



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales
Departamento de Química Biológica

Interacción entre los receptores de glucocorticoides (GR) y de progestágenos (PR) en células tumorales mamarias

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

LIC. MELISA SOLEDAD MARINI

Directora de Tesis: Dra. Adali Pecci

Consejera de Estudios: Dra. Edith Kordon

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica; Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2021

RESUMEN

INTERACCIÓN ENTRE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES (GR) Y DE PROGESTÁGENOS (PR) EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS

Las hormonas esteroides juegan un papel clave en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Interactúan con factores de transcripción específicos denominados receptores nucleares (NR). Estos receptores incluyen al receptor de glucocorticoides (GR) y de progesterona (PR). Ambos comparten características estructurales y funcionales similares, incluida la estructura del bolsillo de unión al ligando, la especificidad del reconocimiento de secuencias de ADN y la interacción con un conjunto similar de co-activadores. No obstante, a pesar de la similitud entre ambos receptores, la activación de cada receptor dispara un espectro muy diverso de respuestas fisiológicas, algunas de ellas opuestas entre sí.

En la glándula mamaria normal los progestágenos inhiben la producción y secreción de leche y estimulan la proliferación de células epiteliales durante el embarazo. Mientras que los glucocorticoides están vinculados con la lactancia y la síntesis de proteínas de la leche, manteniendo la etapa de diferenciación del epitelio mamario. En condiciones patológicas, es decir en el epitelio mamario tumoral, la co-expresión de ambos receptores es muy variada. Mientras que la expresión del PR es bien conocida, siendo este receptor un marcador de tumores hormono dependientes; la expresión del GR suele ser menor y sus niveles difieren en los diferentes tipos de tumores independientemente del grado de expresión del PR.

En este trabajo de tesis, se propuso determinar si el PR y GR activados forman parte de un mismo complejo y en consecuencia modulan genes blancos compartidos, disparando cambios en el destino celular de células tumorales mamarias donde ambos receptores se co-expresan.

A partir de resultados preliminares de ChIP-Seq, teníamos conocimiento de un conjunto de sitios en el ADN donde tanto el PR y como el GR son reclutados, los denominamos sitios compartidos. Utilizando una línea celular epitelial mamaria tumoral humana que expresa ambos receptores, determinamos que la presencia

del GR es capaz de inhibir la expresión de genes blanco del PR que están asociados a procesos de transición epitelio-mesénquima y de proliferación celular. Más aún, observamos que la presencia del GR interfiere en el reclutamiento de co-activadores a los mencionados sitios.

Por otra parte, cuando se evaluó el patrón de expresión de marcadores específicos de dediferenciación celular se observó que sólo la presencia del GR es capaz de interferir en la dediferenciación celular mediada por PR, siendo esta interferencia aún mayor cuando el GR se encuentra activo con dexametasona.

Mediante el uso de microscopía confocal de alta resolución y de técnicas basadas en espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) se demostró que en presencia de sus respectivos ligandos, el PR y el GR se asocian en el núcleo formando parte de un mismo complejo. Por otro lado, cuando las regiones de dimerización del GR se ven afectadas, observamos que la dinámica de formación del heterocomplejo PRGR se ve comprometida. Ambos receptores interactuarían conjuntamente con sitios específicos de la cromatina.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, y dado el uso clínico de glucocorticoides como terapia paliativa al tratamiento con quimioterápicos, consideramos que nuestros resultados aportan a un mejor entendimiento del comportamiento del GR en un contexto patológico como el cáncer de mama dependiente de progestágenos.

Palabras clave: receptor de glucocorticoides, receptor de progesterona, células epiteliales mamarias tumorales, espectroscopía de correlación de fluorescencia.

ABSTRACT

INTERACTION BETWEEN GLUCOCORTICOID (GR) AND PROGESTERONE (PR) RECEPTORS IN MAMMARY TUMOR CELLS

Steroid hormones play a key role in a wide variety of physiological and pathological processes. They interact with specific transcription factors called nuclear receptors (NRs). These receptors include the glucocorticoid (GR) and progesterone (PR) receptor. They both share similar structural and functional characteristics, including ligand-binding pocket structure, specificity of DNA sequence recognition, and interaction with a similar set of coactivators. However, despite the similarity between both receptors, the activation of each receptor triggers a very diverse spectrum of physiological responses, some of them opposed to each other.

In the normal mammary gland, progestagens inhibit milk production and secretion and stimulate epithelial cell proliferation during pregnancy. While glucocorticoids are linked to lactation and the synthesis of milk proteins, maintaining the differentiation state in the mammary epithelium. Under pathological conditions, that is, in the tumor mammary epithelium, the co-expression of both receptors is highly varied. While the expression of PR is a marker of hormone dependent tumors; GR expression is usually lower and its levels differ in different types of tumors regardless of the degree of PR expression.

In this thesis, we proposed to determine whether activated PR and GR are part of the same complex and consequently modulate shared target genes, triggering changes in the cell fate of mammary tumor cells where both receptors are co-expressed.

From previous results of ChIP-Seq, we were aware of a set of sites in the DNA where both PR and GR are recruited, we call them shared sites. Using a human tumor mammary epithelial cell line that expresses both receptors, we determined that the presence of GR is capable of inhibiting the expression of PR target genes that are associated with epithelial-mesenchymal transition processes and cell

proliferation. Furthermore, we observed that the presence of GR interferes in the recruitment of co-activators to the mentioned sites.

On the other hand, when the expression pattern of specific cell dedifferentiation markers was evaluated, it was observed that only the presence of GR is capable of interfering in PR-mediated cellular dedifferentiation, this interference being even greater when the GR is active with dexamethasone.

By using high-resolution confocal microscopy and techniques based on fluorescence correlation spectroscopy (FCS), it was shown that in the presence of their respective ligands, PR and GR associate in the nucleus as part of the same complex. On the other hand, when the GR dimerization regions are affected, we observe that the formation dynamics of the PRGR heterocomplex is compromised. Both receptors would interact together with specific chromatin sites.

Taking into account all those observations, and given the clinical use of glucocorticoids as palliative therapy to chemotherapy treatment, we consider that our results contribute to a better understanding of the behavior of the GR in a pathological context such as progestagen-dependent breast cancer.

Keywords: glucocorticoid receptor, progesterone receptor, tumor mammary epithelial cells, fluorescence correlation spectroscopy.

DEDICATORIA

A mi familia, sin ellos nada de esto se hubiera logrado

AGRADECIMIENTO

Esta tesis fue sólo posible gracias a la ayuda de muchísimas personas que la vida las puso en mi camino. El apoyo de las mismas no sólo fue académico y profesional, sino también anímico y emocional. Y esto último jugó un gran rol para la finalización de este trabajo. A todos ellos les agradezco infinitamente y en particular a las siguientes personas:

A mi familia, que a pesar de todo lo que hemos pasado estos últimos años, siempre hemos permanecido unidos, sobrellevando las cosas siempre con un abrazo y una sonrisa. Las palabras no son suficientes para expresar todo lo que siento por ustedes.

A mi directora Adali, por confiar y apoyarme desde el primer día que llegué a su laboratorio. Especialmente te agradezco por tu infinita paciencia y entendimiento. Sos una de las científicas más ocupadas que conozco, pero siempre te hiciste un tiempo para resolver diferentes cuestiones de la tesis o de la vida, sin importar los horarios. Gracias.

A Valeria Levi y a su laboratorio, por darme el espacio, confianza y asesoramiento en todos ensayos de microscopía confocal. A Martín Stortz, no sólo por tener una gran paciencia en enseñarme a usar el microscopio y a contribuir en el análisis de datos, sino también por ser un buen compañero de laboratorio. A Diego Presman, por sus contribuciones en la interpretación de los datos.

A Flopy, por guiarme y ayudarme en todos los ensayos de expresión y los benditos ChIPs. Y especialmente cuando hice la pasantía en el CRG, donde siempre podía contar con vos a cualquier hora.

A todos los integrantes Pecci-Kordon: Chocha, Flopy, Dieguito, Edith, Silvio, Dan, Marquitos, Vir, Johi, Vicky, Lautaro, Carinota, Mica *La Pistolera*, Mariana, Caro, Santi, Mica Silber, Lucho, Carla, Emilia, Carinita y Martín. Todas estas personas hicieron posible que el laboratorio sea un excelente, solidario y cálido lugar de trabajo. Gracias por sus risas, amistad y compañerismo.

A los técnicos y todas las personas que integran el IFIBYNE y el CM1. Y quiero agradecer especialmente a mi amiga Amaranta por su gran esfuerzo para proveer al laboratorio y a mí todas preparaciones que necesitábamos día a día. Gracias por tu amistad.

A Miguel Beato y Guillermo Vicent, del laboratorio de Cromantina y expresión génica del CRG, Barcelona, España por proporcionar los conocimientos y materiales necesarios durante toda mi estadía. Y también agradecer a la Silvina, Julieta, Rose y Lara por la ayuda en la mesada y por el gran compañerismo.

A mis amigas del alma Ceci y Faty por acompañarme, escucharme y tener un pedacito de misiones cerca mío. A mis amigas Vicky y Pato, por hacer más fácil la vida en CABA.

A Ale por ser compañero, amigo y sostén en los momentos difíciles. Gracias por todo el amor, el cariño y hacer tan simple, linda y natural la convivencia. Todo me costaría el doble si no estuvieses al lado mío.

ÍNDICE

Resumen, 2

Abstract, 4

Abreviatura, 13

Introducción, 16

1. Receptores de esteroides, 17

1.2. Estructura de los receptores de esteroides, 17

1.2.1. Dominio NTD, 19

1.2.2. Dominio de unión al ADN (DBD), 21

1.2.3. Dominio de unión al ligando (LBD), 22

1.2.4. Región de dimerización, 23

1.3. Unión del ligando y translocación al núcleo, 24

2. Receptor de progesterona, 29

2.1. Fisiología de la progesterona, 28

2.2. Farmacología de la progesterona, 32

2.3. Isoformas y modificaciones postraduccionales del PR, 33

2.4. Activación y mecanismo de acción del PR, 34

2.4.1. Influencia de cofactores de transcripción sobre la actividad del PR, 37

2.5. Ligandos sintéticos del PR, 39

3. Receptor de glucocorticoides, 40

3.1. Fisiología de los glucocorticoides, 41

3.2. Farmacología de los GC, 42

3.3. Isoformas y modificaciones postraduccionales del GR, 44

3.4. Mecanismo de acción del GR, 45

3.4.1. Mecanismo de acción del GR, 47

3.4.1.1. Acción directa del GR como factor de transcripción, 47

3.4.1.2.	GR como modulador de la actividad transcripcional de otros factores de transcripción,	49
3.4.1.3.	Influencia de cofactores de transcripción sobre la actividad del GR,	50
3.5.	Modelo disociado de acción del GR,	51
3.6.	Ligandos sintéticos del GR,	54
4.	Glándula mamaria,	56
4.1.	Cáncer de mama,	59
4.1.1.	El GR y el PR en un contexto tumoral mamario,	61
5.	Objetivos,	65
6.	Materiales y métodos,	67
6.1.	Reactivos utilizados,	68
6.1.1.	Agonistas y antagonistas del GR,	68
6.1.2.	Medios de cultivo,	68
6.1.3.	Suero delipidado,	68
6.2.1.	Plásmidos utilizados,	69
6.2.2.	Preparación de plásmidos a gran escala,	70
6.2.2.1.	Preparación de bacterias competentes,	70
6.2.2.2.	Transformación de bacterias competentes,	70
6.2.2.3.	Preparación de Plásmidos,	71
6.3.	Líneas celulares,	72
6.3.1.	Líneas celulares utilizadas,	72
6.3.2.	Tratamientos en las líneas celulares,	73
6.4.	Estudios de respuesta celular,	73
6.4.1.	Ensayos de diferenciación, expresión de marcadores CD44 vs CD24,	73
6.4.2.	Ensayo de migración por “cicatrización de herida” (Wound Healing Assay),	74
6.4.3.	Ensayos de clonogenicidad,	75
6.5.	Evaluación del control de la expresión génica,	76

- 6.5.1. Obtención de muestras biológicas, 76**
 - 6.5.1.2. Ensayos de silenciamiento del GR, 76**
- 6.5.2. Obtención de ARN total, 77**
- 6.5.3. RT-qPCRs, 78**
 - 6.5.3.1. Reacción de retro-transcripción, 78**
 - 6.5.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, 78**
- 6.6. Evaluación del reclutamiento de factores de transcripción en regiones específicas del ADN. Ensayo de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP), 80**
 - 6.6.1. Obtención de muestras biológicas, 80**
 - 6.6.2. Crosslinking, 80**
 - 6.6.3. Extracción de la cromatina, 81**
 - 6.6.4. Sonicación, 81**
 - 6.6.5. Evaluación de la calidad de los fragmentos de cromatina, 81**
 - 6.6.6. Pre-clareado de la cromatina, 81**
 - 6.6.7. Inmuno-Precipitación (IP), 83**
 - 6.6.7.1. Anticuerpos utilizados, 83**
 - 6.6.8. Elución, 83**
 - 6.6.9. Decrosslinking, 84**
 - 6.6.10. Extracción del ADN, 84**
 - 6.6.10.1. qPCR, 84**
- 6.7. Separación de fracciones subcelulares y ensayo de co-inmunoprecipitación (Co-IP), 85**
 - 6.7.1. Obtención y cuantificación de las muestras, 85**
 - 6.7.2. Ensayos de Western blot, 86**
 - 6.7.2.1. Soluciones utilizadas, 86**
 - 6.7.2.2. Electroforesis y transferencia a membrana de PVDF, 87**
 - 6.7.2.3. Incubación con anticuerpos y revelado, 87**
 - 6.7.2.4. Anticuerpos primarios utilizados, 88**

6.7.2.5. Anticuerpos secundarios utilizados,	88
6.8. Ensayos de microscopía confocal,	88
6.8.1. Incorporación de vectores de expresión de proteínas fluorescentes. Transfecciones transitorias,	88
6.8.2. Obtención de las imágenes y análisis de las intensidades medias,	89
6.8.3. Correlación Cruzada de Brillo (Bcc),	92
6.8.3.1. Principio de la técnica Bcc,	92
6.8.3.2. Condiciones de adquisición de Bcc,	94
6.8.4. Espectroscopía de Correlación de fluorescencia (FCS),	95
6.8.4.1. Principio de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS),	95
6.8.4.2. Cálculo de constante de asociación aparente o de equilibrio,	98
6.8.4.3. Condiciones de adquisición de FCS,	100
7. Resultados,	101
7.1. Análisis de la respuesta celular ante la presencia de R5020 y DEX,	102
7.2. Análisis de los perfiles de expresión de genes específicos en respuesta a glucocorticoides y progestágenos,	107
7.2.2. Análisis del reclutamiento de PR y GR a los sitios de unión presentes en sus genes blanco,	111
7.2.3. Análisis de reclutamiento de co-factores de transcripción en los sitios de unión específicos,	114
7.2.4. Análisis de la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo,	120
7.2.5. Análisis de la dinámica del PR y el GR en células vivas,	121
7.2.5.1. Determinación de la localización sub-celular de ambos receptores mediante análisis de intensidades medias,	121
7.2.5.2. Determinación de la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo mediante análisis de Correlación Cruzada de Brillo (Bcc),	127
7.2.5.3. Relevancia de los dominios de unión al ADN y de unión al ligando del GR en la formación del complejo con PR,	131
7.2.5.4. Análisis de la dinámica intranuclear de GR y PR,	132

8. Discusión, 142

8.1. La presencia del GR afecta la de-diferenciación y proliferación celular inducida por R5020, **144**

8.2. El GR modula el contexto cromatínico durante la transcripción de genes dependientes de progestágenos, **145**

8.3. El GR y el PR se encuentran en un mismo heterocomplejo, **147**

9. Conclusiones, 150

10. Bibliografía, 152

ABREVIATURAS

11 β -HSD1, 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1

11 β -HSD2, 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2

20aHSD, 20alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa

20aHSD, enzima 20alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa

3 β HSD, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

ACF, función de autocorrelación

ACTH, adrenocorticotrofina

ACTH, hormona adrenocorticotrofina

AF-1, dominio de función de activación 1

AF-2, dominio de función de activación 2

AF-3, dominio de transactivación

AR, receptor de andrógenos

Bcc, correlación Cruzada de Brillo

BRG-1, remodelador de cromatina dependiente de ATP SMARCA4

BSA, seroalbúmina bovina

CBG, transcortina o globulinas fijadoras de corticosteroides

CBP/p300, familia de co-activadores

CCF, función de correlación cruzada

CREB, cAMP response element-binding

CRH, hormona liberadora de corticotrofina

DBD, DNA-binding domain

DEX, dexametasona

EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein

EGFR, factor de crecimiento epidérmico

ELF5, factor 5 similar al E74

EMT, transición epitelio mesénquima

ER, receptores de estrógenos

FCCS, espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia

FCS, espectroscopía de correlación de fluorescencia

FOXA1, proteína A1 de la caja de Forkhead

FSH, hormona folículo estimulante

$G(\tau)$, función de correlación

GHR, hormona de crecimiento

GR, receptores de glucocorticoides

GREB1, regulador del crecimiento por estrógenos en el cáncer de mama 1

GRES, elemento de respuesta del GR

GRU, unidad de respuesta a GC

HAT, acetiltransferasas de histonas

hCG, hormona gonadotropina coriónica

HDACs, familia de deacetilasas de histonas

HDL, lipoproteínas de alta densidad

HER2, receptor epidérmico humano

HOP, proteína adaptadora

HPA, eje hipotalámico-pituitario-adrenal

HREs, elementos de respuesta a hormonas

IMM, inmunofilina

K_{eq} , constante de equilibrio o de asociación

LBD, dominio de unión al ligando

LBP, bolsillo de unión al ligando

LDL, lipoproteínas de baja densidad

LH, hormona luteinizante

MED14, Mediador de la subunidad 14 de transcripción de la ARN polimerasa II

mGR, receptor de GR asociados a la membrana

MMTV, virus del tumor mamario de ratón

mPRs, receptor de PR asociados a la membrana

MR, receptor de mineralocorticoides

N&B, número y brillo

NCoR, correpresor de receptores nucleares

nGRE, element de respuesta negativa del GR

NPC, complejo de poros nucleares

NR, receptores nucleares

NR3, receptor nuclear 3

NTD, dominio N-terminal

P4, progesterona

P450c17, 17 α -hidroxilasa

POMC, Proopiomelanocortina

PR, receptores de progestágenos

PSF, función de dispersión de puntos

R5020, progesterona sintética

SFB, suero fetal bovino

SMRT, mediador de silenciamiento de receptores de hormona tiroidea y ácido retinoico

SNAI1, represor transcripcional 1

SR, receptores de esteroides

SRCs, co-activadores de receptores esteroides

STAT5, transductor de señales y activador transcripcional 5A

SWI/SNF, complejo remodelador de nucleosomas

TF, factores de transcripción

TFIIH, factor general de transcripción II

WT, salvaje

INTRODUCCIÓN

1. RECEPTORES DE ESTEROIDES

Los receptores de esteroides (SR, por su sigla en inglés) pertenecen a la superfamilia NR3 *Nuclear Receptor 3* de receptores nucleares. Los vertebrados contienen seis genes evolutivamente relacionados que codifican para los receptores de estrógenos (Er α y Er β), glucocorticoide (GR), mineralocorticoide (MR), progestágenos (PR) y andrógenos (AR). Estos factores de transcripción activados por ligando median la acción hormonal de diversos procesos fisiológicos como el desarrollo sexual, la reproducción, el comportamiento, la inmunidad y la respuesta al estrés (Thornton et al, 2003).

Como consecuencia de esa relación evolutiva existe una alta similitud de secuencia entre los distintos dominios de los SRs (Bledsoe et al, 2004), como el dominio de unión a ligando, lo cual provoca interacciones cruzadas entre las distintas hormonas endógenas y los receptores (**Fig. I-1**). A continuación, se realizará una descripción detallada de la estructura de los SRs y en particular de la regulación y el mecanismo de acción del PR y del GR, objetos de estudio central de esta tesis.

1.2. Estructura de los receptores de esteroides

Los SR son proteínas modulares constituidas por tres dominios estructurales y funcionalmente definidos: un dominio N-terminal (NTD, *N-terminal domain*); un dominio de unión al ADN (DBD, *DNA-binding domain*), que contiene la región responsable de reconocer sitios de unión específicos al ADN y la porción C-terminal, llamada dominio de unión al ligando (LBD, *ligand binding domain*) (Kumar and Thompson, 2005). Este último dominio contiene: el bolsillo de unión al ligando, la región de activación (AF-2) -en la misma se unen chaperonas y otras proteínas- (Kumar and Thompson, 1999) y otra región responsable de la dimerización del receptor (Bledsoe et al, 2002) (**Fig. I-1A**). Además, los SRs presentan dos señales de localización nuclear (NLS) en la región comprendida entre el DBD y el LBD (Caldenhoven et al, 1995).

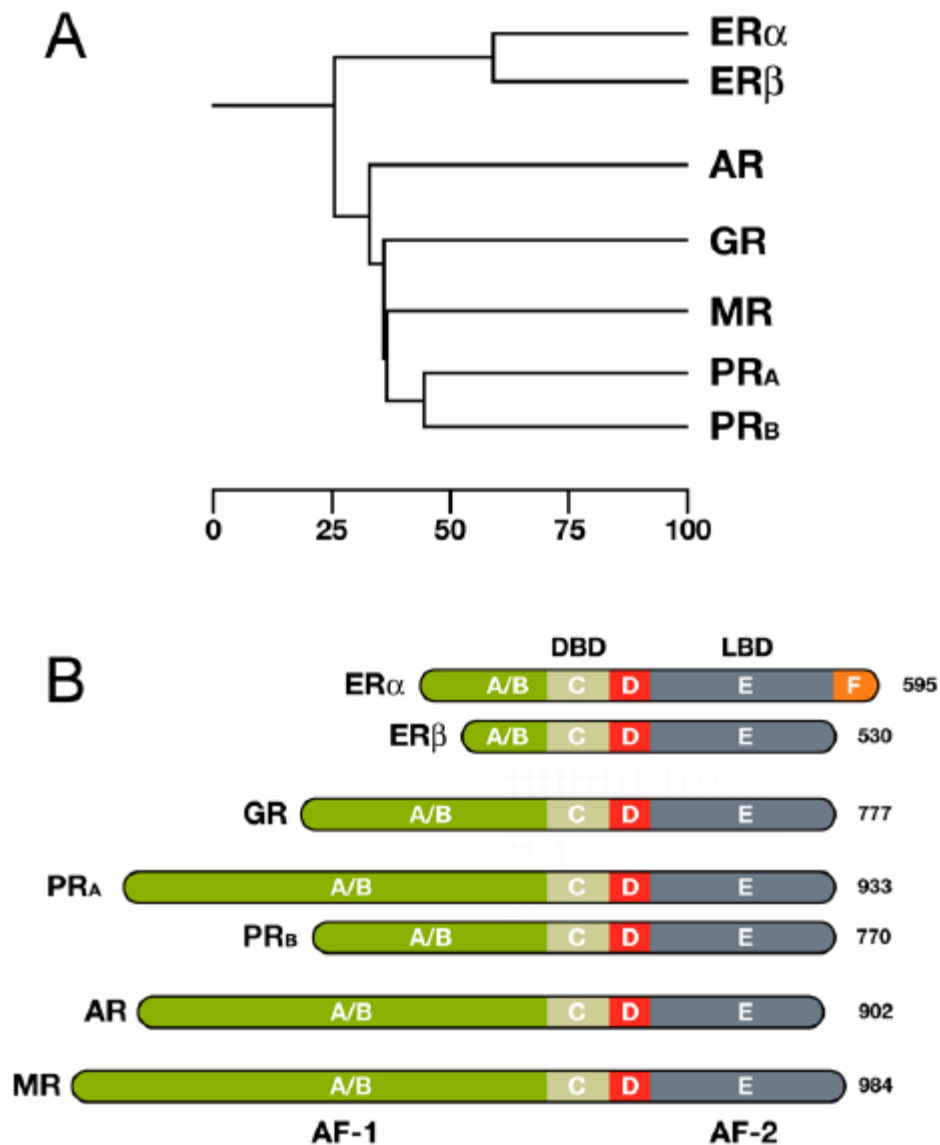


Figura I-1. Descripción general de la familia de SR. (A) Árbol filogenético de la familia de los SR, donde se muestran las interrelaciones evolutivas y la distancia entre los distintos receptores. El árbol está basado en las alineaciones disponibles en la publicación Horn et al, 2001. **(B)** Todos los SRs están compuestos por un dominio N-terminal variable (A/B) que contiene la región de transactivación AF-1, un dominio de unión al ADN altamente conservado (DBD), una región bisagra flexible (D) y un terminal C Dominio de unión a ligando (LBD, E) que contiene la región de transactivación AF-2. El receptor de estrógeno α es único que contiene un dominio F C-terminal adicional. Los números representan la longitud del receptor en aminoácidos. Adaptado de Griekspoor et al, 2007.

