Breast Cancer Research* 10 (2): 10–11. doi:10.1186/bcr1990.
- Wicha, Max S., Suling Liu, and Gabriela Dontu. 2006. "Cancer Stem Cells: An Old Idea - A Paradigm Shift." *Cancer Research* 66 (4): 1883–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3153.
- Woodward, W. A., M. S. Chen, F. Behbod, M. P. Alfaro, T. A. Buchholz, and J. M. Rosen. 2007. "WNT/beta-Catenin Mediates Radiation Resistance of Mouse Mammary Progenitor Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2): 618–23. doi:10.1073/pnas.0606599104.