1.2.1. Dominio NTD

Durante más de dos décadas los esfuerzos de la biología estructural se han dirigido exclusivamente a la comprensión y entendimiento de cada una de las regiones de manera independiente. Sin embargo, este enfoque exclusivo ha dificultado la interpretación de cómo todos los dominios se coordinan física y funcionalmente en la estructura cuaternaria de los receptores. Actualmente, mediante el análisis de los datos de cristalización y por experimentos de intercambio de hidrógeno/deuterio, se han revelado organizaciones de orden superior ya sea como homo o heterodímeros, entre los diferentes receptores *i.e* PPAR γ -RXR α y HNF-4 α (Chandra *et al*, 2008; Watson *et al*, 2013; Rastinejad *et al*, 2013).

En términos de tamaño e identidad de secuencia, el dominio NTD es el más variable entre los NR (Kumar and Thompson, 2003; Yang and Fuller, 2012). El dominio NTD juega un papel relevante tanto para la activación como para la represión de genes regulados por los SR. Este dominio contiene la región de activación de la transcripción (AF-1) necesaria para una máxima actividad transcripcional del receptor (Godowski *et al*, 1987; Dieken and Miesfeld, 1992). AF-1 actúa independiente de la acción de las hormonas, en contraste con la actividad de la AF-2 del LBD, que depende de la unión del ligando (Godowski *et al*, 1987).

A diferencia de otros miembros de la familia de los SRs, el NTD del AR tiene un papel relevante en la transactivación (Simental *et al*, 1991; Jenster *et al*, 1995). Sus primeros 20 aminoácidos contienen un motivo FxxLF (donde x es cualquier aminoácido) que son relevantes para mediar las interacciones del LBD al momento de estabilizar al ligando unido (Langley *et al*, 1998; He *et al*, 1999; He and Wilson, 2002). Por otro lado, la actividad de AF-1 en el GR está influenciada por los aminoácidos no polares que la componen (Almlof *et al*, 1997; Almlof *et al*, 1998). Los primeros 31 aminoácidos del NTD del ER β son críticos para la actividad de AF-1, mientras el resto de la región parece relativamente débil en la transactivación (Kuiper *et al*, 1996; Delaunay *et al*, 2000). Las dos isoformas de PR (PR α y PR β) tienen en común las regiones AF-1 y AF-2 (LBD). Sin embargo, los primeros 165 aminoácidos de la región NTD del PR β conforman un dominio de transactivación

(AF-3), rico en residuos hidrofóbicos que son críticos para la transcripción (*Takimoto et al, 2003*). Esta región proporciona un “armazón estructural” requerido para las interacciones con proteínas co-reguladoras o en los contactos intramoleculares (**Fig. I-1B**) (*Tung et al, 2001*).

La región NTD es el blanco de muchas modificaciones post-traduccionales de los SR, y la responsable de la interacción con diferentes proteínas esenciales para la actividad transcripcional. En este sentido, se ha descrito la interacción de este dominio con los componentes de la transcripción basal como TFIID / TBP (*Sadovsky et al, 1995; Ford et al, 1997; McEwan and Gustafsson, 1997; Almlöf et al, 1998; Warnmark et al, 2001; Kumar et al, 2001*), TFIIF (*McEwan and Gustafsson, 1997; Reid et al, 2002*), TFIIH (*Lee et al, 2000*) y con factores involucrados en el proceso de elongación de la transcripción como pTEFb (*Lee et al, 2001*) y ELL (*Pascual-Le Tallec et al, 2005*).

A su vez, se han identificado proteínas que pueden unirse y modular la actividad transcripcional de los SR. A las mismas se las puede agrupar en 3 grandes grupos: (1) aquellas que regulan directamente la función de transactivación del receptor (componentes de la maquinaria de transcripción general, co-activadores, acetiltransferasas o metiltransferasas); (2) co-represores y desacetilasas; y (3) proteínas co-reguladoras, que actúan indirectamente sobre la actividad transcripcional del receptor, al regular su estabilidad, así como la localización intracelular (SUMOilación o fosforilación).

El NTD, como ya se mencionó, posee aminoácidos susceptibles a ser fosforilados o sumoilados, modulando así la actividad transcripcional del receptor (*Weigel, 1996; Lange, 2004; McEwan, 2004*). Los sitios claves para las fosforilaciones del dominio NTD son los residuos de serina, treonina y tirosina. Las respuestas que surgen a partir de esas modificaciones son muy variables, desde un aumento de la actividad transcripcional hasta influir en la ubicación intracelular del receptor (*Takimoto et al, 1996; Yeh et al, 1999; Wang et al, 2002; Dutertre and Smith, 2003*). Sin embargo, la SUMOilación de AR, GR y MR conduce, generalmente, a la represión de la actividad transcripcional y la misma puede

depender del promotor del gen blanco o incluso del tipo celular (*Kotaja et al, 2000; Nishida and Yasuda, 2002; Tian et al, 2002; Tallec et al, 2003*).

Independientemente de lo expuesto anteriormente, se desconoce cómo y de qué manera impactan las interacciones en la región AF-1 cuando el receptor de esteroides se une a los cofactores e incluso al mismo ADN. Esta falta de conocimiento se debe a la dificultad de obtener una estructura de alta resolución del dominio NTD; y la principal causa de esta imposibilidad es la naturaleza misma de la región (*Lavery and McEwan, 2005*). De todas maneras, trabajos recientes han evidenciado que existiría una comunicación alostérica entre los diferentes dominios de los SRs (*Weikum et al, 2017*) e incluso interacciones directas entre las mismas (*Helsen and Claessens, 2014*).

1.2.2. Dominio de unión al ADN (DBD)

Este dominio se localiza en la parte central de los SRs y es el más conservado entre todos los NR. Tiene aproximadamente 70 aminoácidos de largo y el mismo posee cuatro residuos cisteína (Cys) altamente conservados conformando dedos de Zn^{++} . Los dedos de Zn^{++} se pliegan uno con el otro para formar un dominio globular que contiene tres hélices. Estas hélices están orientadas perpendicularmente entre sí y forman la base de un núcleo hidrofóbico (*Helsen et al, 2011*). La primera hélice interactúa con el surco mayor del ADN, mientras que la segunda – junto con el *loop* que la precede- crean una interface de homodimerización. (*Luisi et al, 1991; Helsen et al, 2012*). Estas estructuras se unen a los elementos de respuesta a hormonas o HREs (por su sigla en inglés, *Hormone Response Elements*), un arreglo palindrómico conformado por dos regiones de 6 nucleótidos conservados, separados por 3 bases no conservadas: TGTTCTnnnAGAACA. Llamativamente, el GR, PR, MR y AR reconocen la misma secuencia palindrómica de ADN (*Beato and Schütz, 1995*).

1.2.3. Dominio de unión al ligando (LBD)

Mientras que la conservación de aminoácidos del dominio LBD es pobre (menos del 35%), la estructura secundaria general es superponible para muchos receptores nucleares (*Wurtz et al, 1996*). El LBD de la mayoría de los SR, están constituidos por 11 α -hélices (H1 y H3 a H12) que se pliegan en una estructura globular. Este dominio, posee una cavidad donde se une específicamente el ligando denominado bolsillo de unión al ligando (LBP, por su sigla en inglés *ligand binding pocket*) (*Bourguet et al, 1995; McEwan 2016*). El LBP no es una cavidad rígida, las cadenas laterales de los residuos que lo conforman pueden cambiar la orientación de manera de acomodar grupos voluminosos presentes en los ligandos (*Biggadike et al, 2008*).

La unión de un agonista induce cambios conformacionales y hace que el LBD sea aún más compacto (*Bourguet et al, 1995*). El reposicionamiento de los diferentes aminoácidos de las hélices que conforman al LBP, provocado por el ligando, revela una superficie de interacción -la segunda región de activación (AF-2)- capaz de interactuar con motivos LxxLL (L= leucina, x= cualquier otro aminoácido) que se encuentran en diferentes co-activadores (*Heery et al, 1997*). En presencia de ligandos agonistas, AF-2 adopta una conformación capaz de unir co-activadores como p160, entre otros (*Buzon et al, 2012*). A su vez, para que la interacción co-activador-LBD permanezca estable, algunos receptores como AR y GR, poseen una región de interacción electrostática denominada “*charge clamp*” que se conforma por las cadenas laterales de los aminoácidos polares de las hélices H3; H4 y H12 del LBD del receptor (*Bledsoe et al, 2004*). Por otro lado, la unión de un antagonista perturba el posicionamiento de las hélices evitando la interacción del co-activador o promueve la asociación a co-represores tales como NCoR, que contienen tres dominios de interacción caracterizados por la secuencia consenso (I/L)xx(I/V)I (I= isoleucina, V= valina) (*Brzozowski et al, 1997*). Estudios mutacionales sugieren que tanto co-activadores como co-represores comparten la zona de unión a los SRs (*Nagy et al, 1999*).

1.2.4. Región de dimerización

Además de las superficies para la interacción con los co-reguladores, el LBD posee una segunda interfase de dimerización cercana a la región de unión al ADN (Bledsoe *et al*, 2004; Perlmann *et al*, 1996). Las estructuras cristalinas de las regiones de dimerización muestran similitudes estructurales entre los distintos SRs: una de ellas es que puede existir tanto como monómeros o como dímeros; y la segunda es que presentan la gran mayoría de los dímeros estudiados fueron homodímeros. No obstante, las regiones responsables de la homodimerización pueden funcionar también como regiones de heterodimerización entre los diferentes SRs, por lo que se han descrito heterodímeros de GR-MR, GR-ER o GR-AR (Savory *et al*, 2001, Karmakar *et al*, 2013; Chen *et al*, 1997), PR-ER (Mohammed *et al*, 2015) e incluso entre dos isoformas diferentes de un mismo receptor, como es el caso del ER α -ER β (Iwabuchi *et al*., 2017). Recientemente se ha demostrado que la unión al ADN del GR promueve además la interacción de dos homodímeros, formando tetrámeros (Presman *et al*, 2016). Todo ello, nos lleva a pensar que el proceso de dimerización de y entre los receptores esteroideos es un proceso complejo y dinámico.

Por otro lado, la disposición entre los monómeros que conforman un dímero son muy diferentes entre los SRs. Por ejemplo, en los dímeros del ER, la interacción ocurre entre la hélice H10 de la región C-terminal de uno de los monómeros con la hélice H11 de la región N-terminal del otro monómero (Heldring *et al*, 2007; Mocklinghoff *et al*, 2010); en cambio el homodímero de PR es mantenido por las hélices H11 y H12 de la región C-terminal (Williams and Sigler, 1998). Estas diferencias en cuanto a la disposición de la dimerización, no sólo impactan en la superficie de interfaz entre los monómeros, sino también en las interacciones moleculares que ocurren en las mismas. Es por ello que los dímeros entre los ER son los que poseen la mejor interacción, ya que tienen una mayor interfaz de dimerización que otros SRs (Chen *et al*, 2018).

1.3. Unión del ligando y translocación al núcleo

La mayoría de las proteínas que participan en el proceso de unión al ligando, así como su translocación al núcleo, son compartidas entre los diferentes SRs. Ambos eventos se producen en el lapso de unos minutos e involucra múltiples procesos.

Previo a la unión al ligando, la región C-terminal del SRs se encuentra asociado a varias proteínas. Las chaperonas Hsp90, Hsp70 y Hsp40 son algunas de ellas. Las mismas son responsables del correcto plegamiento, tráfico y activación transcripcional de los SRs (*Pratt et al, 2004; Galigniana et al., 2012; Hessenkemper and Baniahmad, 2012*). Además, estas proteínas poseen actividad ATPasa intrínseca que les permite regular su capacidad de reconocimiento de proteínas mal plegadas. La función ATPasa de Hsp90 y Hsp70 están co-reguladas por Hsp40. El modelo actual, principalmente descrito para el GR, propone que Hsp40 facilita la interacción entre el SR-Hsp70 y al mismo tiempo acelera la hidrólisis de ATP unido a esta última chaperona (*Chen et al, 2018*). Esto permite la unión del siguiente componente del complejo, la proteína HOP (*Hsp Organising protein*), que actúa como adaptador que une dos moléculas de Hsp90 y una de Hsp70 por molécula de SR (*Chen and Smith, 1998; Chen et al, 2018*).

La unión del complejo Hsp90-Hop-Hsp70-Hsp40 al SR induce un cambio conformacional en el receptor confiriéndole la capacidad de unir la hormona. Este proceso es dependiente de Mg^{2+} y ATP así como el ion K^+ (*Dittmar et al, 1997; Dittmar et al, 1998*). El cambio conformacional producido en la Hsp90 permite que la proteína p23 se una al complejo estabilizándolo. Luego, Hop y Hsp70 se disocian del complejo, dejando un sitio de unión libre en Hsp90 y el mismo es ocupado por una inmunofilina, formando el heterocomplejo final (*Pratt et al, 2004*) (**Fig. I-2**).

La translocación nuclear del AR, el GR y el MR depende en gran medida de la unión del ligando, mientras que la translocación del ER y el PR es independiente del ligando (*Welshons et al, 1984; Haverinen et al, 2001; Dull et al, 2010*). Hay dos regiones de localización nuclear dentro de los SRs (*Picard et al, 1990; Johnston et*

al, 2016): la primera abarca la región bisagra y el C-terminal de DBD, mientras que la segunda abarca el LBD. La ausencia de esta última región es la causa de la translocación del ER independiente del ligando (*Picard et al, 1990; Casa et al, 2016; Oakley et al, 2017*).

En el caso de los SRs que dependen de la unión al ligando, una vez que la hormona se une al “bolsillo” de la región LBD del receptor, éste se cierra generando una pérdida de afinidad con Hsp90 (*Bresnick et al, 1989; Pratt et al 2004*), y, en consecuencia, se translocan al núcleo.

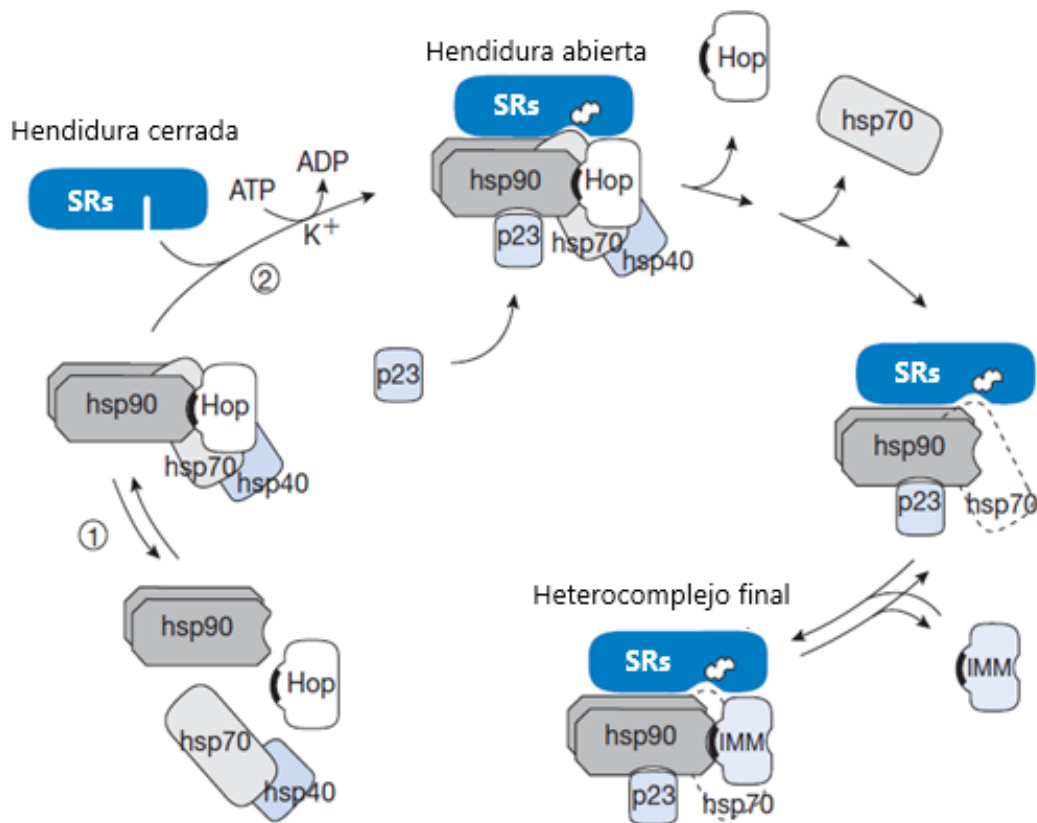


Figura I-2. Modelo de ensamblado del heterocomplejo. Las chaperonas Hsp90/Hsp70 transforman el LBD del SRs desde una conformación incapaz de unir hormona (**hendidura cerrada**) hacia una conformación donde el sitio de unión es accesible para el esteroide (**hendidura abierta**). Hop se une a Hsp90 y a Hsp70 a través de los dominios TPR para formar el complejo de chaperonas (**paso 1**). El complejo formado por Hsp90-Hop-Hsp70- Hsp40 contiene todos los componentes necesarios para abrir la hendidura, proceso que es dependiente de Mg^{2+} , ATP y K^{+} (**paso 2**). Cuando la hendidura se abre, la Hsp90 se encuentra en su estado conformacional dependiente de ATP, el cual es dinámicamente estabilizado por p23. Por otro lado, Hop es liberado de la Hsp90. Posteriormente a la salida de Hop, una inmunofilina (IMM) puede unirse al único sitio aceptor de TPR que existe en el dímero de Hsp90, formando el heterocomplejo final. Los sitios TPR de Hop y de la inmunofilina están indicados en negro. La Hsp70 abandona el complejo intermediario durante el ensamblado, y las líneas punteadas para la Hsp70 ilustra que la misma se encuentra en relación subestequiométrica con respecto al receptor. Adaptado de Pratt et al, 2004.

Sin embargo, el modelo de translocación al núcleo, todavía se encuentra en discusión. El modelo clásico establece que la disociación entre el SR y el heterocomplejo con Hsp90 es necesaria para que el receptor exponga su señal de localización nuclear y trasloque mediante la asociación de importinas (*Necela and Cidlowski, 2004*).

La unión al ligando desencadena la transformación del SRs LBD a un estado donde la interacción con el heterocomplejo de chaperonas se hace más dinámica, asociándose y disociándose de la Hsp90 y de las inmunofilinas (*Pratt et al 2004; Storer et al, 2011*).

Esta dinámica es la clave para el posterior viaje del receptor por los microtúbulos por medio de proteínas motoras, tales como la dineína (*Pratt et al 2004*). En ausencia de hormona el heterocomplejo se encuentra asociado mayormente a la inmunofilina FKBP51 (incapaz de unir dineína) (*Davies et al, 2002*). El primer evento que ocurre luego de la unión al ligando al SR, es el intercambio de FKBP51 por FKBP52 (capaz de unir dineína) en el heterocomplejo. Este cambio permitiría que el complejo se una a las proteínas motoras y transporte hacia el núcleo (**Fig. I-3**) (*Davies et al, 2002; Galigniana et al., 2012; Levin and Hammes, 2016*). Sin embargo, hay evidencias que algunos complejos ligando-SR son también capaces de translocar al núcleo en ausencia de microtúbulos (*Czar et al, 1995*) e incluso activar la transcripción de genes, pero con una cinética más lenta. Todas estas evidencias sugieren que la translocación ocurriría simultáneamente a través de ambos mecanismos. El uso preferencial de una u otra vía podría estar relacionado con el contexto celular.

La translocación desde el compartimento citoplasmático al nuclear ocurre a través del poro nuclear o NPC (por su sigla en inglés: *Nuclear Pore Complex*). Los SRs que poseen dos secuencias NLS, permiten la asociación simultánea con importinas y nucleoporinas presentes en el NPC (*Pratt et al 2004*), permitiendo la difusión facilitada del receptor (**Fig. I-3**). Durante el proceso de exportación desde el núcleo, participan las proteínas exportinas, que reconocen señales de exportación nuclear (*Pratt et al 2004; Storer et al, 2011*).

Es importante remarcar que los modelos que explican la translocación nuclear, descritos anteriormente, podrían tener diferencias respecto al mecanismo de pasaje a través del poro nuclear. La disociación del heterocomplejo de chaperonas inducida por la unión al ligando es compatible con un modelo de importación mediante importinas asociadas a una NLS. Por otro lado, también se

ha postulado que los SRs atraviesan el NPC formando parte del heterocomplejo con Hsp90 (Pratt et al 2004, Chen et al, 2018) (**Fig. I-3**).

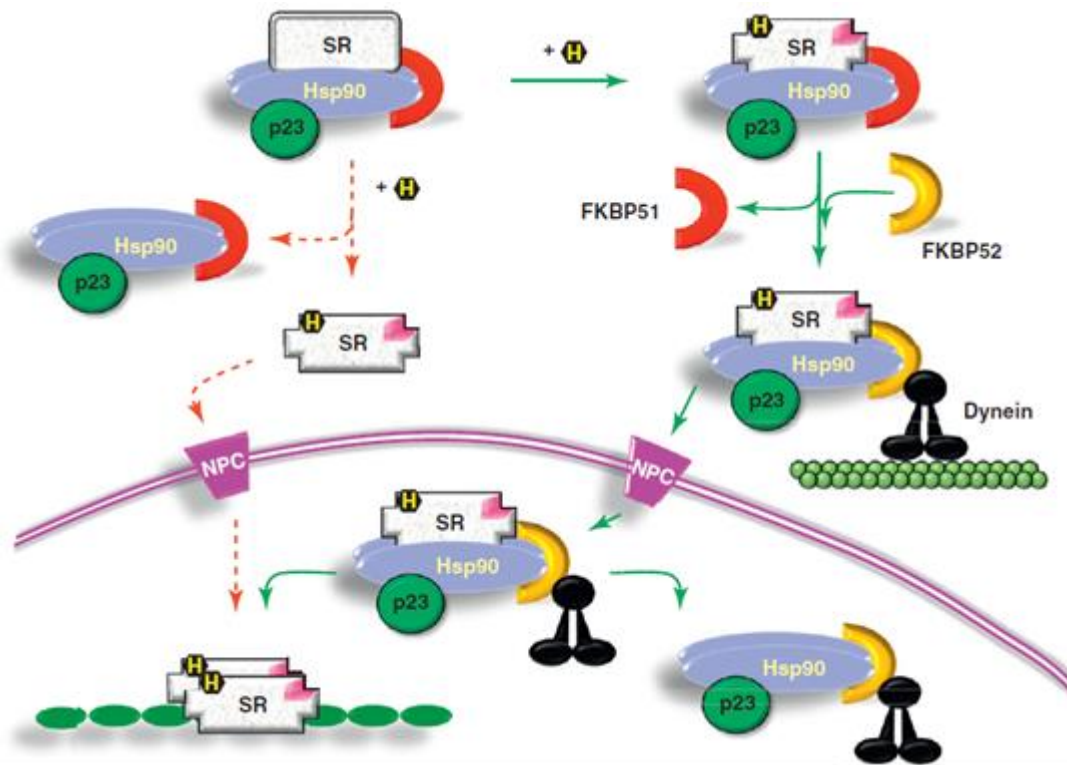


Figura I-3. Modelos de translocación del GR al núcleo. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la translocación de SR del citoplasma al núcleo. A la izquierda (líneas punteadas rojas), la unión de la hormona libera el complejo de chaperonas y el receptor puede translocar a través del complejo del poro nuclear (NPC). A la derecha (líneas continuas verdes), la unión de la hormona promueve el intercambio de inmunofilinas FKBP51 por FKBP52, que media la interacción con dineína. El SR es transportado vía citoesqueleto y translocado al núcleo junto con el complejo de chaperonas. En ambos mecanismos, se postula que el SR expone la NLS en su conformación unida a ligando. Adaptado de Storer et al, 2011.

2. RECEPTOR DE PROGESTERONA

2.1. Fisiología de la progesterona

La progesterona (P4) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono perteneciente a la familia de los progestágenos. Entre sus múltiples acciones, resulta de particular relevancia el papel que juega durante la preñez, lo que explica la etiología de su nombre, que proviene del latín *pro gestationem*. P4 permite la transición endometrial de una etapa proliferativa a la secretora, facilita la anidación del blastocisto y es esencial para el mantenimiento de la preñez, ya sea en la formación de la placenta y en la mamogénesis y posterior lactogénesis (*Taraborrelli, 2015; Wu and DeMayo, 2017*). Además, P4 también regula funcionalmente otros tejidos tales como el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central y el sistema óseo (*Graham and Clarke, 1997*).

La P4 humana es producida por los ovarios bajo la influencia de las hormonas hipotálamo-hipofisarias (hormona folículo estimulante –FSH- y hormona luteinizante –LH-), principalmente por el cuerpo lúteo que se forma durante la segunda mitad del ciclo menstrual y por la placenta a partir del tercer mes de embarazo.

La secreción de P4 comienza antes de la ovulación, es decir en el folículo pre-ovulatorio. Este último es capaz de sintetizar estrógenos y progesterona que actúan directamente sobre las células de la granulosa, promoviendo el crecimiento folicular e inhibiendo el proceso de apoptosis (*Peluso, 2013*). Luego de la ovulación, el folículo se convierte en cuerpo lúteo por acción de factores angiogénicos contenidos en el líquido folicular (*Frederick et al, 1984*), que permiten la proliferación de capilares sanguíneos y de fibroblastos en la lámina basal de las células de la granulosa. Este mecanismo es esencial, ya que facilita la captación de colesterol - sustrato limitante para la síntesis de progesterona- a través de receptores de LDL (lipoproteínas de baja densidad) presentes en las células del cuerpo lúteo (*Revindranath et al, 1992*). En humanos, en un ciclo menstrual normal, las concentraciones de progesterona durante la fase folicular son inferiores a 1 ng/ml, pero en los días posteriores a la ovulación alcanzan valores entre 10 a 35 ng/ml. Ya en la fase lútea, la secreción de progesterona es episódica y sus variaciones están

estrechamente relacionadas con la liberación pulsátil de LH. En ausencia de concepción, el cuerpo lúteo involucre dentro de los 9 a 11 días posteriores a la ovulación, disminuyendo así los niveles de progesterona circulante e iniciando la menstruación (*Filicori et al, 1984; Rodríguez-Cortés et al, 2014*).

Si el óvulo es fecundado, la P4 es producida casi en su totalidad por el cuerpo lúteo hasta la novena semana de gestación (*Csapo et al, 1973; Rodríguez-Cortés et al, 2014; Taraborrelli, 2015*); a partir de entonces, el sinciotrofoblasto comienza a secretar la hormona gonadotropina coriónica (hCG) en la circulación materna, prolongando así la vida funcional del cuerpo lúteo. A medida que la gestación y la formación de la placenta avanzan, esta última se convierte en la mayor fuente de producción de P4 (y también de estrógenos), incluso hasta el momento del parto (*Orizaba-Chávez et al, 2013; Rodríguez-Cortés et al, 2014; Taraborrelli, 2015*).

La síntesis de P4 se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona, catalizada por la enzima citocromo P450, que escinde la cadena lateral del colesterol convirtiéndolo en ese esteroide de 21 átomos de carbono (*Genazzani, 2004*). Una vez sintetizada, la pregnenolona puede tomar dos rutas metabólicas:

1. aquella catalizada por la enzima La 3 β HSD (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa), que la convierte en progesterona.
2. La ruta catalizada por la enzima 17 α -hidroxilasa (P450c17), que la convierte en 17 α -hidroxi-pregnenolona.

La 3 β HSD cataliza la transformación de pregnenolona en progesterona, por deshidrogenación del grupo hidroxilo y su conversión en carbonilo, e isomerización del doble enlace C5-C6 a C4-C5 (*Rodríguez-Cortés et al, 2014; Taraborrelli, 2015*). La progesterona es secretada por las células del cuerpo lúteo granuloso, dado que la 3 β HSD es la ruta dominante en ese tipo celular. Por otro lado, en las células de la teca interna, la ruta dominante es la síntesis de andrógenos donde participa una isoenzima de la 17 α -hidroxilasa, la 17,20 liasa provocando la formación de dehidroepiandrosterona y otros andrógenos derivados (*Amadori et al, 1994; Rodríguez-Cortés et al, 2014; Taraborrelli, 2015*).

La mayor parte de la P4 sintetizada pasa a circulación sistémica unida a la globulina fijadora de cortisol (alrededor del 10%) y la albúmina sérica; y una pequeña fracción es oxidada para convertirse en andrógenos y estrógenos. Los metabolitos producidos principalmente en el hígado son sulfatos y glucurónidos reducidos, que se excretan por la orina. Si no se produce embarazo, el cuerpo lúteo involuciona, pero durante la lúteolisis aumenta la actividad de la enzima 20alfa hidroxisteroide deshidrogenasa (20aHSD), enzima que cataliza la conversión de la progesterona a su metabolito inactivo 20a-OH progesterona (*Rodríguez-Cortés et al, 2014*).

2.2. Farmacología de la progesterona

Los progestágenos son un grupo de agentes farmacológicos con capacidad de activar el receptor de progestágenos, e incluso, algunos de ellos poseen una potencia progestacional muy superior a la de la hormona endógena. Los mismos pueden clasificarse en dos grupos: los derivados de pregnano y los derivados de androstano. Los derivados de pregnano están constituidos por 21 átomos de carbono y en este grupo podemos encontrar a la P4 propiamente dicha, la hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona, etisterona, entre otros. Mientras que el grupo de los derivados de androstano están conformados por 19 átomos de carbono. Estos últimos, además de las acciones progestágenas poseen efectos androgénicos y estrogénicos. Se utilizan básicamente como agentes anovulatorios en la anticoncepción hormonal. Ejemplos de ellos son noretinodrel, etinilodiol, levonorgestrel, entre otros.

La P4 y los progestágenos producen una serie de acciones con importantes aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, tienen una gran aplicabilidad en el tratamiento del carcinoma de endometrio recurrente y metastásico; así como en la endometriosis. Los progestágenos son indispensables para el mantenimiento del embarazo, inhiben la contractibilidad uterina y contribuyen al mantenimiento de un estado de “*inmunidad de trasplante*” necesario para prevenir un rechazo

inmunológico del feto (*Carp, 2018*). Estas acciones han provocado el uso de progestágenos ante la amenaza de abortos espontáneos o recurrentes, e incluso prevenir el parto prematuro (*Carp, 2018*). Los progestágenos también son utilizados para el tratamiento de diferentes afecciones tales como dismenorrea, hemorragias uterinas, como así también para aliviar los síntomas que padecen algunas mujeres durante el síndrome premestrua.

Otro uso muy conocido de los progestágenos es como anticonceptivos orales. La administración conjunta con un estrógeno sintético, produce la inhibición de la síntesis de LH y FSH, produciendo en consecuencia la anovulación.

Entre los efectos adversos de los progestágenos se encuentran el aumento de los triglicéridos (por incremento de los VLDLs), del colesterol LDL y la disminución de HDL. Todos estos efectos favorecen la formación de ateromas y en consecuencia aterosclerosis y demás enfermedades cardiovasculares.

2.3. Isoformas y modificaciones postraduccionales del PR

Como se mencionó en la primera sección, el PR posee dos isoformas que surgen a partir de uso de dos promotores alternativos de un mismo gen: los mismos son PRa y PRb (94 KDa y 120 KDa, respectivamente) (*Kastner, Krust, Turcotte et al., 1990*). No obstante, se ha descrito la presencia de otra isoforma denominada PRc (60 KDa), que no posee la región AF-3 y tampoco parte del dominio de unión al ADN, haciéndolo transcripcionalmente inactivo (*Wei et al, 1996*).

Tanto PRa como PRb poseen muchas modificaciones pos-traduccionales, principalmente en los residuos de serina (fosforilación) y lisina (acetilación, ubiquitinación y sumoilación) ubicados en la región N-terminal del receptor (*Regan, Dressing et al., 2011; Hagan et al, 2012; Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014*). Estas modificaciones con frecuencia son dependientes de la unión del ligando, sin embargo, pueden ocurrir independientemente de la acción hormonal. Estas últimas alteran de manera significativa la estabilidad del receptor, las interacciones de

unión, la actividad transcripcional y la selectividad del promotor (*Daniel, Knutson and Lange, 2009, Ward and Weigel, 2009; Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014*).

2.4. Activación y mecanismo de acción del PR

Los efectos de la progesterona en los diferentes tipos de tejidos blancos se traducen en dos vías de señalización, una clásica y otra no clásica. La primera ocurre mediante el mecanismo bien conocido de todos los SRs, es decir, la unión del ligando al receptor, su acumulación en el núcleo, su dimerización, y su consecuente unión a los elementos de respuesta a la progesterona (PRE), e interacción con co-reguladores, favoreciendo así la transcripción génica (*Jacobsen and Horwitz, 2012*) (**Fig. I-4**). Múltiples evidencias también demuestran que el PR se localiza en el núcleo celular en *Jacobsen and Horwitz, 2012* ausencia de hormonas y que la dimerización no sería el único estado de oligomerización que podemos encontrar una vez que el ligando se une al receptor (*Boonyaratanakornkit et al, 2008; Jacobsen and Horwitz, 2012; Jiménez-Panizo et al, 2019*)

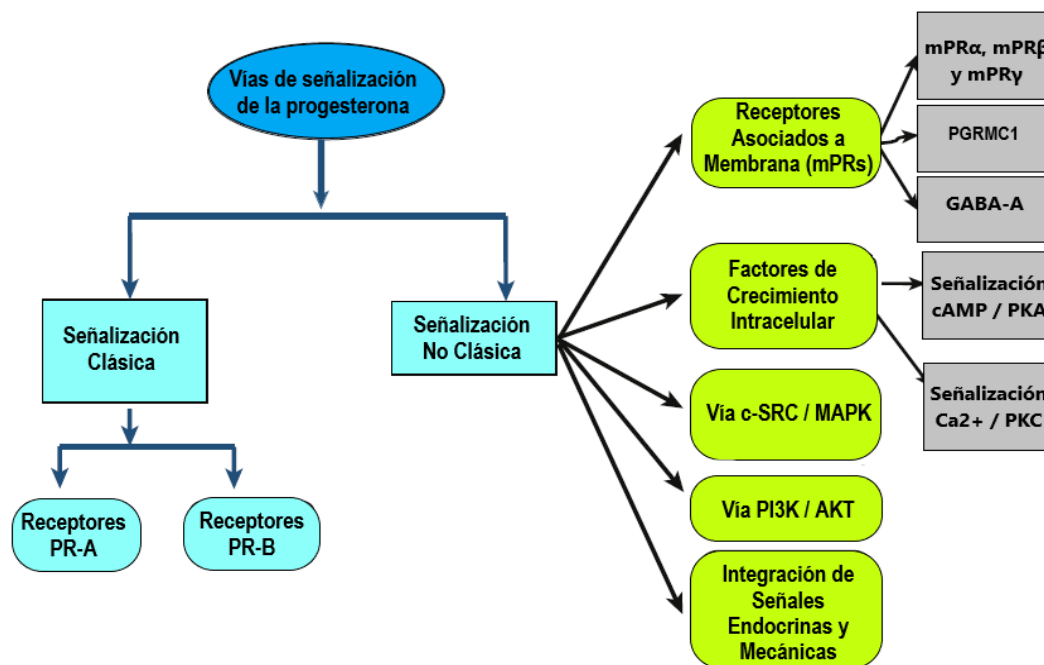


Figura I-4. Vías de señalización de la progesterona: vías clásicas y no clásicas. La comparación de la activación de genes mediada por receptores de progesterona nucleares se compara con los eventos celulares mediados por la vía "no clásica". La señalización no clásica es compleja, pero se puede considerar que implica cinco mecanismos distintos pero superpuestos. *Garg et al, 2017*).

Por otro lado, las vías no clásicas pueden ser dependientes o independientes de la regulación transcripcional o genómica (*Vicent et al, 2013*). Con el tiempo se ha evidenciado que hay respuestas rápidas que se deberían a los diferentes mecanismos de la señalización no clásica tales como los receptores asociados a la membrana (mPRs), participación de distintos segundos mensajeros, vías de transducción de señales intracelulares independientes del PR, así como la integración de señales mecánicas y endócrinas (*Mani et al, 2012; Contrò et al, 2015*) (**Fig. I-4**). En ese sentido, se han establecido criterios para distinguir los efectos que son producto de las vías de señalización no clásicas comparado con los de la vía clásica, los mismos son: i) rapidez de la respuesta a los efectos de la progesterona, que son incompatibles con la activación transcripcional, seguida de traducción; ii) insensibilidad a los inhibidores de la transcripción o traducción; iii) falta de respuesta a los antagonistas del receptor nuclear; iv) presencia de respuesta a los progestágenos en células que carecen de núcleos tales como plaquetas y eritrocitos; y v) inducción por conjugados moleculares impermeables a las células

(Losei, et al 2003). Sin embargo, esta Tesis no se abordaron estos mecanismos, por lo cual no serán descritos con detalle.

La variabilidad de las acciones del PR depende del contexto celular, involucrando factores tales como el tipo de tejido o célula, disponibilidad específica de las proteínas co-reguladoras así como otros factores de transcripción que interaccionan con el receptor, el contexto de la cromatina y las vías de señalización específicas que funcionan como entrada para regular la actividad del PR (Briskin, 2013; Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014; Hagan and Lange, 2014; Hilton et al, 2015).

Aunque el genoma alberga miles de secuencias de unión PRE, sólo una fracción de estas está más enriquecida por el PR luego de la estimulación hormonal, lo que nos indica que la presencia de un solo PRE no es suficiente para la unión (Ballare et al, 2013). Por análisis bioinformático se ha podido revelar la presencia de motivos de secuencia en las regiones lindantes a los sitios de unión de PR. Éstos son motivos de unión de factores de transcripción como ETS, STAT, FOXA1, SP1 y AP-1; y la abundancia o no de cada uno de esos factores está relacionada con el tipo celular y/o el tejido analizado (Clarke and Graham, 2012; Yin et al, 2012; Ballare et al, 2013; Lain et al, 2013; Mazur et al, 2015). Así como otros SRs, el PR tiene la capacidad de abrir la cromatina para posteriormente poder ingresar a los sitios genómicos. Una de las primeras evidencias de esta acción fue descripta utilizando el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) empaquetado nucleosomas, lo cual ofrece un complicado acceso. Una vez activo el PR en respuesta al tratamiento hormonal, los nucleosomas experimentaron una remodelación local como resultado del reclutamiento de complejos enzimáticos de dímeros de las histonas H1 y H2A/H2B sin pérdida de la estructura del nucleosomas (Beato and Vicent, 2012). Aunque las transiciones estructurales responsables de la accesibilidad del PR al PRE son complejas, la remodelación local del nucleosoma iniciada por el receptor permitió el aumento del ingreso colectivo de los factores de remodelación de la cromatina (Archer et al, 1994) y la maquinaria transcripcional basal (Vicent et al, 2010). Análisis de ChIP-Seq, confirman que los sitios de unión del PR están localizados en gran medida en nucleosomas, confirmando la

importancia de este receptor en el inicio de la unión y en consecuencia la remodelación local de los nucleosomas (*Ballere et al, 2013; Beato and Vicent, 2012; Grimm, et al 2016*).

Como se ha descrito para otros SRs, los sitios de unión de PR en el genoma están ampliamente distribuidos, pero sólo una pequeña fracción de los mismos se ubican en regiones promotoras proximales (*Massie et al, 2011; Reddy et al, 2009; Welboren et al, 2009; Chen et al, 1997*). La mayoría de los sitios del PR están localizados distalmente dentro de intrones y secuencias intergénicas, evidenciadas por las típicas modificaciones de histonas de las regiones potenciadoras (*Ballere et al, 2013; Clarke and Graham, 2012; Yin et al, 2012*). Se ha demostrado por ensayos 3C (*Chromosome capture Assay*), la existencia de interacción física dependiente de hormonas entre los sitios de PR distales y el promotor, permitiendo así la transcripción del gen (*Ballere et al, 2013*).

De todos modos, se necesita explorar aún más para conocer la naturaleza compleja y única de las interacciones del PR en el entorno cromatínico, incluida la forma en que la hormona regula las interacciones espaciales entre las regiones reguladoras. Así como también tratar de comprender cómo median las respuestas celulares cuando AR, GR, MR y PR reconocen la misma secuencia consenso a lo largo de todo el genoma.

2.4.1. Influencia de cofactores de transcripción sobre la actividad del PR

Los co-reguladores son proteínas que modulan la actividad transcripcional de diferentes TF. Poseen asociadas actividades enzimáticas que median, a través de la reorganización de la cromatina, la señal entre el TF unido al ADN y la maquinaria transcripcional. La activación o represión transcripcional dependiente del PR depende de la naturaleza del promotor del gen blanco que se regula y de los cofactores reclutados.

Los co-reguladores son clasificados según su función, en co-activadores o correpresores. Los co-activadores pueden presentar actividad acetiltransferasa, metiltransferasa o de remodeladores de cromatina dependientes de ATP, entre otros. Todas ellas tienen un impacto directo sobre la estructura de la cromatina y la accesibilidad de la ARN polimerasa II al ADN, promoviendo así la activación de la transcripción. (Rowan and Malley, 2000; Lonard and O'Malley, 2005; Skowron et al, 2019).

Existen varias familias de proteínas que actúan como co-activadores del PR, algunos de ellos son miembros de la familia de CBP/p300, E6-AP y RPF-1 (ubiquitín ligasas), HMG-1/2, L7/SPA, entre otros. Una de las familias de co-activadores más conocidos del PR son los miembros de SRCs (por su sigla en inglés Steroid Receptor Coactivator) (SRC-1, SRC-2 y SRC-3) que interactúan predominantemente a través del dominio LBD que contiene la región AF-2 del receptor (Rowan and O'Malley, 2000). No obstante, SRC-1 también interactúa con la región AF-1 del dominio N-terminal, permitiendo así que este activador participe en interacciones con otras proteínas relevantes para la remodelación de la cromatina, tales como CREB (*cAMP response element-binding*, por su sigla en inglés) proteínas de la maquinaria basal de la transcripción e histona acetiltransferasa (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2018).

Por otro lado, los co-represores realizan la actividad inversa a los co-activadores, resultando en una compactación de la cromatina, con la consecuente inhibición de la transcripción (Smith and O'Malley, 2004). Al igual que los co-activadores, funcionan como plataformas de reclutamiento que median la interacción entre el TF específico y los efectores que modifican el estado de la cromatina o interactúan con la maquinaria basal. Los co-represores más conocidos que interactúan con el PR son los miembros de la familia SMRT (Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor) y NCoR (Nuclear receptor Corepressor). Los mismos tienen la capacidad de reclutar e interactuar con miembros de la familia de deacetilasas de histonas (HDACs), permitiendo así la compactación de la cromatina (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2018).

PR también puede regular negativamente la transcripción, ya sea de manera directa o indirecta por transrepresión, interfiriendo con o siendo interferido por otros factores de unión al ADN. PR puede transreprimir promotores sintéticos de ER (*Abdel-Hafiz et al, 2002*) o de lipocalina2 (*Mrusek et al, 2005*). Por otro lado, la subunidad RelA (p65) del factor NF-kB inhibe específicamente la transcripción del PR activo (*Kalkhoven et al, 1996*), provocando así la represión génica.

2.5. Ligandos sintéticos del PR

Podemos encontrar una gran variabilidad de ligandos sintéticos del PR con diferentes características funcionales. En este trabajo de Tesis, se utilizó el progestágeno sintético conocido como R5020 o promegestona. R5020 es una 17 β -propionilestra-4,9-dien-3-ona, que en el C17 posee un grupo metilo sustituido (**Fig. I-5**) (*Chan and Slaunwhite, 1977*).

Como el R5020 no se une a las transcortina o globulinas fijadoras de corticosteroides (CBG) es muy utilizado para el estudio de la distribución de los progestágenos y de los receptores en los diferentes tejidos que responden al mencionado ligando (*Chan and Slaunwhite, 1977*). R5020 tiene mayor afinidad de unión al PR que el ligando natural, progesterona (*Kuhl, 2005*).

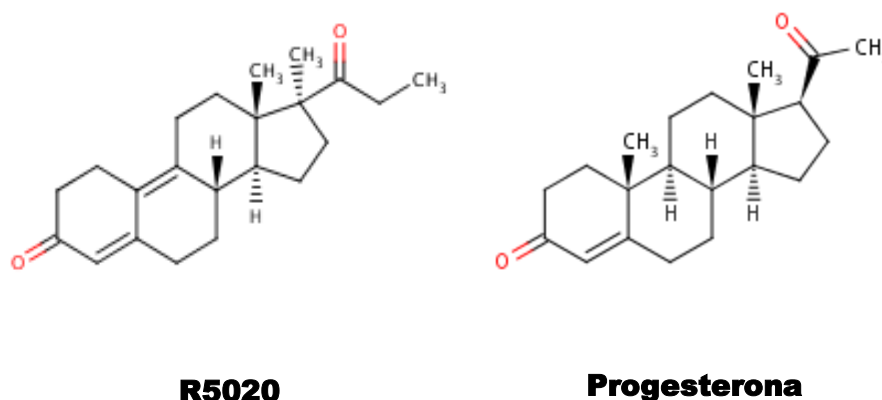


Figura I-5. Estructura del ligando R5020. Estructura de la progesterona (ligando endógeno humano) y del R5020 (agonista). Adaptado de *Chemical Entities of Biological Interest* (ChEBI).

3. RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

3.1. Fisiología de los glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) son producidos principalmente en la zona fasciculata de la corteza de la glándula adrenal. Tanto su síntesis como su secreción al sistema circulatorio están controladas por el sistema nervioso central a través del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (*Simpson and Waterman 1988*).

La activación del eje está influida por diversos factores, como el estrés, la actividad física, las infecciones y los ritmos circadianos. En respuesta a estas señales, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), la cual a su vez activa la síntesis de POMC (Proopiomelanocortina) y la liberación de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) en los corticotrofos de la glándula pituitaria. Esta hormona actúa sobre la corteza adrenal promoviendo un rápido incremento en la síntesis y secreción de GC, mediante la inducción de la expresión de diversas enzimas y transportadores que participan en la biosíntesis de esteroides (*Jones and Gillham, 1988; Holsboer, 1999; Kloet et al, 2005*). Los niveles circulantes de GC son mantenidos, en parte, por la retroalimentación negativa establecida dentro del eje HPA. La alta concentración de cortisol (en mamíferos no roedores) disminuye la síntesis y secreción de ACTH en hipófisis, el cual, a su vez, disminuye la síntesis y secreción de GC de la glándula adrenal (*Vinson et al, 1992*). Bajo condiciones fisiológicas, la secreción de ACTH mantiene un ritmo circadiano, lo que resulta finalmente en un ritmo pulsátil de producción de glucocorticoides endógenos (*Kleiman et al, 2007*).

Luego de su liberación, los glucocorticoides se transportan en forma libre (15%), o unidos a proteínas plasmáticas, como la globulina fijadora de cortisol (80%) y la albúmina (5%) (*Westphal, 1986*). Cabe destacar que sólo la hormona libre es capaz de ingresar dentro de las células, y por lo tanto ser biológicamente activa. La biodisponibilidad intracelular del cortisol en el citoplasma está controlada por la acción de dos enzimas: la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β -HSD2) y la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1) (*Van der Laan et al, 2008*). La 11 β -HSD2 cataliza la conversión de cortisol en cortisona, metabolito con muy baja afinidad por el GR, mientras que, en forma opuesta, la 11 β -HSD1 cataliza

la conversión de cortisona en cortisol. Los niveles relativos de expresión de estas enzimas varían según el tipo celular, y son determinantes de los niveles de cortisol intracelulares, constituyendo así un mecanismo adicional en la especificidad de acción de los glucocorticoides (*Van der Laan et al, 2008*).

Como el GR media la acción hormonal de los GC y se expresa en prácticamente todos los tipos celulares, los GC producen efectos en todos los sistemas del organismo. En concentraciones sistémicas basales, regulan principalmente el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Contribuyen a aumentar la glucemia mediante la inducción de la gluconeogénesis en el hígado, y de la proteólisis y la lipólisis en órganos periféricos. En situaciones de estrés, se produce un aumento significativo de los niveles circulantes de GC, y se observan también sus efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores. Los GC actúan en este caso sobre distintos tipos celulares del sistema inmune, inhibiendo la síntesis y/o la liberación de citoquinas (*McMaster et al, 2007; Kleiman et al, 2007*). Además, ejercen una influencia relevante sobre una gran variedad de sistemas y procesos, como el sistema nervioso central (*Chen et al, 2008*), el desarrollo embrionario (*Cole, 2006*), la proliferación y la muerte celular (*Amsterdam et al, 2002*).

3.2. Farmacología de los GC

Los GC son de las drogas más utilizadas, crónica u ocasionalmente, por la población mundial (*Overman et al, 2013*). Debido a sus efectos inmunosupresores y anti-inflamatorios (**Fig. I-6**), se diseñó y sintetizó una amplia variedad de agonistas sintéticos del GR, que se utilizan para tratar desórdenes inflamatorios, enfermedades autoinmunes y el rechazo inmunológico en trasplantes de órganos (*Rosen and Miner, 2005; Deeg and Henslee-Downey, 1990*), así como también en terapias combinadas para algunos tratamientos anti-tumorales (*Rosen and Miner, 2005*) (**Fig. I-6**).

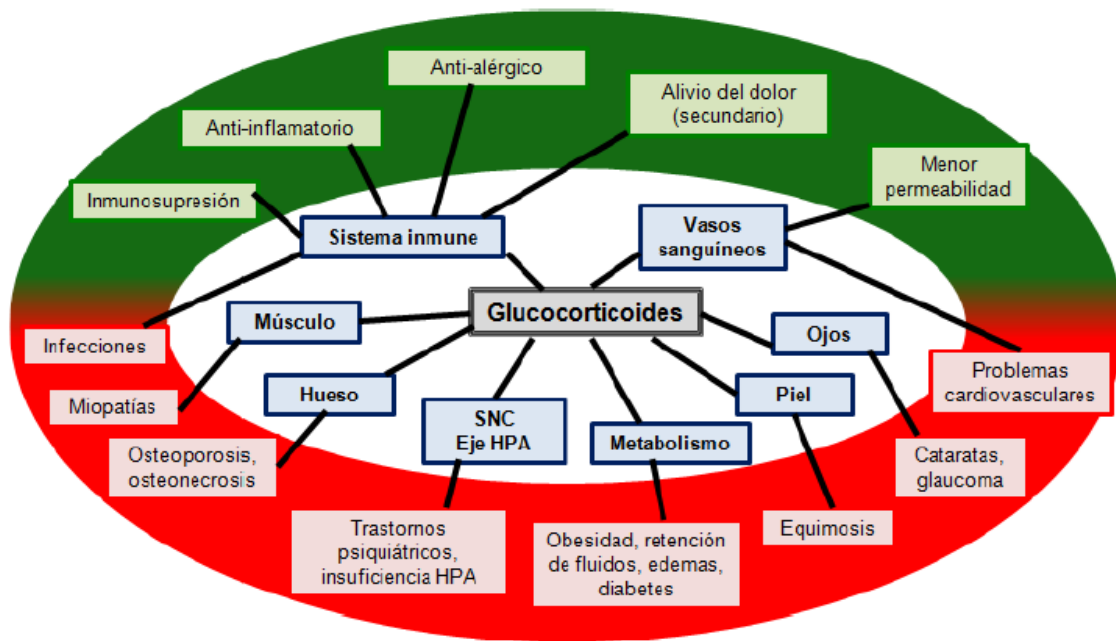


Figura I-6. Efectos deseados y adversos del uso clínicos de los glucocorticoides (GC). Los GC ejercen múltiples efectos en diferentes órganos y tejidos, ya sean favorables desde el punto de vista terapéutico (marcados en verde) o adversos (marcados en rojo). Modificado de Buttgeriet et al, 2005.

Lamentablemente, el uso farmacológico de GC conlleva una gran variedad de efectos adversos, que pueden agravarse en casos de tratamientos crónicos o con dosis elevadas. Los efectos en el organismo son similares a los observados en patologías que involucran un exceso de GC endógenos, tales como el síndrome de Cushing (*Ceccato and Boscaro, 2016*), e incluyen diabetes, osteoporosis, atrofia de la piel, glaucoma, redistribución de grasa corporal, hipertensión arterial, psicosis, neurodegeneración (*McMaster and Ray, 2007; Kleiman and Tuckermann, 2007*) (**Fig. I-6**). Estos efectos adversos ocasionados por un exceso de GC podrían ser tratados mediante antiglucocorticoides, es decir, antagonistas del GR (*Nieman et al, 1985; Rosen and Miner, 2005*). Sin embargo, los antiglucocorticoides disponibles farmacológicamente, por ejemplo, RU486 o mifepristona (*Spitz and Bardin, 1993*), no son específicos, sino que también son antagonistas de otros SR, por ejemplo el PR.

Por lo tanto, desde hace varios años numerosos grupos de investigación se han enfocado en el diseño de nuevos fármacos con potencial efecto dissociado, es decir, que mantuvieran los efectos deseados o beneficiosos de los GC pero con menor prevalencia de efectos adversos (*Van der Laan and Meijer, 2008*).

3.3. isoformas y modificaciones postraduccionales del GR

El GR humano está codificado por el gen NR3C1, localizado en el cromosoma 5q11-q13. Este gen posee al menos tres promotores alternativos y 9 exones, de los cuales solo el primero no es codificante (*Yudt and Cidlowski, 2002*). Como resultado del *splicing* alternativo se generan un total de 8 isoformas: GR α -A (o GR α), GR α -B (o GR β), GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2, y GR α -D3 (**Fig. I-7**). Todas ellas muestran una afinidad similar por los GCs y una capacidad semejante para interactuar con los elementos de respuesta GRE presentes en los genes blanco, después de su activación con el ligando (*Lu and Cidlowski, 2008*). Las isoformas GR α y GR β son las más expresadas, mientras que las restantes se producen en menor proporción. Estas dos isoformas poseen idénticos dominios AF-1 y DBD, diferenciándose únicamente en el dominio LBD. El GR β es una proteína más corta que GR α (742 residuos contra 777 residuos), siendo los 15 residuos finales exclusivos para la isoforma β . Inicialmente se pensaba que el GR β no unía ligando y que inhibe la expresión génica mediada por GR α , comportándose como un factor dominante negativo del propio GR α (*Bamberger et al, 1995; Oakley et al, 1996*). No obstante, ahora se sabe que al sobre-expresar el GR β , este es capaz de unir al ligando RU486 (*Lewis-Tuffin et al, 2007*). Los niveles relativos de expresión de estas dos isoformas difieren en cada tipo celular y constituyen un mecanismo que aporta a la especificidad de respuesta glucocorticoide (*Gross and Cidlowski, 2008*).

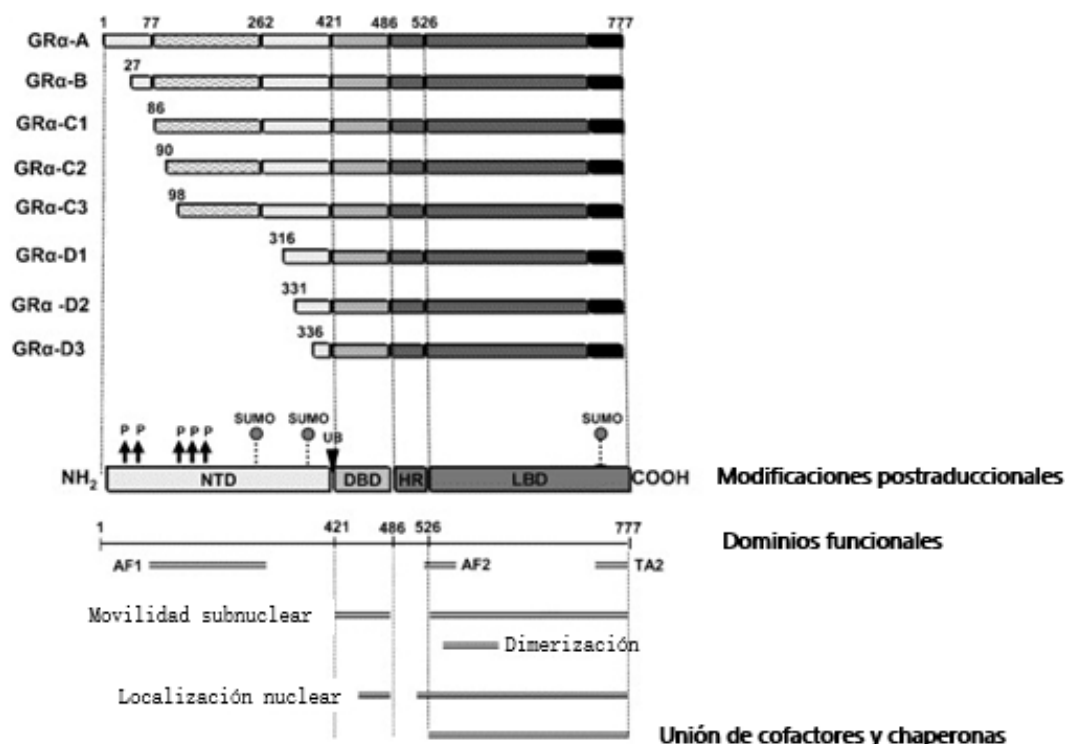


Figura I-7. Isoformas del GR. Comparación de las diferentes regiones del GR entre sus isoformas. Modificado de Cidlowski et al, 2005.

Cada isoforma del GR está sujeta a una variedad de modificaciones postraduccionales que también modulan su función. Hasta la fecha se han identificado diferentes residuos que son blanco de ubiquitinación (Lys-419, Lys-277, Lys-293 y Lys-703), acetilación (Lys-494 y Lys-495), fosforilación (Ser-113, Ser-134, Ser-141, Ser-203, Ser-211, Ser-226 y Ser-404) y sumoilación. Todas ellas pueden regular múltiples aspectos de la función del GR, proporcionando aún más heterogeneidad en las respuestas a los GCs (*Oakley and Cidlowski, 2013*).

3.4. Mecanismo de acción del GR

La activación del GR involucra una serie de eventos que comienzan en el citoplasma con la unión del ligando al receptor. Posteriormente, el GR transloca al núcleo, homodimeriza y regula la expresión de una gran variedad de genes, ya sea

de forma positiva o negativa. Su mecanismo de acción involucra la interacción del complejo ligando-receptor con secuencias *blanco* en el ADN (GREs), con co-reguladores de la transcripción y con otros factores de transcripción (**Fig. I-8**).

Además, se han descrito efectos no genómicos de los GC, de acción más rápida que los producidos por regulación de la expresión génica (Losei et al, 2003). Por ejemplo, la interacción del GR con la quinasa JNK (Losei et al, 2003) y con el receptor de linfocitos T afecta estas vías de señalización (Lowenberg et al, 2007) (**Fig. I-8**). No obstante, en esta Tesis no se abordaron estos efectos, por lo cual no serán descritos en detalle.

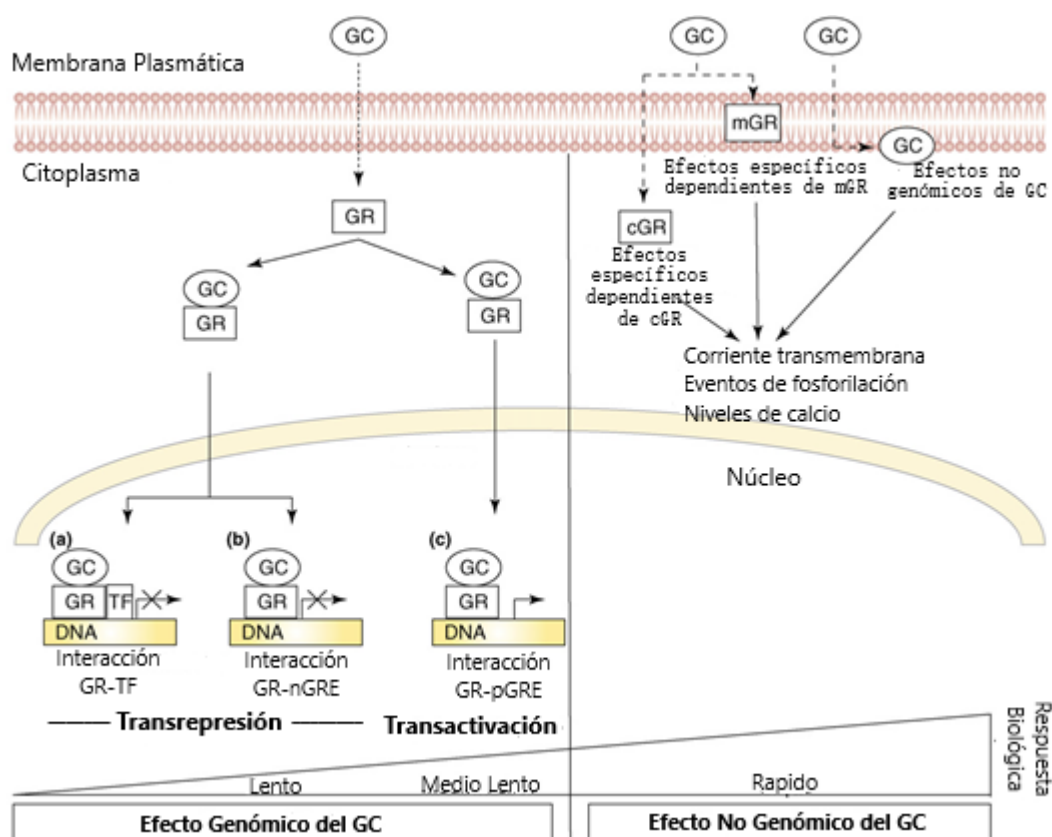


Figura I-8. Efectos genómicos y no genómicos de los glucocorticoides. Los efectos genómicos de los glucocorticoides (GC) incluyen todos aquellos en donde el GR actúa como factor de transcripción, ya sea a través de su unión a elementos de respuesta positivos (pGRE), negativos (nGRE) o mediante la modulación de otros factores de transcripción (TF). Se los define como *lentos*, debido a que usualmente es necesaria la síntesis de ARNm y proteínas. En contraposición, los efectos no genómicos, *rápidos*, independientes de la síntesis de proteínas, pueden ocurrir ya sea en ausencia de receptor, o a través de la unión al receptor citoplasmático (cGR) o de membrana (mGR). Adaptado de Löwenberg et al, 2007.

3.4.1. Mecanismo de acción del GR

Una vez en el núcleo, el GR puede actuar directamente como factor de transcripción (TF) o indirectamente regulando la actividad de otros factores de transcripción. Esto conlleva a la regulación de la expresión génica positiva o negativa de cientos a miles de genes, dependiendo del contexto celular. En la **figura I-8** se resume los principales mecanismos descritos que dan cuenta de cómo el GR puede activar o reprimir la expresión de genes.

3.4.1.1. Acción directa del GR como factor de transcripción

A través del dominio DBD, el GR reconoce las secuencias específicas GREs que se encuentran en sus genes blancos (**Fig. I-9i**). Tal como se había mencionado en la sección 1.2.2., el GRE consiste en una secuencia palindrómica a la cual se une el GR. No obstante, algunos genes requieren no sólo que el GR se una a los sitios GRE, sino que también necesitan de la unión de otros TF, lo que se define como una unidad de respuesta a GC o GRU (*Schonevel et al, 2004*). Incluso, se han descrito hemisitios llamados 1/2GRE, que consisten en la mitad de la secuencia completa de reconocimiento, donde se propuso que el GR se uniría como monómero (*Segard et al, 1996*). A pesar que estos sitios no son suficientes para dar una respuesta, su combinación con factores adicionales (**Fig. I-9ii**), otros GREs, o inclusive múltiples 1/2GRE pueden dar lugar a una respuesta (*Schonevel et al, 2004*).

Para que se inicie la transcripción génica, se requiere el reclutamiento de la maquinaria basal transcripcional, así como de la presencia de remodeladores de la cromatina (*Collingwood et al, 1999*). Entre los integrantes de la maquinaria basal, se ha descrito la interacción del dominio AF-1 del GR con los factores basales TFIID y TBP. Dentro de los co-activadores encontramos a CBP y p300 que poseen actividad de acetiltransferasas de histonas (HAT) e interactúan con el dominio AF-1 e indirectamente con el dominio AF-2, a través de cofactores miembros de la familia p160 como SRC1/NCoA-1 (*Schaaf and Cidlowski, 2002*). El GR también

interactúa con BRG-1 (*Brahma-related gene-1*), otro cofactor que remueve la histona H1 de la cromatina, favoreciendo el acceso de factores basales como TBP y NF-1 (Fryer and Archer, 1998; Deroo and Archer, 2001).

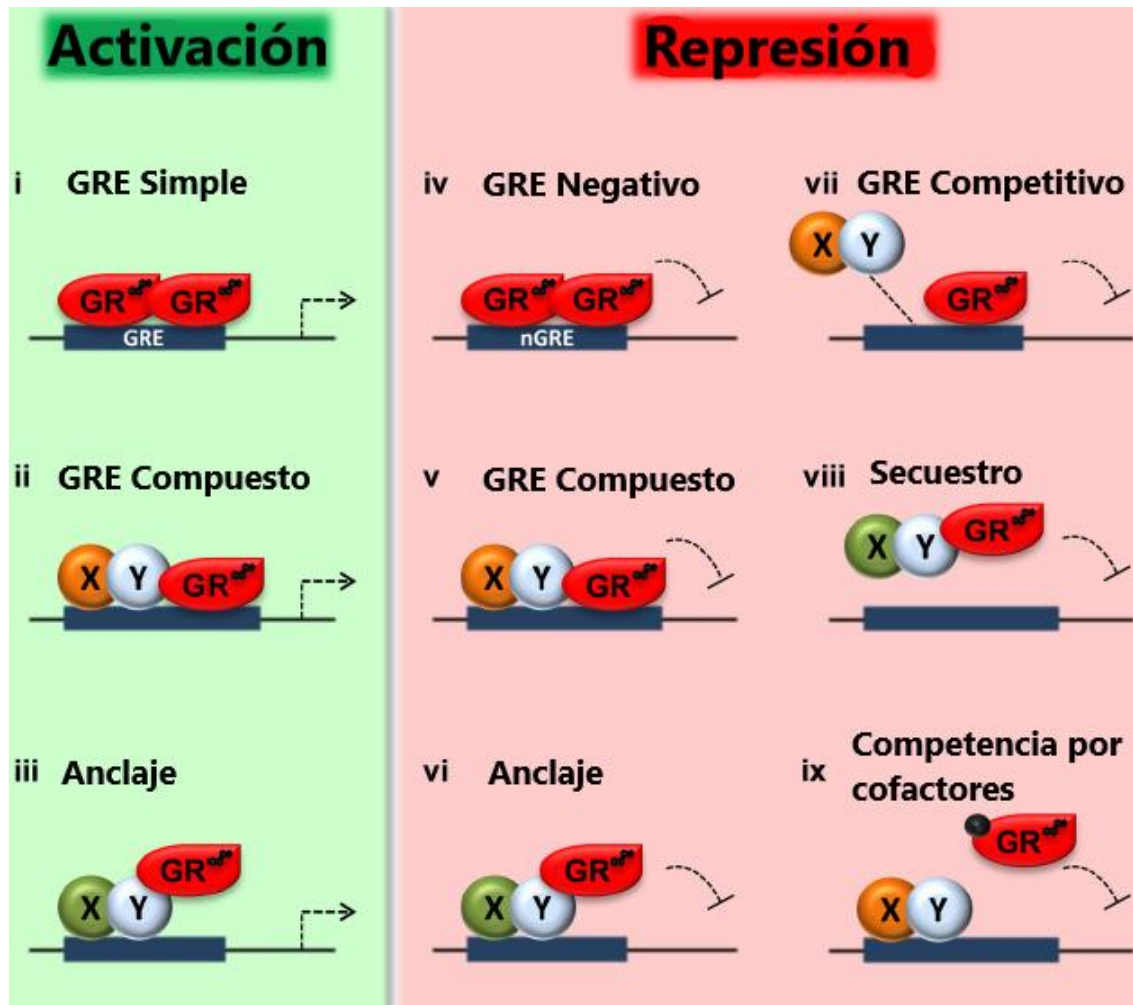


Figura I-9. Principales mecanismos de acción del GR. Una vez que el GR transloca al núcleo puede activar (panel verde) por unión directa del GR al GRE (i), en concordancia con otros TF (ii) o indirecta anclándose con otros TF (iii). Mientras que represión (panel rojo) puede ocurrir por mecanismos similares a los mencionados en la activación (iv, v y vi) o por unión de GR a GRE competitivo con otros TF (vii), secuestrando TF (viii) y competencia por cofactores (ix). Los otros TF involucrados en la acción del GR están representados como X e Y. Adaptado de Vandevyver et al, 2013.

Por otro lado, el GR puede regular negativamente la expresión génica, ya sea mediante el reclutamiento de co-represores (Fig. I-9v) o previniendo la unión de otro TF necesario para la inducción de la transcripción (Fig. I-9vii) (Schoneveld

et al, 2004). También se han descrito elementos de respuesta negativa específicos denominadas nGRE (*negative GRE*) (*Schaaf and Cidlowski, 2002*). El modo de acción consiste en el reconocimiento y unión del GR a estas secuencias, promoviendo así la represión de la transcripción (**Fig. I-9iv**). Sin embargo, hasta el día de la fecha no se han encontrado una secuencia consenso conservada para los nGRE (*Schaaf and Cidlowski, 2002*).

3.4.1.2. GR como modulador de la actividad transcripcional de otros factores de transcripción

El GR es también capaz de regular de manera indirecta la expresión génica, es decir, modulando la actividad de otros TF sin la necesidad de unirse de manera directa a las secuencias GRE o nGRE (**Fig. I-9iii, vi, viii y ix**).

El GR regula la actividad de NFκB, AP-1, PU.1, Smad3,4, T-bet, Oct 1/2, STAT6, STAT5, IRF3, COUP-TFII, NGFIB/NuR77, CREB, entre otros (*De Bosscher et al, 2009; Kaseel and Herrlich, 2007*). Esta regulación puede ser positiva (por ejemplo, STAT5) o negativa (por ejemplo, NFκB), y depende tanto del contexto como el tipo celular (*Kaseel and Herrlich, 2007*).

Se han postulado distintos mecanismos para explicar la acción moduladora del GR. Una de ellas mediante un mecanismo de anclaje a los otros TF, donde el receptor actuaría como un co-regulador, promoviendo (**Fig. I-8iii**) o inhibiendo (**Fig. I-8vi**) la expresión de genes (*De Bosscher et al, 2006; Beck et al 2009*). Algunos autores proponen distintos tipos de interacción entre el GR y los demás TF, por ejemplo, a través del DBD o de manera indirecta, a través de una tercera proteína (*Kaseel and Herrlich, 2007*). Esto último se propuso para el *cross-talk* del GR con los factores AP-1 y NFκB, donde la proteína Trip6 sería un componente esencial (*Van der Laan and Meijer, 2008*). En los casos donde la regulación es positiva, el GR actúa promoviendo la actividad transcripcional del TF con el que interactúa (*Kaseel and Herrlich, 2007*). Este es el ejemplo del factor STAT5, donde el GR

aumenta su actividad transcripcional en forma dependiente de su dominio de activación AF-2 (*De Martino et al, 2004*).

Por otro lado, los mecanismos que se han observado cuando el GR actúa como modulador negativo, son mucho más complejos y variables. Inicialmente se ha postulado que el GR secuestraría al TF, impidiendo así la unión de éste a sus sitios específicos presentes en el ADN (*Kaseel and Herrlich, 2007*) (**Fig. I-8viii**). Sin embargo, varios autores proponen también que el GR inhibiría el reclutamiento de co-activadores (*Ogawa et al, 2005*).

La misma competencia por cofactores, que se encuentran en concentraciones limitantes en la célula, puede ser responsable de los efectos represores del GR sobre AP-1 y NFκB (*Kamei et al, 1996; Sheppard et al, 1998*) (**Fig. I-8ix**). Por otra parte, la unión del GR a HREs que se solapan con las secuencias de unión de otros factores de transcripción puede dar origen a un HRE competitivo, de manera que la unión del GR impide la unión de éstos otros y reprime la expresión génica (**Fig. I-8vii**) (*Meyer et al, 1997; Sundahl et al, 2015*).

Teniendo en cuenta lo mencionado hasta el momento, es probable que no exista un mecanismo único donde el GR modifique la actividad de otros TF, sino una combinación de uno o varios de ellos.

3.4.1.3. Influencia de cofactores de transcripción sobre la actividad del GR

El nivel de expresión y de actividad de un dado co-regulador depende del tipo de tejido y del contexto celular, constituyendo así para el GR un mecanismo de control espacial y temporal de su actividad (*Lonard and O`Malley, 2007; Smith and O`Malley, 2004*).

Existen varias familias de co-activadores que interactúan directamente con el GR. Algunos, a través del dominio AF-1, como BRG1 (SWI/SNF), o P/CAF (ADA/SAGA), mientras que otros lo hacen con el dominio AF-2, como los miembros de la familia p160. Esta familia contiene tres miembros, SRC-1/NCoA-1, GRIP1

(TIF2, NCoA-2) y p/CIP (RAC3, AIB1, ACTR, TRAM1, NCoA-3) (*McKenna et al, 1999; Glass and Rosenfeld, 2000*), que -como se mencionó anteriormente- poseen motivos LxxLL repetidos, adecuados para la unión al dominio AF-2 del receptor (*Jenkins et al, 2001; Smith and O'Malley, 2004*).

En cuanto a los co-represores podemos encontrar que NCoR y SMRT son los relevantes en el mecanismo de acción del GR. Pueden interactuar con el dominio AF-2 del receptor, compitiendo con co-activadores de la familia p160 (*Nagy et al, 1999*). Su función como represores parecería residir en su capacidad de reclutar histonas deacetilasas como HDAC3 (*Ishizuka and Lazar, 2005*). De hecho, la función deacetilasa de estas enzimas requiere la interacción con estos co-represores (*You et al, 2013*). NCoR y SMRT pueden formar complejos de represión diversos, según el contexto celular (*Mottis et al, 2013*). Se los ha encontrado asociados, por ejemplo, a componentes de la maquinaria basal de transcripción (*Muscat et al, 1998*).

3.5. Modelo disociado de acción del GR

Hasta hace unos años se utilizaba un modelo para explicar cómo el GR regula la expresión génica que resultó ser extremadamente simplificado. Este modelo conocido como “modelo disociado”, establece la existencia de dos mecanismos principales de acción del GR. Un mecanismo directo, o históricamente denominado proceso de *transactivación*, que comprende la inducción de la expresión génica como producto de la unión de homodímeros de GR a sitios GRE presentes en los genes *blanco* y; un mecanismo indirecto, denominado *transrepresión*, en el que el receptor unido al ligando, como monómero, inhibe la expresión de genes activados por otros TF, como NFκB o AP-1 (*Clark, 2007*).

El modelo disociado se ha desarrollado a partir de los resultados obtenidos durante la caracterización de la mutante A458T del GR humano (A477T en rata y A465T en ratón) (*Beck et al, 2011*), conocido como GRdim (*Reichardt et al, 1998*). Primeramente, se describió que esta mutante es incapaz de trans-activar la

expresión de genes regulados por secuencias GRE debido a su incapacidad de homodimerizar y de unirse al ADN (Heck et al, 1994). No obstante, conservaría su capacidad de trans-reprimir la expresión de genes regulados por AP-1 y NFκB a través de interacciones con estos TF (Heck et al, 1994). Acorde a estos resultados, se observó en ratones mutantes *knock-in* GR^{dim/dim} que la inducción de genes involucrados en procesos metabólicos se encontraba inhibida, mientras que los efectos inmunomodulares de los GC se conservaban (Reichardt et al, 1998; Reichardt et al, 2001). Como consecuencia, desde un punto de vista farmacológico/clínico, se aceptó que los genes regulados por el mecanismo de transactivación estarían asociados a los efectos metabólicos de los GC (clínicamente considerados efectos adversos o indeseables), mientras que los genes regulados por transrepresión se asociaban a efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores (efectos benéficos) (Clark, 2007). Es por ello que se estableció la idea de que, si una mutación puntual es capaz de producir un cambio en la conformación del receptor que lo hace discriminar entre los mecanismos de transrepresión y transactivación, es posible que existan ligandos que también ejerzan ese efecto dissociado (Clark and Belvisi, 2012). Bajo este supuesto, surgió el concepto de ligandos GC dissociados: un GC capaz de activar la transrepresión pero no la transactivación del GR. Este ligando mantendría así los efectos antiinflamatorios benéficos, pero idealmente no sería capaz de inducir los efectos adversos, siendo, desde el punto de vista farmacológico, el GC ideal (Rosen and Miner, 2005).

Sin embargo, actualmente se ha acumulado un gran número de evidencias que demuestran que el mecanismo de acción del GR es mucho más complejo que el descrito por el modelo dissociado. Por ejemplo, el mecanismo de transactivación también sería requerido para que ciertos efectos anti-inflamatorios de los GC tengan lugar (Vandevyver et al, 2013; Hubner et al, 2015), y del mismo modo, el mecanismo de transrepresión también puede estar involucrado en la inducción de ciertos efectos adversos (Schacke et al, 2002).

Por otro lado, trabajos posteriores han demostrado que en determinado contexto celular y para ciertas regiones GREs presentes en genes blanco del receptor, el GRdim es capaz de inducir la expresión génica. Cuestionando así la imposibilidad del GRdim a unirse al ADN y de trans-activar (Rogatsky *et al*, 2003; Meijsing *et al*, 2009; Watson *et al*, 2013). Asimismo, varios grupos de investigación, incluido el nuestro, han comprobado que el GRdim forma homodímeros en los núcleos de células vivas, al igual que el receptor salvaje (Jewell *et al*, 2012; Presman *et al*, 2014).

Considerando que GRdim forma dímeros y que no hay correlación directa entre el estado de oligomerización y la función transcripcional del receptor (Presman *et al*, 2014), los resultados obtenidos durante la caracterización de este mutante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, están siendo actualmente, reinterpretados. La capacidad disminuida de GRdim de inducir la expresión de ciertos genes puede deberse a otras razones, por ejemplo, un menor tiempo de interacción en sus sitios blanco en el ADN (Gebhardt *et al*, 2013) o a una interacción defectuosa con ciertos co-foactores (Watson *et al*, 2013). En este sentido, se demostró que la mutación dim altera el efecto alostérico que ejerce el ADN sobre el GR (Watson *et al*, 2013) al modificarse la conformación del *lever arm* que conecta a los dos dedos de Zn⁺⁺ (Álvarez *et al*, 2017).

Inicialmente se describió en el GR una interfaz de dimerización en el DBD, en el bucle denominado *D-loop* (Dahlman-Wright *et al*, 1991). Tal como se explicó anteriormente, el mutante GRdim presenta una mutación en esta región, y el estudio de su acción biológica significó el principal soporte del modelo dissociado de acción del GR (Reichardt *et al*, 1998). Sin embargo, la descripción de otras dos regiones de dimerización en el LBD (Bledsoe *et al*, 2002) permitió demostrar que las dos moléculas de GR pueden interactuar directamente mediante múltiples interfaces. Una sustitución aminoacídica I634A en el GR de ratón (I628A en humano) interfiere en la interfaz de dimerización presente en la lámina β_A del LBD, provocando una disminución de la dimerización del receptor *in vitro* (Bledsoe *et al*, 2002) e *in vivo* (Presman *et al*, 2014).

Un trabajo de nuestro grupo, ha confirmado que el doble mutante GR^{A465T/I634A} (GRmon), que porta la mutación *dim* en el DBD y la mutación en la interfaz de dimerización presente en la lámina β_A del LBD, no dimeriza (Presman et al, 2014). La variante monomérica GRmon es capaz de trans-reprimir pero tiene comprometida su capacidad de unirse directamente a sitios GREs (Presman et al, 2014). El GRmon es reclutado preferencialmente a ciertos sitios “pre-programados” de la cromatina, es decir, sitios que se encuentran accesibles antes del tratamiento hormonal (Presman et al, 2014).

Recientemente, también se demostró que la unión a sitios GREs induce la tetramerización del GR (Presman et al, 2016), si bien la mayoría de las moléculas de GR no unidas al ADN en el núcleo se encuentra en estado dimérico (Presman et al, 2014). Este grado de oligomerización mayor se produciría por un cambio conformacional alósterico generado por la unión al ADN, que permitiría la unión de dos dímeros de GR e involucraría al LBD a través de una interfaz diferente a las descritas como regiones de dimerización (Presman et al, 2016).

3.6. Ligandos sintéticos del GR

Existe una gran diversidad de ligandos sintéticos del GR con diferentes características funcionales. En este trabajo de Tesis, se utilizó la dexametasona (DEX) como ligando sintético (**Fig. I-10**).

DEX es uno de los GC sintéticos más utilizados en la clínica. Se caracteriza por presentar potencia y eficacia elevadas y una alta afinidad y selectividad por el GR (Derendorf et al, 1993). Su biodisponibilidad es también elevada y, junto con una lenta metabolización, determina una persistencia por más tiempo en plasma sanguíneo en comparación a los GC endógenos (Derendorf et al, 1993; Coutinho and Chapman, 2011). Además de su uso clínico, se utiliza ampliamente en ensayos *in vivo* e *in vitro* para estudiar el mecanismo de acción del GR y la respuesta biológica resultante (Coutinho and Chapman, 2011).

Debido a sus excelentes propiedades, DEX es utilizado como un agonista completo del GR, capaz de promover todas las funciones del receptor. Por estos motivos, DEX es un fuerte inmunosupresor y anti-inflamatorio, aunque su uso crónico produce severos efectos adversos típicos de los tratamientos prolongados con GC (*Hardman et al, 2000*).

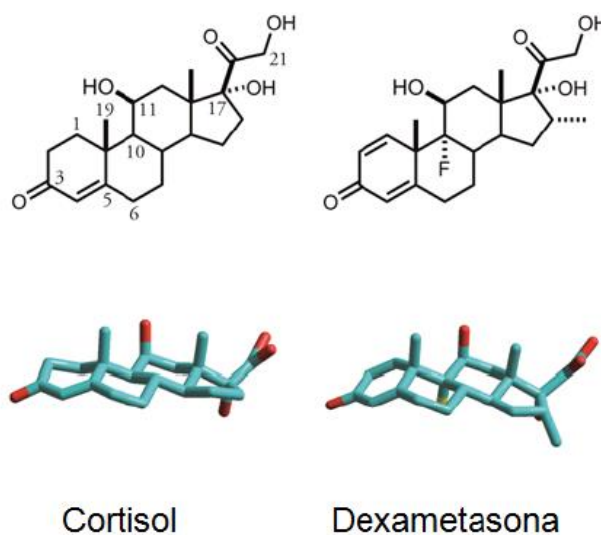


Figura I-10. Estructura del ligando Dexametasona. Estructura del cortisol (ligando endógeno humano) y de la dexametasona (agonista completo). Adaptado de Álvarez, 2009.

4. GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria es una glándula exocrina de origen ectodérmico que sufre modificaciones en su estructura y función principalmente en el periodo posnatal (*Williams and Daniel, 1983; Silberstein and Daniel, 1987*). Un gran número de estímulos hormonales participa a lo largo del desarrollo de la mama (*Briskin and Malley, 2010; Briskin and Ataca, 2015*).

Durante la embriogénesis tardía se desarrolla un sistema ductal rudimentario, que recién en la pubertad y durante la preñez, bajo el control de las hormonas endocrinas específicas, se convierte en un órgano altamente ramificado que en la lactancia secreta grandes cantidades de leche para garantizar la supervivencia de los neonatos (*Smith and Medina, 1988*).

Cada uno de estos eventos requiere de la acción de hormonas sistémicas y factores de crecimiento y de diferenciación locales que actúan tanto en los componentes del estroma como del epitelio de la glándula mamaria. Sin embargo, se pueden distinguir 2 fases principales en el desarrollo de la glándula: una independiente de la acción de hormonas y otra dependiente de las mismas (*Briskin and Malley, 2010*).

La primera fase se extiende desde el desarrollo intrauterino hasta la pubertad. A pesar de que este tejido rudimentario ya expresa receptores hormonales, e incluso los mismos han sido expuestos a altos niveles hormonales maternos y placentarios, la mama se desarrolla de manera independiente de estos estímulos (*Stumpf et al. 1980; Hovey et al. 2001; Grimm et al. 2002*). La segunda fase ocurre después de la pubertad y se inicia con la activación del eje endocrino hipotálamo-hipófisis-ovárico (*Briskin, 2002; Briskin and Malley, 2010*). Esta etapa progresa y se mantiene por la combinación de diferentes hormonas que controlan el sistema reproductor femenino y la glándula mamaria.

Los folículos ováricos inician la secreción de estrógenos, principalmente el estradiol. Estos últimos junto con la hormona de crecimiento (HG) secretada por la hipófisis, determinan el crecimiento de los brotes epiteliales y la maduración de la glándula mamaria. Los altos niveles de estradiol permiten establecer el escenario

(expresión del PR) para la acción de la progesterona (*Lyons, 1958; Propper et al, 2013; Lombardi et al, 2014*). Esta hormona favorece la ramificación lateral de los ductos e induce el desarrollo de los acinos o alvéolos (alveologénesis). En la preñez, la progesterona, junto con otros factores, promueve la proliferación de las células del epitelio mamario, expandiendo los ductos y lobulillos hasta el borde de las almohadillas de grasa. Asimismo, los altos niveles de progesterona durante la preñez y hasta el momento del parto inhiben la producción de leche (*Graham and Clarke, 1997; Frasor and Gibori, 2003*).

Tanto en los subsecuentes ciclos ováricos, así como en la preñez, otras hormonas intervienen en el desarrollo de la mama. Una de ellas es la prolactina que también participa en la alveologénesis y la diferenciación de las MECs. Además, la prolactina juega un papel relevante durante la lactancia, promoviendo la síntesis de proteínas de la leche y de lactoalbúmina, así como la producción y secreción de lactosa (*Briskin et al, 1999; Naylor et al, 2003; Bachelot and Binart, 2007*).

Otras hormonas como los glucocorticoides, también se requieren a lo largo del desarrollo de la mama. Los mismos están asociados a la fase de lactancia y a la síntesis de las proteínas de la leche, manteniendo el estadio de diferenciación del epitelio mamario (*Groner et al, 1994; Goya et al, 1993; Wintermantel et al, 2005*) (**Fig. I-11**).

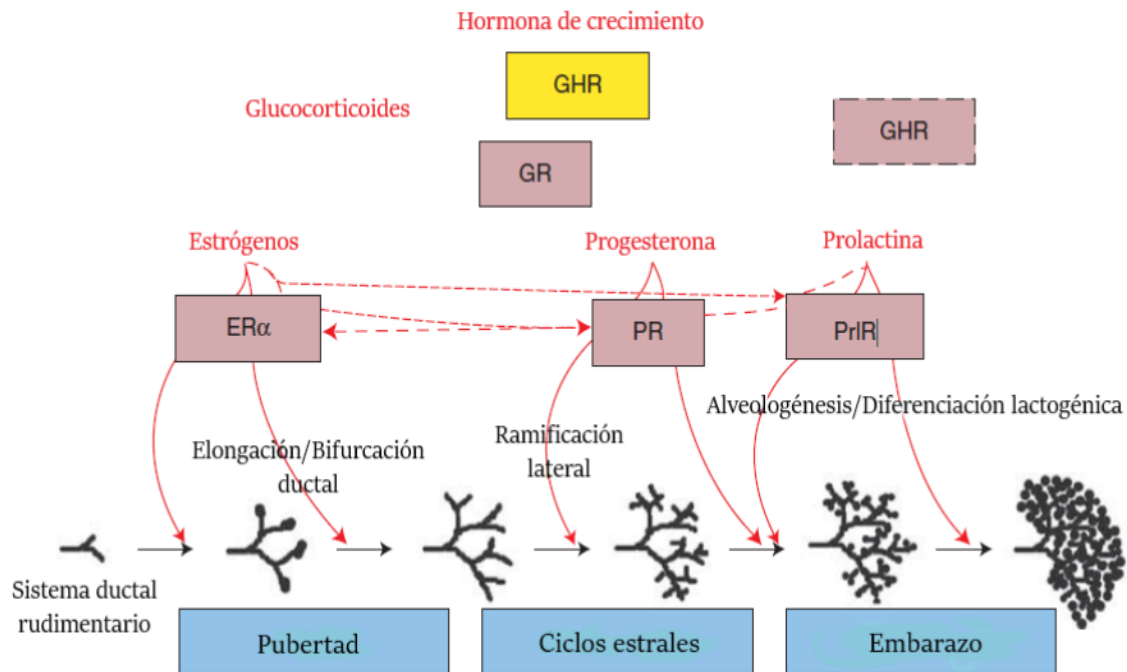


Figura I-11. Control del desarrollo de la glándula mamaria por hormonas. Todos los receptores hormonales se requieren en el epitelio mamario (cajas rosas). El GHR se requiere tanto en el estroma (caja amarilla) como en el epitelio de la glándula (caja rosa punteada). Las flechas de líneas continuas indican en qué momento diferentes hormonas son limitantes en cada etapa del desarrollo de la mama. Mientras que las flechas de líneas punteadas muestran la regulación hormonal entre los diferentes receptores que participan. Tanto los glucocorticoides como la hormona de crecimiento son requeridos durante todo el desarrollo de la glándula mamaria. Adaptado de Briskin and Malley, 2015.

4.1. Cáncer de mama

Se estima que cada año se diagnostican alrededor de 1.6 millones de casos de cáncer de mama en todo el mundo, lo que lo convierte en el cáncer más común en las mujeres en la actualidad, y su incidencia va en aumento (*Ferlay et al, 2012*). No obstante, en las últimas décadas los tratamientos contra el cáncer de mama han mejorado provocando una reducción de la mortalidad en las regiones más desarrolladas, pero sigue siendo una de las principales causas de muerte.

En Argentina, según las estimaciones de incidencia del Observatorio Global de Cáncer de la OMS, el cáncer de mama tiene una ocurrencia de 21.000 casos cada año, convirtiéndolo como el tipo de cáncer con mayor incidencia en la

población femenina (73 casos por cada 100.000 mujeres). Es decir, representa el 17% de todos los tumores malignos y casi un tercio de los cánceres femeninos (fuente: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer>).

Desde el punto de vista histológico, los tipos de cáncer de mama descriptos con mayor frecuencia son, en primer lugar, el carcinoma ductal invasivo no especificado (aproximadamente el 75% de los casos), y en segundo lugar, el carcinoma lobular invasivo (aproximadamente 10% de los casos) (Polyak, 2007). En conjunto, estas dos categorías y combinaciones de los mismos constituyen la gran mayoría (aproximadamente el 90%) de los cánceres de mama, mientras que el resto se clasifican como medular, neuroendócrino, tubular, apocrino, metaplásico, mucinoso (A y B), inflamatorio, comedones, adenoides quístico, y los tipos micropapilares (Li et al., 2005; Weigelt et al., 2010).

Al ser una enfermedad heterogénea y compleja, el cáncer de mama posee múltiples factores de riesgo y muchos de ellos se encuentran aún en debate (Almeida Chuffa et al, 2016). Uno de los principales factores son las influencias de las hormonas esteroides, así como los perfiles de expresión de los SRs, ya que los mismos son de gran importancia a la hora del diagnóstico, pronóstico y terapias para tratar esta patología. Tal es así que cada vez tiene más relevancia comprender el equilibrio hormona/receptor en las células tumorales, ya que más del 30% de los pacientes muestran resistencia a las terapias endocrinas (Althuis et al, 2004; Almeida Chuffa et al, 2016).

Los principales SRs que se expresan en las células tumorales son ER y PR, siendo el primero de ellos el más estudiado y con más relevancia en el proceso de proliferación celular. No obstante, otros receptores que también participan en la progresión tumoral son: GPER, el ER acoplado a la proteína G (GPR30) (Jacenik et al, 2016), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Zhang et al, 2010) y receptor epidérmico humano (HER2) (Shi et al, 2009). En este contexto, la estratificación histológica de los cánceres de mama está basada principalmente en la expresión del ER, PR y HER2. La combinación de estos marcadores permite la asignación de casos individuales a las siguientes categorías: luminales A

(ER+/PR+/HER2-), lumbinales B o triples positivas (ER+/PR+/HER2+), HER2+ (ER-/PR-/HER2+) y triples negativos (ER-/PR-/HER2-) (*Perou et al, 2000; Yeo and Guan, 2017*). No obstante, mediante el avance en el análisis genómico/transcriptómico de los cánceres de mama, se ha logrado poder ampliar aún más las características y el conocimiento de cada una de estas clasificaciones (*Curtis et al, 2012; Yeo and Guan, 2017*). Respecto al pronóstico, los tumores ER+ exhiben el mejor resultado global. Tras el advenimiento de nuevas terapias, los tumores HER2+, que previamente eran asociados con un mal pronóstico, ahora exhiben un resultado global mejorado (*Slamon et al., 2001; Smith et al., 2007*). Los tumores triple negativos, por otro lado, están vinculados al peor pronóstico entre los subtipos (*Nishimura and Arima, 2008*), mientras que en los casos de triple positivos el pronóstico depende del grado histológico del tumor (*Parise et al., 2010; Parise and Caggiano, 2014*).

Sin embargo, a pesar del uso cada vez mayor del tratamiento antihormonal en las terapias adyuvantes, un número considerable de pacientes aún desarrollan recurrencia del cáncer de mama (*Almeida Chuffa et al, 2016*). Es por ello que se refuerza la necesidad de mejorar la comprensión del diálogo cruzado que se establece entre las hormonas esteroideas, sus receptores correspondientes, así como el resto de las proteínas implicadas, para que consecuentemente perfeccionar la especificidad de los fármacos.

4.1.1. El GR y el PR en un contexto tumoral mamario

Como se ha mencionado anteriormente el ER es el receptor esteroideo más estudiado en los tumores mamarios (*Allred et al, 2010; Yue et al, 2013*). Dos de cada tres casos de cáncer de mama son ER+, por lo que es el principal objetivo farmacológico en el tratamiento hormonal (*Allred et al, 2010; Burstein et al, 2014; Holst, 2016*). Sin embargo, cada vez hay más evidencia que respalda la existencia de una asociación entre los diferentes miembros de la familia de receptores de esteroideos.

En el epitelio tumoral también podemos encontrar PR y GR, sin embargo, la co-expresión de los mismos en este tipo de tejido es muy variada. La asociación entre la activación de PR y la incidencia y desarrollo de tumores de mama es bien conocida (*Horwitz, 1992*). En los tumores ER+/PR+, el aumento de los niveles circulantes de progestágenos y estrógenos, así como la sobreexpresión de sus respectivos receptores conduce a un aumento en la proliferación celular (*Lange et al, 2008; Carroll et al 2017*). No obstante, la presencia de PR en las células tumorales regula la interacción cromatina-ER y genera consecuencias a nivel transcripcional, lo que tiene un gran impacto a la hora de decidir el tipo de tratamiento hormonal incluso en aquellos pacientes con tumores recurrentes (*Blows et al, 2010; Mohammed et al, 2015*). Es por ello que los tumores ER+/PR+ responden mejor al tratamiento con tamoxifeno que aquellos que no expresan PR (*Mabuchi et al, 2004; Rosano et al, 2005*).

Por otro lado, se comprende poco sobre el papel que juega el GR en los tumores de mama. El GR se expresa en menor grado y globalmente sus niveles difieren en los diferentes tipos de tumores independientemente del grado de expresión de PR o del ER (*Courtin et al, 2012*). Algunos estudios sugieren que actuaría como supresor de la proliferación en células tumorales mamarias (*Goya et al, 1993; Hoijman, et al, 2012*) y/o muerte celular desencadenada por quimioterápicos (*Amsterdam, 2002; Orqueda et al. al, 2014*), ya que inducen la expresión de inhibidores del ciclo celular (*Hoijman et al, 2012*) y de la transición mesenquima-epitelial (*Voutsadakis, 2016*). No obstante, se ha estudiado el diálogo cruzado entre el GR y el ER (*Karmakar et al, 2013; Miranda et al, 2013; Mohammed et al, 2015; Hegde et al, 2016; West et al, 2016*), así como los efectos antagonistas de los GC en tumores uterinos o mamario ER+/GR+ (*Zhou et al, 1989; Bolt et al, 2013*).

Por otro lado, se tiene poco conocimiento sobre la influencia que el GR tiene sobre la actividad del PR en células tumorales PR+. A nivel transcripcional en un contexto tumoral, el PR ha sido muy estudiado. A partir de ensayos de ChIP-seq

llevados a cabo en células tumorales mamarias humanas T47D tratadas con R5020 se identificaron 28474 sitios intragénicos de unión a PR (*Ballaré et al, 2013*). Asimismo, nuestro laboratorio ha podido determinar que el PR una vez activo, se une a sitios intragénicos que posee el gen *bcl-x*. La unión del PR al ADN conlleva al reclutamiento de otras proteínas como histonas acetiltransferasa (CBP y GCN5), lo que conduce a la acetilación de las histonas H3 y H4 y en consecuencia la unión del complejo SWI/SNF. Asociado a ello se detectó también que el PR media el reclutamiento del factor de elongación pTEFb, favoreciendo así la actividad de elongación de la ARN polimerasa II (*Bertucci et al, 2013*).

Por lo contrario, el GR ha sido poco analizado transcripcionalmente en un contexto de cáncer de mama. Una publicación del grupo de Miranda y colaboradores demostró que el GR modularía el acceso del ER a sitios específicos mediante la reorganización de la estructura de cromatina en dichos sitios (*Miranda et al, 2013*). Por otro lado, análisis de ChIP-seq llevados a cabo en células epiteliales basales pulmonares humanas derivadas de adenocarcinoma alveolar A549, mostraron que el GR también se une a sitios localizados en regiones del genoma situadas a grandes distancias de los sitios de iniciación de la transcripción de sus genes blancos incluyendo regiones intragénicas (*So et al, 2007*).

No obstante, hasta la fecha se han realizado pocos estudios donde se comparan las respuestas del PR y del GR en un mismo sistema (*Wan and Nordeen, 2002; Nordeen et al, 1989; Shao et al, 2006; Vegeto et al, 1993*), teniendo en cuenta que los ambos receptores comparten la misma secuencia consenso de reconocimiento en el genoma. En ese sentido, un análisis de microarreglos de ADN en la línea T47D/A1-2 (derivadas de las T47Dwt), que expresa cantidades similares de ambos receptores, reveló que las dos hormonas regulan de manera diferencial diferentes grupos de genes (*Wan and Nordeen, 2002*). Por otro lado, en colaboración con el grupo de Guillermo Vicent (IBMB, Barcelona, España), nuestro grupo ha identificado patrones de expresión génica en células T47D/A1-2, para ambos receptores activados con sus respectivos ligandos de manera independiente. Mediante ChIP-seq y DNase-seq, integramos los sitios de unión

para GR y PR con perfiles de cromatina abiertos y encontramos características diferenciales para estos receptores hormonales, particularmente en la unión al ADN (Ogara *et al*, 2019). Se lograron identificar 28563 sitios de unión al PR y unos 10640 para el GR. Una fracción importante de sitios de unión del GR activado por DEX (un >88%) mapea en regiones que también une al PR estimulado por su correspondiente ligando. Aproximadamente un tercio de las regiones que unen al PR (un >32%) también unen al GR activado. Por análisis de motivos se pudieron determinar 3 categoría de grupos de genes: los GR exclusivos, los PR exclusivos y los sitios compartidos por ambos receptores (Ogara *et al*, 2019).

A la vista de lo expuesto en esta introducción, el objetivo principal de esta tesis es determinar si PR y GR activados tienen la capacidad de formar parte de un mismo complejo en células vivas y de modular conjuntamente la expresión de sus genes blancos.

5. OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes presentados en los 4 capítulos de la Introducción, hipotetizamos la existencia de actividad modulada sobre la expresión de genes específicos compartidos por ambos receptores. Dicha modulación podría deberse a la influencia del contexto cromatínico cuando ambos receptores se encuentran activos o por medio de la interacción entre los receptores PR y GR a través de la formación de un mismo complejo.

En base a esta hipótesis de trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

General

Determinar si PR y GR activados podrían modular de manera conjunta genes blancos disparando en consecuencia, cambios en el destino celular, hacia la proliferación o diferenciación de células tumorales mamarias.

Específicos

1. Evaluar y analizar bajo cada condición, marcadores específicos involucrados en los procesos de proliferación y diferenciación celular en modelos biológicos que expresan ambos receptores.
2. Analizar e identificar genes cuya expresión estarían moduladas por PR y GR en respuesta a glucocorticoides y progestágenos de forma separada y conjunta en células que expresan ambos receptores.
3. Analizar la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo en células vivas, evaluando las diferencias y similitudes funcionales entre los complejos que sólo contienen PR o GR y los que contienen ambos receptores.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivos utilizados

6.1.1. Agonistas y antagonistas del GR

La dexametasona (DEX) (Cat. D4902), el β -estradiol (Cat. E8875) y el R5020 (Cat. P0130) fueron adquiridos en Sigma (St Louis, MO, USA). Estas sustancias se disolvieron en etanol absoluto (Merck) y para todos los ensayos se prepararon soluciones 1000X que fueron almacenadas a -20°C.

6.1.2. Medios de cultivo

El medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Cat. 12800017), DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Cat. 11330057), el antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomicina (Cat. 25200-072) y la tripsina (Cat. A40009) fueron adquiridos en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El suero fetal bovino (SFB) (Internegocios S.A. (Mercedes, Argentina).

6.1.3. Suero delipidado

El SFB libre de esteroides se preparó de acuerdo con lo descrito previamente (*Lippman, et al, 1976*). Brevemente, 10 ml de una solución 10X Carbón Dextrano (2,5% p/v de carbón activado (Sigma); 0,25% dextrano (Sigma) en 0,01 M Tris-HCl, pH 7.4) se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 50 ml de suero fetal bovino y luego se incubó a 56 °C durante 30 minutos con leve agitación. Seguidamente se centrifugó y se repitió este procedimiento con un nuevo precipitado de Carbón-Dextrano. Finalmente, el suero resultante se filtró primeramente con un filtro de 0,45 μ m y luego con un filtro de 0,2 μ m.

6.2.1. Plásmidos utilizados

A lo largo de este trabajo se utilizaron los siguientes plásmidos:

✓ **pEGFP-C3**: vector de expresión de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*). Permite el clonado de una proteína quimera con EGFP en el extremo N-terminal. Posee resistencia bacteriana a kanamicina (Clontech).

✓ **pEGFP-PR**: vector de expresión del gen PR-B humano clonado en el vector pEGFP-N3 (Clontech Laboratories, Inc.) gentilmente cedido por Carol Lange, Department of Medicine and Pharmacology, University of Minnesota Masonic Cancer Center, Minneapolis, USA (Diep et al, 2013).

✓ **pmCherry-C1**: vector de expresión de la proteína fluorescente mCherry. Permite el clonado de una proteína quimera con mCherry en el extremo N-terminal. Posee resistencia bacteriana a ampicilina (TOP Gene Technologies) (*Presman et al, 2014*).

✓ **pmCherry-GR**: vector de expresión de mCherry fusionado al extremo N-terminal del GR de rata. Posee resistencia bacteriana a kanamicina. Cedido gentilmente por Gordon Hager Laboratory of Receptor Biology and Gene Expression, National Cancer Institute, NIH Bethesda, USA (*Presman et al, 2014*).

✓ **pEGFP-GR**: vector de expresión de EGFP fusionado al extremo N-terminal del GR de ratón. Posee resistencia bacteriana a kanamicina. Cedido gentilmente por Mario Galigniana (IByME-CONICET, FCEN-UBA) (*Presman et al, 2014*).

✓ **mCherry-GRdim**: vector de expresión de mCherry fusionado al extremo N-terminal del mutante GR^{A465T} de ratón, generado por mutagénesis sitio-dirigida (TOP Gene Technologies, Quebec, Canadá). Posee resistencia bacteriana a kanamicina (*Presman et al, 2014*).

✓ **pmCherry-GRLBD**: vector de expresión de mCherry fusionado al extremo N-terminal del doble mutante GR^{I634A} de ratón, generado por mutagénesis sitio-dirigida (Stony Brook University, Nueva York, Estados Unidos). Posee resistencia bacteriana a kanamicina (*Presman et al, 2014*).

6.2.2. Preparación de plásmidos a gran escala

6.2.2.1. Preparación de bacterias competentes

Bacterias de la especie *Escherichia coli*, cepa DH5 α fueron cultivadas en medio LB (10 g/l peptona; 5 g/l Extracto de levadura; 5 g/l NaCl) a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.3. A 5 ml de ese cultivo se le agregaron 100 ml de LB y se creció hasta una OD de 0.5. Posteriormente se mantuvo el cultivo durante 10 minutos a 0°C y se centrifugó por 10 minutos a 3000g a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* se resuspendió en 40 ml de TFB I: 30 mM Acetato de potasio; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15% Glicerol; pH 5.2. Se dejó en hielo por 5 minutos y se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 3000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 4 ml de TFB II: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15% Glicerol; pH 6.5. A continuación, se dejó reposar las células en hielo durante 15 minutos para luego guardarlas a -70°C en alícuotas de 200 μ l. Las bacterias se utilizaron a partir de las 48 horas de haber realizado este procedimiento.

6.2.2.2. Transformación de bacterias competentes

Con 1 μ l de cada plásmido a amplificar, se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5 α mediante *shock* térmico a 42 °C durante 90 segundos. A continuación, se incubó en medio LB líquido, sin antibiótico, a 37°C durante 30 minutos en agitación permanente. Las bacterias se plaquearon en placas de Petri, de agar-LB (LB + 15 g/L de Agar) con ampicilina (100 μ g/ml) o con kanamicina (100 μ g/ml), dependiendo del tipo de resistencia del plásmido. Las

placas fueron puestas en estufa a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se picaron algunas colonias y se realizaron minicultivos en LB conteniendo el correspondiente antibiótico a 37°C durante 16 horas, en agitación permanente.

6.2.2.3. Preparación de Plásmidos

Los minicultivos obtenidos fueron luego cultivados durante 24 horas en 400 ml de medio TB (1.33% Peptona; 2.675% extracto de lavadura; 0.4% Glicerol; 0.26% KH_2PO_4 ; 1.39% K_2HPO_4) con el correspondiente antibiótico (Ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ o Kanamicina 100 $\mu\text{g/ml}$). Se centrifugaron las bacterias 15 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las bacterias fueron resuspendidas en 10 ml de Solución I (25 mM Tris- HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8), se agitaron durante 5 minutos y se les agregó 20 ml de Solución II (0.2 M NaOH; 1% SDS). Luego se mezcló por inversión y se dejó a 0°C por 20 minutos. Posteriormente se colocaron 15 ml de Solución III (3 M Acetato de potasio; 11.5% Acético glacial pH=5.2), se mezcló por inversión por 5 minutos a 0°C, y se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm a 4°C. Al sobrenadante se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló, y dejó 20 min a -20°C. Se centrifugó 1 hora a 5000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* fue resuspendido en 3 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA), se agregó igual volumen de LiCl 5 M (frío), se mezcló y centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos en frío. Se colectó el sobrenadante, se le agregó igual volumen de isopropanol, se mezcló y centrifugó 5 min a 10000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó, el *pellet* fue resuspendido en 0.5 ml de TE y se agregó 1 μl de ARNsa A 20 mg/ml incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó igual volumen de 13% polietilenglicol (PEG) en 1.6M NaCl, se mezcló y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. El *pellet* obtenido se resuspendió en 400 ml de TE. Se realizaron extracciones con 1 volumen de fenol saturado en Tris EDTA (TE) (una vez), 1 volumen fenol (saturado en TE): cloroformo (1:1) (2 veces), y 1 volumen cloroformo (una vez). Se agregó 0.1 volumen de Acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol (ETOH) 100 %. Se dejó 20 min a -20°C. Por último, se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm, se lavó con 70 % ETOH y se resuspendió el

pellet en 200-500 µl de TE. La concentración de ADN obtenida se calculó como (μg de ADN/ μl) = $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{F dil}/1000$. La concentración de ADN se determinó utilizando el *Nanodrop 2000* (*Thermo Fisher Scientific*).

6.3. Líneas celulares

6.3.1. Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

✓ **BHK-21:** línea derivada de fibroblastos de riñón de hámster, cultivada en medio DMEM suplementado con 10% SFB y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco). Número de ATCC: ATCC® CCL10™ (*Gitschier et al. 1985*).

✓ **MCF-7:** línea celular proveniente de adenocarcinoma humano de glándula mamaria, cultivada en medio DMEM suplementado con 10% SFB y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina. Estas células son ER⁺/PR⁺/GR⁺. Número de ATCC: ATCC® HTB-22™ (*Sugarman et al. 1985*).

✓ **T47D-WT:** línea celular proveniente de una efusión pleural de un carcinoma ductal de mama, cultivada en medio DMEM suplementado con 10 % SFB y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina. Esta línea es ER⁺/PR⁺. Número de ATCC: ATCC® HTB-133™ (*Judge et al, 1983*).

✓ **T47D-Y:** línea epitelial mamaria derivada de la línea T47D-WT ER⁻/PR⁻/GR⁻. La misma fue seleccionada por medio de ensayos de dilución limitante y por citometría de flujo (*Sartorius et al, 1994*). Esta línea fue cultivada en medio DMEM suplementado con 10 % SFB y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina.

✓ **T47D-A1/2:** es una línea celular derivada de la línea T47D-WT, a la cual se le expresó en forma estable el GR de rata (*Nordeen et al, 1989*). Dichas células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % SFB y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina.

Todos los tipos celulares fueron crecidos a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 4.5 % CO₂.

6.3.2. Tratamientos en las líneas celulares

Antes de cada tratamiento, las células se incubaron en medio libre de esteroides (utilizando 10% de suero delipidado) entre 15 a 48 horas según correspondiese. Tanto la DEX como el R5020 fueron utilizados en concentraciones finales entre 10^{-6} M y 10^{-8} M, mientras que el β -estradiol a 10^{-9} M según se indica. La elección de dichas concentraciones surgió a partir de curvas concentración-respuesta, previamente realizadas en el laboratorio. Los controles se realizaron agregando sólo el vehículo (ETOH o DMSO, según corresponda) al medio de incubación. El tiempo de incubación con las distintas drogas varió dependiendo del ensayo realizado. En todos los casos, los tratamientos fueron asignados al azar a cada placa de células y cada tratamiento se realizó por duplicado o triplicado (réplicas independientes).

6.4. Estudios de respuesta celular

6.4.1. Ensayos de diferenciación, expresión de marcadores CD44 vs CD24

Para el análisis de marcadores de la superficie celular, se sembraron unas 400000 células de las líneas T47D-WT y T47D-A1/2 en placas p60 con medio DMEM sin rojo fenol con 10% de suero delipidado. Se las dejó en estas condiciones de arresto por 24 horas. Pasado ese tiempo se procedió a cambiar los medios por DMEM sin rojo fenol con los respectivos estímulos a una concentración final de 10^{-8} M y se las incubó por 18 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y luego se cosecharon con 0,05% de tripsina / 0,025% de EDTA. Seguidamente, se lavaron con una solución de PBS conteniendo 0,5% de BSA (solución de lavado). Posteriormente se resuspendieron las células en solución de lavado (10^6 células / 100 μ l). A la suspensión celular se le agregó combinaciones de anticuerpos monoclonales de BD Biosciences contra CD44 (APC; cat. # 560890) y CD24 (PE; cat. # 560991) humanos, conjugados con fluorocromo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron luego a 4° C en oscuridad por 30 min. Las

células marcadas se lavaron con solución de lavado e inmediatamente después se analizaron por citometría de flujo (*BD FACS Calibur*).

6.4.2. Ensayo de migración por “cicatrización de herida” (*Wound Healing Assay*)

Para realizar los ensayos de herida, se sembraron aproximadamente 1.5×10^6 células de la línea celular MCF-7 en placas de 6 pocillos en medio completo hasta alcanzar una monocapa confluyente (aproximadamente 24 a 48 horas). Posteriormente, se retiró el medio de cada uno de los pocillos, se lavaron las células 2 veces con PBS y se realizaron 2 heridas verticales, utilizando *tips* estériles para pipeta p20 (**Fig. MyM-1**). A continuación, se realizaron dos lavados con medio DMEM sin rojo fenol para quitar los restos celulares (desprendidos de la zona de la herida). Luego, las células se incubaron con medio DMEM sin rojo fenol libre de suero en presencia de los correspondientes estímulos hormonales. A este tiempo se lo denominó “*tiempo 0*”. Se utilizó como control negativo células sin agregado de hormonas. Finalmente, las células se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Para el análisis, se utilizó el método de cuantificación del área de la herida (*Jonkman et al, 2014*). Para ello se tomaron 3 imágenes por herida de un total de 2 heridas por pocillo (6 en total), tomando como referencia las dos líneas horizontales que lo atraviesan (**Fig. MyM-1**). Las imágenes fueron capturadas tanto a tiempo 0 como a las 24 horas, empleando una cámara fotográfica Nikon Coolpix P5100 asociada a un microscopio óptico invertido de campo claro Nikon Eclipse TS100 (Minato, Tokio, Japón). El análisis de las mismas se realizó utilizando el programa *Image-Pro Plus* (*Media Cybernetics, Inc. Rockville, MD, USA*). Brevemente, se midió el ancho del área libre de células, el cual se calcula dividiendo el área por el eje mayor. Luego, se definió “*la capacidad migratoria*” como la diferencia entre el área media no cubierta a las 0 horas y el área media no cubierta determinada a las 24 horas. Los resultados se expresaron como las veces de cambio del cerramiento de la herida a las 24 horas (T24) con respecto al control sin tratar.

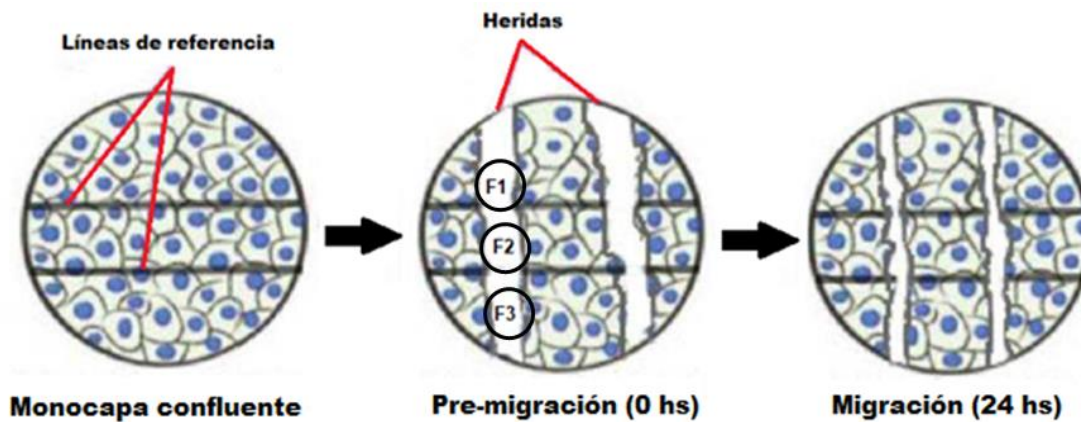


Figura MyM-1. Esquema del ensayo de migración por “cicatrización de herida”. Se indican las líneas horizontales de referencia, así como las 2 heridas realizadas por pocillo. F1, F2 y F3 corresponden a las fotos 1, 2 y 3 tomadas por cada herida, respectivamente. Se observa cómo se modifica el ancho de la herida, luego de un estímulo positivo.

6.4.3. Ensayos de clonogenicidad

Para los ensayos de clonogenicidad se sembraron aproximadamente 5000 células de la línea MCF7 en medio completo en placas de 6 pocillos, tratando que las mismas estén bien separadas unas de las otras hasta llegar a contabilizar células individuales. Las células se mantuvieron en estas condiciones por 48 hs. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron en medio por DMEM sin rojo fenol con 2% de suero delipidado más los estímulos correspondientes (todos ellos a una concentración final al $10^{-8}M$). Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 16 días, renovando el medio con los estímulos hormonales cada dos días. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se lavaron las placas con PBS 1X para posteriormente fijarlas con glutaraldeído al 1% (unos 50 a 100 μ l hasta cubrir toda el área del pocillo) durante 10 a 20 minutos. Luego, las placas fueron lavadas cuidadosamente con agua y se las colocaron de manera invertida sobre papel absorbente para remover el líquido remanente. Después se añadieron 50 μ l de solución de cristal violeta 0,5% p/v y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en una placa de agitación con una frecuencia de 20 oscilaciones por minuto. Pasado ese tiempo, las placas se lavaron con agua al menos 4 veces o hasta que el remanente de cristal violeta se haya ido. Luego, se dejaron de manera invertida sobre papel de filtro y posteriormente se dieron vuelta y se dejaron sin tapa

a temperatura ambiente al menos por 24 hs para que sequen. Transcurrido este tiempo se agregaron 200 µl de metanol, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente sobre una placa de agitación de 20 oscilaciones por minuto y posteriormente, se midió la densidad óptica de cada pocillo a 570 nm (OD570) en un lector de placas Bio-Rad (*Model 680 Microplate Reader S/N 19149*).

Se realizaron 3 experimentos independientes para cada condición. El valor de ruido de fondo se determinó midiendo un pocillo o sin células (blanco de reacción). Obtenidos los valores de absorbancia, primero se hizo un promedio de los valores de los pocillos “blanco”, luego se restó este valor con cada uno de los valores de absorbancia obtenidos bajo las diferentes condiciones. El promedio de los valores obtenidos en cada una de las condiciones fue relativizado respecto de la condición control.

6.5. Evaluación del control de la expresión génica

6.5.1. Obtención de muestras biológicas

Para el análisis de expresión de genes se utilizaron las líneas celulares T47D-WT y T47D-A1/2. Se utilizaron aproximadamente 3×10^5 células por tratamiento; las mismas fueron sembradas y mantenidas en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de SFB delipidado por 48 horas. Luego, las células fueron lavadas con PBS 1X y volvieron a incubarse por 24 horas con medio sin rojo fenol en ausencia de suero. Luego de un hambreado ON (overnight), las células se incubaron por 6 horas con R5020 y/o DEX a una concentración final de 10^{-8} M. Pasado este tiempo, las células se lavaron con PBS y se colocaron en hielo para la posterior extracción de ARN.

6.5.1.2. Ensayos de silenciamiento del GR

Para evaluar el efecto en la expresión de genes cuando se restringe la expresión el GR se transfectaron células de las líneas celulares T47D-A1/2 y T47D-WT con ARNsi contra GR. Para ello se sembraron aproximadamente 3×10^5 células y se incubaron en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% SFB delipidado por 48 horas. Pasado este tiempo, las células fueron lavadas con PBS 1X y se transfectaron con el ARNsi contra GR de *Dharmacon (ON-TARGETplus SMARTpool Rat Nr3c1 siRNA L-089504-02-0005)* utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), tal como se describe en la sección 7.1 de este capítulo. Como control negativo de la interferencia se utilizó ARNsi control con una secuencia aleatoria. Terminada la transfección, las células fueron mantenidas por 48 horas en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de SFB delipidado. Posteriormente, se reemplazó el medio por medio sin suero. Después de 24 horas, las células se incubaron con R5020 10^{-8} M o vehículo (ETOH) a 37°C durante distintos tiempos según correspondiese. El grado de silenciamiento del GR se evaluó mediante Western-Blot utilizando anti-GR (*MA1-510, Thermo Fisher Scientific*) siguiendo el protocolo que se describe en el punto 7.2.

6.5.2. Obtención de ARN total

Para obtener el ARN de las células T47D-WR y las T47D-A1/2 se utilizó el reactivo TRIZOL (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, las células se colectaron en 1 ml de Trizol y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 0.2 ml de cloroformo al extracto celular y se mezcló vigorosamente por 15 segundos. Posteriormente, se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 2-3 minutos y se centrifugaron durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo para luego precipitar el ARN. Para ello se les agregó a los extractos acuosos 0.5 ml de isopropanol. Luego, las muestras se mezclaron, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron por 15 minutos a 12000 rpm. El *pellet* resultante se lavó con 1 ml de EtOH 75 % y se centrifugó por 5 minutos a 7500 rpm a 4°C. El ARN total obtenido se resuspendió en 50 µl de agua libre de ARNsas. La

concentración de ARN obtenido se determinó mediante la cuantificación de una alícuota de cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop de Thermo Fisher. Se verificó también que la relación OD_{260}/OD_{280} comprendiese el rango 1,7 – 2, lo que indica un buen grado de pureza del ARN total obtenido.

En caso de ser necesario se controló la integridad del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa 1% p/v.

6.5.3. RT-qPCRs

6.5.3.1. Reacción de retro-transcripción

Para obtener ADNc a partir del ARN obtenido se realizaron ensayos de retro-transcripción (RT). Para esto se incubaron las muestras de ARNs por 5 minutos a 50-55°C y posteriormente se tomaron entre 1 y 1,5 µg de ARN total. A cada muestra se le agregó 25 ng/ml de oligonucleótidos al azar (*Random primers*) (Invitrogen), dNTPs 1mM (Invitrogen), transcriptasa reversa MMLV (Promega) 200 U e inhibidor de ARNsas RNasin (Promega, N2511) 40 U, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, se llevó la muestra de ARN a un volumen final de 7 µl con agua destilada libre de ARNsas y los oligonucleótidos al azar. Las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 70°C durante 5 minutos en termocicladora. Luego, para evitar la renaturalización, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se esperó hasta que las mismas se enfríen. Finalmente se agregaron 10 µl de la mezcla conteniendo el resto de los reactivos y se llevó a cabo la reacción utilizando el siguiente programa en termocicladora: 60 minutos a 37°C para que ocurra la retro-transcripción y 5 minutos a 95°C con el fin de inactivar la enzima.

6.5.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Las qPCRs en tiempo real se realizaron en los cicladores Eppendorf Mastercycler Realplex y ADN Engine Opticon (MJ Research). Las muestras de

ADNc fueron diluidas (1/5 a 1/200), según el producto a amplificar. Paralelamente a las muestras, se prepararon curvas de calibración, obtenidas por ocho diluciones seriadas 1:2 a partir de una dilución 1:4 de una mezcla de todas las muestras a determinar. De estas diluciones, se utilizaron 5 µl para la reacción de PCR, a los cuales se les agregó la mezcla de reacción conteniendo MgCl₂ 3, 4 o 5 mM (Invitrogen), dNTPs 0,25 mM (Invitrogen), Taq polimerasa (Invitrogen) 1,25 U y 1 µM de cada oligonucleótido específico de la región a amplificar. A fin de visualizar los productos formados, a cada reacción se le agregaron 0,025 µl de SYBR Green (Roche) en dilución 1/30 en DMSO y agua para llevar a volumen.

En cada PCR se evaluó la curva de *melting* para confirmar la especificidad de la amplificación y, además, la calidad de los productos amplificados fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa.

Para todas las qPCRs se utilizaron programas que comenzaron con: 2 minutos de desnaturalización a 95°C, seguidos por ciclos repetidos según se indican en la tabla I y finalizando con 5 minutos de extensión final de 72°C.

Gen	oligonucleótido	Ciclos	Mg ⁺⁺ (mM)
<i>elf5</i>	Fw: CTACCCTGCCTTTGAGCATC Rev: CTTGTACTGGTCGCAGCAGA	95°C 15" 60°C 20" 72°C 25"	4
<i>greb1</i>	Fw: CCAGAACCCGCATACACTTT Rev: CGACGGGTCACTTTGAGAAT	95°C 15" 60°C 20" 72°C 25"	4
<i>snai1</i>	Fw: AGCACACTTCCCTTTGCATT Rev: GTGTGGGGCACTGTACCTG	95°C 15" 60°C 20" 72°C 25"	4
<i>stat5a</i>	Fw: GTCCTGAAGACCCAGACCAA Rev: GTTGCGGGTGTTCTCATTTT	95°C 15" 60°C 20" 72°C 25"	4
<i>Gapdh</i>	Fw: GAGTCAACGGATTTGGTC Rev: TTGATTTTGGAGGGATCTCG	95°C 15" 58-68°C 20" 72°C 25"	4

Tabla I: Detalle de los oligonucleótidos utilizados en las distintas qPCR. Se indican secuencia, temperatura y tiempo de cada ciclo y concentraciones de Mg⁺⁺ utilizados.

Como se mencionó, para calcular la eficiencia promedio de la reacción y poder estimar la masa de molde inicial relativa en cada muestra se realizó en cada reacción una curva de calibración con diluciones al medio seriadas partiendo de una mezcla de los ADNc en estudio. Una vez calculada la masa inicial relativa en cada réplica, se promediaron las 3 réplicas (provenientes de 3 experimentos independientes) y se normalizaron con los valores obtenidos para el ADNc de la enzima GAPDH. Finalmente, los valores obtenidos fueron relativizados al tratamiento control.

6.6. Evaluación del reclutamiento de factores de transcripción en regiones específicas del ADN. Ensayo de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)

6.6.1. Obtención de muestras biológicas

Para los ensayos de ChIP, se sembraron $5 \cdot 10^6$ células T47D-WT y T47D-A1/2 en placas de 150 mm y se incubaron durante 48 hs en medio DMEM sin rojo fenol conteniendo 10% de SFB delipidado. Seguidamente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 14-16 h en medio DMEM sin rojo fenol a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 4.5 % CO₂ hasta que fueron tratadas con vehículo (ETOH) o con R5020 y/o DEX 10^{-8} M por 1 hora.

6.6.2. Crosslinking

Finalizadas las incubaciones, se retiraron las placas de células, se les quitó el medio de cultivo y se les agregó el medio de *crosslinking* (DMEM sin rojo fenol conteniendo 1 % de solución de *crosslinking*: Hepes 50 mM pH 8, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, formaldehído 11 %). Las placas selladas con Parafilm se incubaron durante 10 minutos a 37°C. El procedimiento de *crosslinking* se interrumpió luego por agregado de la Solución *Stop* (Glicina 2 M). Luego, las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se aspiró el medio y las placas se lavaron dos veces con PBS frío y se colocaron

rápida sobre hielo. A cada placa se le agregaron 2 ml PBS con inhibidores de proteasas (Cocktel PIC, Roche, cat. #11697498001). Los extractos celulares se colectaron en un tubo de 15 ml. Finalmente, los extractos se incubaron por 5 minutos en hielo, se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante.

6.6.3. Extracción de la cromatina

A cada *pellet* celular se le agregaron 2,5 ml de solución de Lisis I (Pipes 5mM pH 8, KCl 85mM, NP40 0.5%) con inhibidores de proteasas (1M β -glip, 0,2M PMSF, 0,2M OrVa y 1X PIC). Las muestras luego se incubaron por 10 minutos en hielo y se centrifugaron 5 min a 5000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y a cada *pellet* celular se le agregaron 400 μ l de solución de Lisis II (SDS 1 % p/v, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,1), incubando luego en hielo por 10 minutos, antes de sonicar.

6.6.4. Sonicación

Las muestras se sonicaron por 7 minutos (30 segundos encendido y 30 segundos de apagado) a potencia máxima a 4°C, en el sonicador de baño Bioruptor (Diagenode). Posteriormente se dejaron un mínimo de 5 horas en hielo, para favorecer la precipitación del SDS y se centrifugaron por 10 minutos a máxima velocidad a 4°C. Los sobrenadantes se pasaron a tubos limpios.

6.6.5. Evaluación de la calidad de los fragmentos de cromatina

A fin de evaluar la calidad de los fragmentos de cromatina obtenidos luego de la sonicación, se tomaron 30 μ l de cada sonificado, por duplicado (el resto guardó en hielo a 4°C) y se los llevó a un volumen de 400 μ l con Solución de Lisis II. Se agregaron 4 μ l de Proteinasa K (20 μ g/ μ l) y se los incubó por 14-18 horas a 65°C

en un bloque térmico. Posteriormente se realizó una extracción con igual volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) (Invitrogen) y se precipitó con el 10% de volumen de Acetato de sodio 5,2 pH 3M y 1ml de ETOH durante 30 minutos a -70°C. Luego de una centrifugación de 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, se lavó el *pellet* obtenido, con EtOH 70 % y se resuspendió en 30 µl de agua libre de ADNsas cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop. Para analizar el tamaño del ADN sonificado se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de Etidio.

6.6.6. Pre-clareado de la cromatina

Previo a la inmunoprecipitación se llevó a cabo el pre-clareado de la cromatina para minimizar precipitaciones inespecíficas. Para ello, para cada muestra se tomó un volumen correspondiente a 30 µg de cromatina y se completó dicho volumen hasta 1,2 ml con Solución de Inmuno-Precipitación (Solución IP) (del Kit One day ChIP, Diagenode) conteniendo inhibidores de proteasas (PIC, Roche), considerando que la cromatina quedará diluida, como mínimo, en 10 volúmenes de Solución IP.

Mientras tanto, se lavaron las bolitas de proteína A-agarosa con solución IP y se bloquearon con BSA 0,05 % en rotación a 4°C, durante 15 minutos. Luego, las bolitas se distribuyeron en tubos limpios, a los cuales se les agregaron los 1,2 ml de cromatina en solución de IP. La cromatina se pre-clareó incubándola con unos 42 µl de suspensión de bolitas de agarosa conjugada con proteína A (Proteína A, Diagenode) previamente bloqueadas con 0,05 % de seroalbúmina bovina (BSA), a 4°C en rotación durante 1 hora. Luego mediante centrifugación, los sobrenadantes se pasaron a tubos nuevos. Se tomaron 50 µl para extraer los INPUTs y 1,1 ml para realizar la IP. A cada tubo de IP se le agregaron 2.5-5 µg de anticuerpo específico, siempre utilizando un tubo control negativo al que se le agregó IgG. Los tubos conteniendo la cromatina se incubaron en rotación, a 4°C, por 14-16 horas.

6.6.7. Inmuno-Precipitación (IP)

Las muestras conteniendo cromatina preclareada y los correspondientes anticuerpos se incubaron con una 42ul suspensión de bolitas de agarosa conjugada con proteína A (Proteína A, Diagenode) previamente bloqueadas con 0,05 % de seroalbúmina bovina (BSA), en rotación a 4°C por 3 h. Luego de centrifugar, el *pellet* se lavó 4 veces con solución IP y una con TE.

6.6.7.1. Anticuerpos utilizados

- ✓ **Anti-PR:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-7208, H190)
- ✓ **Anti-GR:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-1002, P-20)
- ✓ **Anti-GR:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-1004, M-20)
- ✓ **Anti-p300:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology C-20)
- ✓ **Anti-p300:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology N-15)
- ✓ **Anti-BRG1:** monoclonal de conejo (Abcam, ab110641)
- ✓ **Anti-FOXA1:** monoclonal de conejo (Abcam, ab5089)
- ✓ **IgG:** Diagenode, kch-504-250

6.6.8. Elución

Seguidamente se procedió a la elución de la cromatina precipitada junto con el anticuerpo unido y las bolitas de agarosa conjugada con proteína A. A cada tubo se le agregó 500 µl de solución de elución (SDS 1 % p/v, NaHCO₃ 0.1 M) y se rotaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se centrifugaron las muestras y se pasaron los sobrenadantes a tubos limpios.

6.6.9. Decrosslinking

Se tomaron los INPUTs y se los llevó a 500 µl con solución de elución. Se agregaron, a todos los tubos (INPUTs e IPs), NaCl 20µl 5 M y se procedió al *decrosslinking*. Para ello las muestras se incubaron durante 14-18 horas 65°C. Luego a fin de degradar las proteínas, se agregó 10 µl de EDTA 500 mM, 20 µl de Tris 1 M pH=6,5 y 3 µl de Proteinasa K 20 mg/ml y las muestras se incubaron por 1 hora a 45°C.

6.6.10. Extracción del ADN

Para extraer los ADNs se utilizó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La fase acuosa extraída se precipitó 0.1 volúmenes de acetato de amonio 5 M y 1 volumen de EtOH 100 %. Para facilitar la precipitación se agregó 1 µl de solución de glucógeno (20 µg/µl) a cada muestra y se las incubó, durante 30 minutos a -70°C. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos y los *pellets* obtenidos se lavaron con EtOH 70%. Luego, el ADN inmunoprecipitado se resuspendió en 20 µl y los INPUTs (ADN total) en 50 µl de agua libre de ADNasas.

6.6.10.1. qPCR

Se cuantificó una totalidad de 2 µl de los INPUTs e IPs para realizar las qPCR. Se detallan en la Tabla II los programas y oligonucleótidos utilizados.

Gen	oligonucleótidos	Ciclos	Mg ⁺⁺ (mM)
elf5	Fw: GGATCTGCCCAGCAACTCTA Rev: CCTTTAGCACTCAGCCTGGA	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4
greb1	Fw: GCTCGCTTATGTGGCTTAGG Rev: GCAAAGAACAAAGGGTCAGG	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4
snai1	Fw: AGCACACTTCCCTTTGCATT Rev: GTGTGGGGCACTGTACCTG	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4
stat5a	Fw: CTTTGCCTCAGGAGGATCTG Rev: GCTGGGAATGTGTGCTTTCT	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4

Tabla II: Detalle de los oligonucleótidos utilizados en las distintas qPCR. Se indican secuencia, temperatura y tiempo de cada ciclo y concentraciones de Mg⁺⁺.

6.7. Separación de fracciones subcelulares y ensayo de co-inmunoprecipitación (Co-IP)

6.7.1. Obtención y cuantificación de las muestras

Para llevar a cabo los ensayos de Co-IP, se sembraron alrededor de $2,5 \cdot 10^6$ células en placas p100 con medio DMEM sin rojo fenol con 10% de suero delipidado. Las células se mantuvieron a 37°C en la estufa en estas condiciones por 48 horas. Pasado ese tiempo, se lavaron las placas con PBS 1X para posteriormente cambiar el medio por DMEM sin rojo fenol sin suplementos (hambreado) e incubarlas durante 24 horas en las mismas condiciones. Luego, se trataron las células con los diferentes estímulos durante 1 hora. Finalizados los tratamientos, las células se cosecharon, se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm y se lavaron con PBS 1X frío. Luego, se incubaron en 300 µl de solución hipotónica (10 mM Tris-HCl pH 6,7; 0,2 mM MgCl₂; 1 mM EGTA) suplementados con inhibidores de proteasas (1M β-glip, 0,2M PMSF, 0,2M ortovanadato de sodio y 1X PIC) durante 5 minutos en un baño de agua y hielo. Seguidamente, se procedió al fraccionamiento subcelular mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10

minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido contenía principalmente la fracción citoplasmática. Los *pellets* (enriquecidos en núcleos) fueron lavados dos veces con PBS 1X frío para luego ser resuspendidos en 250 µl de solución de lisis (20 mM Tris HCl pH 6,7; 70 mM NaCl; glicerol 10% v/v; Triton X-100 1%v/v; Nonidet P-40 0,5% v/v; más inhibidores de proteasas). Luego, los mismos se incubaron en un baño de agua a 4°C y hielo durante 30 min y se sonicaron tres veces durante 10 segundos con una potencia del 20% (sonicador *Branson 450*). Seguidamente, los extractos nucleares se incubaron a 4°C por 30 minutos en una concentración final de 0,5 M de NaCl. Finalizada esta última incubación, los extractos nucleares se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C; el sobrenadante obtenido correspondió a la fracción nuclear enriquecida. Para la Co-IP, cada fracción nuclear obtenida (aproximadamente 1 mg de proteína) fue preclareada con pequeñas perlas magnéticas unidas con proteína G (*Dynabeads® Protein G, Thermo Fisher Scientific*) durante 1 hora a 4°C. Seguidamente, se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-PR (*H-190, sc-7208, Santa Cruz Biotechnology*) o con el anticuerpo control no específico (IgG de conejo, *sc-2017, Santa Cruz Biotechnology*). Luego, los complejos se incubaron con las perlas magnéticas unidas con proteína G (*Dynabeads® Protein G, Thermo Fisher Scientific*) durante 3 horas a 4°C. Las perlas se lavaron por oscilación durante 5 minutos en solución de lisis nuclear y las proteínas inmunoprecipitadas (IP) se eluyeron, hirviendolas en solución SDS 1 % p/v. Los extractos totales (INPUTS) y las proteínas inmunoprecipitadas (IPs) se analizaron luego mediante *Western blot*.

6.7.2. Ensayos de Western blot

6.7.2.1. Soluciones utilizadas

- ✓ **Solución de siembra:** 40 mM Tris-HCl pH 6.8; 6% glicerol; 0.006% azul de bromofenol; 1% SDS; 1% β-Mercaptoetanol.
- ✓ **Solución de Corrida:** 25 mM Tris-HCl pH 8.3; 192 mM glicina; 0.1% SDS.

✓ **Solución de Transferencia:** 25 mM Tris-HCl pH 8.3; 192 mM glicina; 0.1% SDS; 20% Metanol.

✓ **Gel de poliacrilamida (gel de resolución):** 15% Acrilamida-bisacrilamida 29:1 (BioRad catálogo # 161-0156); 375 mM Tris-HCl pH 8.8; 0.2% SDS; 0.2% persulfato de amonio; 0.075% TEMED.

✓ **Gel de poliacrilamida concentrador:** 3.9% Acrilamida-bisacrilamida (proporción 29:1); 0,25 M Tris-HCl pH 6.8; 0.1% SDS; 0.2% persulfato de amonio; 0.075% TEMED.

6.7.2.2. Electroforesis y transferencia a membrana de PVDF

Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en un gel de 15% según durante 1,5 a 3 horas a 80-100 Volts y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) durante 1.5 horas a 300mA. Se realizó una tinción de proteínas durante 5 minutos con rojo Ponceau-S al 0,1% en ácido acético 5% para verificar la eficiencia de la transferencia y facilitar el corte de las membranas para someterlas al revelado con diversos anticuerpos.

6.7.2.3. Incubación con anticuerpos y revelado

Luego de la transferencia, la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS, 0,1% Tween 20 (TPBS) conteniendo 5% de leche descremada (Purísima). Seguidamente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los correspondientes anticuerpos primarios específicos, preparados en TPBS conteniendo 3% de leche descremada. Como Luego de la incubación con los anticuerpos, se realizaron un lavado de 20 minutos y dos lavados de 5 minutos en TPBS para luego incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, la membrana con el anticuerpo secundario, preparado en TPBS conteniendo 3% de leche descremada. Finalizadas las incubaciones, se realizaron nuevamente un

lavado de 20 minutos y 2 lavados de 5 minutos con TPBS. Finalmente, se reveló por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL+Plus System (*GE Health Care, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK*) en el detector FujiFilm ImageReader LAS-1000. Las intensidades de las bandas presentes en las imágenes se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Image J 1.34s software (*Wayne Rasband, National Institute of Health, USA*).

6.7.2.4. Anticuerpos primarios utilizados

- ✓ **Anti-PR:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-7208, H190)
- ✓ **Anti-GR:** policlonal de conejo (Thermo Fisher Scientific, MA1- 510)
- ✓ **Anti-Actina:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology) sc-1616-R, dilución 1/5000).

6.7.2.5. Anticuerpos secundarios utilizados

- ✓ Anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (BENTHYL, cat A120-109AP, dilución 1/4000).

6.8. Ensayos de microscopía confocal

6.8.1. Incorporación de vectores de expresión de proteínas fluorescentes. Transfecciones transitorias

Las células BHK, T47D-WT o las T47D-Y fueron transfectadas en forma transitoria mediante el método de Lipofección (lípidos catiónicos).

Cuando las células alcanzaron el 70-90% de confluencia, se cosecharon con 1 ml de tripsina 0.25% (Hyclone). Luego se contaron en una cámara de Neubauer y se sembraron sobre cubreobjetos circulares de 24 mm de diámetro. El número inicial

de células según la placa utilizada, se indica en la **tabla III**. Las células fueron sembradas en el volumen adecuado de DMEM con 5% de SFB y con 1X de penicilina-estreptomicina (solución stock al 100X). Luego se incubaron por 24h a 37°C. Posteriormente, se preparó la mezcla de Lipofectamina 2000 y los vectores de expresión de las distintas proteínas fluorescente a transfectar de la siguiente manera: en el tubo 1 se colocó medio DMEM junto con las cantidades de ADN a transfectar según cada caso (ver **tabla III**). En el tubo 2 se agregó DMEM junto con la Lipofectamina 2000 (volúmenes indicados en la **tabla III**). Luego de 5 minutos se mezclaron los contenidos de ambos tubos (el contenido del tubo 1 en el tubo 2) y se esperó 20 minutos. Paralelamente, las células se lavaron con PBS 1X y luego se les agregó 500 µl de medio DMEM. Pasados los 20 minutos se agregó gota a gota la mezcla de ADN con lípidos catiónicos a las células. Las placas se incubaron durante 6 horas o toda la noche, según correspondiese, a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 4.5 % CO₂. Pasado este tiempo, se reemplazó el medio por medio fresco y se continuó con la incubación otras 16 horas. Pasado este tiempo, las células se trataron con R5020 y/o DEX a una concentración final de 10⁻⁸ M durante 1 hora. Posteriormente las células fueron analizadas *in vivo* en el microscopio confocal. Cada placa es una réplica independiente.

Como condición control se consideró a las células no tratadas y como control negativo se transfectaron los vectores de expresión peGFP y/o pmCherry.

6.8.2. Obtención de las imágenes y análisis de las intensidades medias

En todas las condiciones analizadas, la captura de imágenes se realizó en un microscopio confocal invertido FV1000 (Olympus), adaptado para la experimentación en tiempo real de células vivas. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite 60X (NA = 1,35; Olympus UPlanSApo). Los fluoróforos eGFP y mCherry fueron excitados con un láser de Argón de múltiples líneas sintonizado a 488 nm y un láser verde de helio-neón a 543 nm (potencia promedio en la muestra, 700 nW), respectivamente. La fluorescencia se detectó con un fotomultiplicador configurado

en el modo de detección de pseudofotones. El tamaño del píxel se ajustó a 83 nm. Una vez seleccionada la célula a analizar, se tomaron imágenes de 800 x 800 píxeles con una velocidad de barrido de 20 μ seg/píxel. Se observaron alrededor de 26 células independientes por tratamiento. Por medio del programa "ImageJ" (<http://imagen.nih.gov/ij>) se obtuvieron los valores de las intensidades medias del núcleo y el citoplasma celular, luego se relacionaron ambos valores para su posterior análisis.

Tipo de célula	Placa	# células plaqueadas (μ l) *	Vol de transfección (μ l) **	Lipofectamina 2000 (μ l)	Vector de transfección (μ g de ADN)	Tiempo de transfección	Experimento
BHK	p6	2000000	55 en 800	2	1 pEGFP-PR	6 horas	Intensidades medias Bcc
					1 mCherry-GR		
					1 mCherry-GRdim		
					1 mCherry-GRLBD		
					0,5 mCherry		
					0,25 eGFP		
T47D-Y	p6	3000000	500 en 1000	5	2 pEGFP-PR	6 horas	Intensidades medias
					2 mCherry-GR		
					0,5 mCherry		
					0,5 eGFP		
					1,34 - 2 pEGFP-PR		
					2 mCherry-GR		
T47D-WT	p6	3000000	500 en 1000	5	2,66 mCherry-GRdim	6 horas	FCS Bcc
					2,66 mCherry-GRLBD		
					0,5 mCherry		
					0,5 eGFP		

Tabla III. Transfecciones transitorias por el método de Lipofección. Se muestra, para cada tipo celular, las condiciones en función del tamaño de la placa en las que fueron transfectadas.

* Se indica la cantidad aproximada de células sembradas el día anterior al protocolo de transfección.

** El primer número se refiere a la suma de volúmenes del tubo 1 y 2 de la transfección (por tratamiento). El segundo número indica el volumen final alcanzado de medio en donde se produce la transfección. Por ejemplo, 50 en 500 significa que para cada réplica se tomaron 25 μ l del tubo 1 y 25 μ l del tubo 2; y se colocaron en la placa correspondiente con 450 μ l de medio sin antibióticos.

6.8.3. Correlación Cruzada de Brillo (Bcc)

6.8.3.1. Principio de la técnica Bcc

El desarrollo de la microscopía confocal y de las técnicas basadas en el análisis de fluctuaciones de fluorescencia han sido de gran utilidad para el estudio de procesos moleculares dinámicos *in vivo*. Estos métodos se basan en la detección y el análisis de fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo, causadas por el movimiento espontáneo de las moléculas fluorescentes, por ejemplo dentro de la célula. Para que estas fluctuaciones sean apreciables, se debe trabajar con soluciones diluidas de fluoróforos y volúmenes de observación pequeños, como por ejemplo el volumen confocal.

El método de Número y Brillo (*Number and Brightness, N&B*), es una técnica de microscopía de fluorescencia que nos brinda información acerca del número (N) y brillo (B) de partículas fluorescentes en el volumen de observación. El brillo molecular, o brillo real (ϵ), se define como el número de fotones emitidos por molécula por unidad de tiempo. Una molécula (que denominaremos A) que contiene un solo fluoróforo emitirá n fotones por unidad de tiempo. Si esta molécula formara un dímero, el complejo contendrá dos fluoróforos (uno por cada monómero) y por lo tanto emitirá $2n$ fotones (*Digman et al, 2008*). En caso de formarse trímeros, el complejo emitirá $3n$ fotones por unidad de tiempo, y así sucesivamente. De esta forma, el brillo es proporcional al estado de oligomerización del fluoróforo.

Si se mide la intensidad de fluorescencia en cada píxel de una imagen a lo largo de una serie temporal de imágenes, se observarán fluctuaciones en la intensidad de cada píxel a lo largo de la serie temporal, debido a la entrada y salida de moléculas fluorescentes móviles dentro de la célula (*Digman et al, 2008*). A partir de estos datos se puede calcular el número aparente (N) y el brillo aparente (B), que consiste en la razón entre la varianza (σ^2) y la media ($\langle k \rangle$) de la intensidad de cada píxel en la serie temporal de imágenes (**Fig. MyM3A**). Y en consecuencia se puede calcular los valores de N y B, como se muestran las siguientes ecuaciones:

$$N = \frac{\langle k \rangle^2}{\sigma^2} \quad \text{Ec. (1)}$$

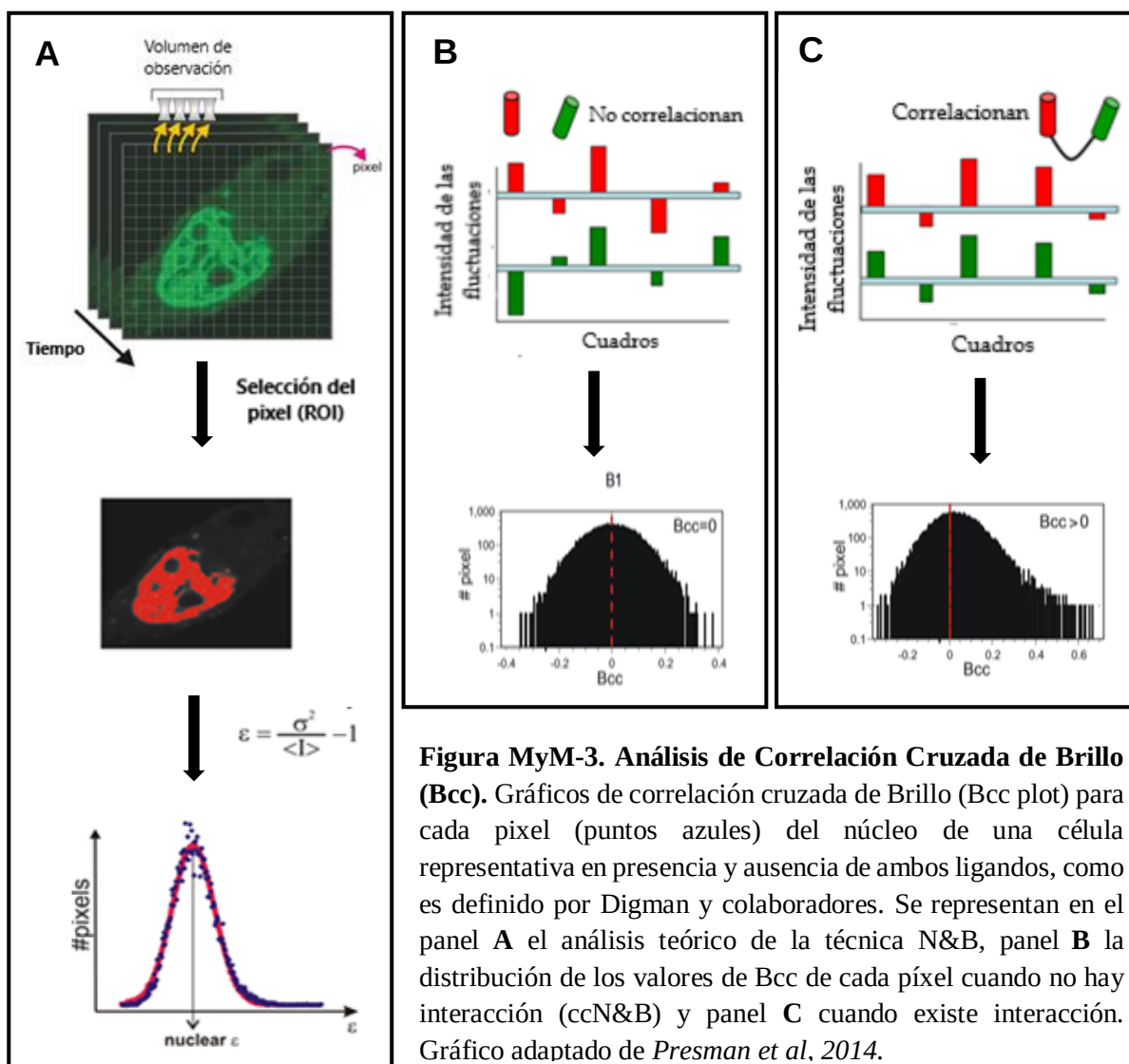
$$B = \varepsilon + 1 \quad \text{Ec. (2)}$$

Si extendemos este análisis a otra molécula (que denominaremos B) unido a otro fluoróforo cuya emisión de fluorescencia pueda ser discriminada de la del fluoróforo A, podremos aplicar las mismas ecuaciones en forma independiente.

Además de este análisis en colores independientes, se puede combinar la información proveniente de la serie temporal de imágenes en los dos canales para analizar si las moléculas A y B forman parte de un hetero-complejo o si se mueven de manera independiente. Para ello, debemos determinar un parámetro adicional denominado correlación cruzada de brillo (*Cross-Correlation Brightness, Bcc*). La misma se obtiene a partir de la covarianza de intensidades entre ambos canales (σ_{cc}^2), normalizada respecto a la intensidad promedio de ambos canales y se la define como:

$$B_{cc} = \frac{\sigma_{cc}^2}{\sqrt{\langle k_G \rangle \langle k_R \rangle}} \quad \text{Ec. (3)}$$

Este tipo de análisis se puede realizar para todos los pixeles que conforman una región de interés. Al representar los valores de Bcc obtenidos para el conjunto de pixeles en un histograma, se puede evaluar estadísticamente la formación de hetero-complejos. Si este histograma está centrado en cero ($B_{cc} = 0$), implica que las fluctuaciones de intensidad entre los dos canales son independientes, indicando la ausencia de interacción (**Fig. MyM3B**). Si existe una correlación positiva ($B_{cc} > 0$) implica que ambas partículas están interactuando. (*Digman et al, 2009*) ((**Fig. MyM3C**).



6.8.3.2. Condiciones de adquisición de Bcc

La adquisición de datos se realizó con el mismo equipamiento que el descrito en el punto 6.8.2. Para cada célula se obtuvieron un conjunto de 200 imágenes de 256 x 256 píxeles. El tiempo de permanencia en cada píxel fue de 10 μ s y el tiempo de cuadro fue de 0,9 segundos. Cada conjunto de datos fue analizado con la rutina "N&B" otorgada por el software "SimFCS - GLOBALS for Images" desarrollado en el Laboratorio de Dinámica de Fluorescencia (Universidad de California, Irvine, CA,

EE.UU.). El valor de Bcc se determinó siguiendo los procedimientos descritos por Digman (*Digman et al 2009*) para cada píxel correspondiente al núcleo. Se analizaron aproximadamente 50 células para cada condición.

6.8.4. Espectroscopía de Correlación de fluorescencia (FCS)

6.8.4.1. Principio de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

La espectroscopía de correlación de fluorescencia (*fluorescence correlation spectroscopy, FCS*) es otra técnica basada en el análisis de fluctuaciones de fluorescencia. Esta técnica es utilizada para la medición de concentraciones de moléculas, coeficientes de difusión, constantes cinéticas e interacciones moleculares tanto *in vivo* como *in vitro* (*Stortz et al, 2017*). Al igual que otras técnicas basadas en fluctuaciones, requiere el uso de concentraciones diluidas de fluoróforos.

FCS permite extraer información sobre los procesos que afectan la movilidad de las moléculas fluorescentes, por ejemplo en una región particular de una célula. La duración de las fluctuaciones depende del movimiento de las moléculas: algunas son lentas, produciendo fluctuaciones duraderas en el tiempo, mientras que otras son más rápidas ocasionando fluctuaciones más rápidas. Análogamente, la amplitud relativa de estas fluctuaciones está relacionada con la concentración de las moléculas dentro del volumen confocal. En general, la amplitud de estas fluctuaciones es semejante a la del ruido experimental y no se puede identificar con claridad en la traza de la intensidad. Sin embargo, el ruido generado en estos experimentos es aleatorios, mientras que el de las moléculas presentan una movilidad con un tiempo característico y por lo tanto presentan una correlación temporal a nivel estadístico. La función que permite discriminar estos ruidos, es la función de autocorrelación (ACF).

Mencionada función correlaciona una serie temporal consigo misma desfasada un tiempo τ , de acuerdo a

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{Ec. (4)}$$

donde $\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$ es la fluctuación de la intensidad, definida como la diferencia entre la intensidad de fluorescencia y el promedio temporal de la intensidad de fluorescencia (**Figura MyM-6**).

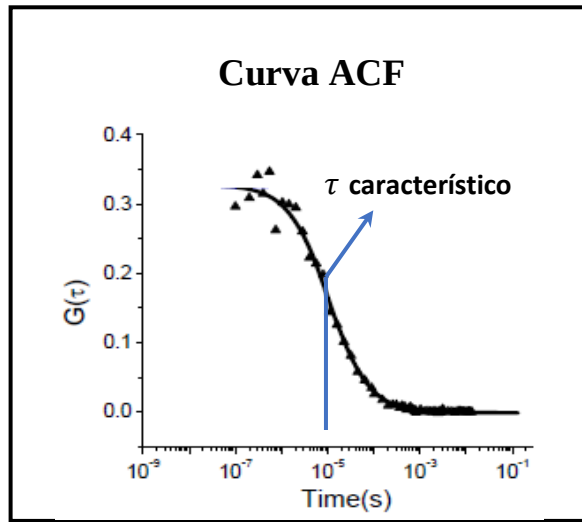


Figura MyM-6. Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FSC). Gráfico de la función de autocorrelación [$G(\tau)$] en una serie temporal determinada. Gráficos adaptados de Schwille and Haustein, 2006.

También es posible extender el análisis a dos fluoróforos, gracias a los experimentos de espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS). Para la misma se calcula la función de correlación cruzada (CCF) entre los dos canales verde y rojo a partir de las dos trazas de intensidad de cada fluoróforo, es decir $I_v(t)$ e $I_r(t)$ (**Figura MyM-7**):

$$G_{cc}(\tau) = \frac{\langle \delta I_v(t) \cdot \delta I_r(t + \tau) \rangle}{\langle I_v(t) \rangle \cdot \langle I_r(t) \rangle} \quad \text{Ec. (5)}$$

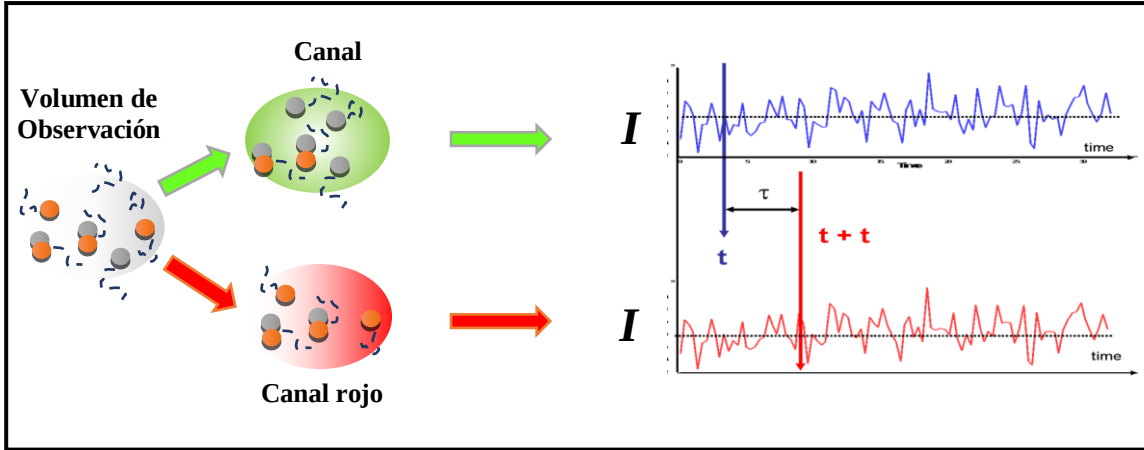


Figura MyM-7. Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FSC). Esquema representativo de la medición de las fluctuaciones de la fluorescencia de dos fluoróforos diferentes. Gráficos adaptados de *Schwille and Haustein, 2006*.

Para realizar estos cálculos, en el caso de las medidas experimentales, cada traza se dividió en segmentos de $\sim 5 \times 10^5$ datos (equivalentes a 5.25 s de duración), se calcularon las funciones de correlación segmento a segmento y se obtuvieron curvas promedio para cada medida a partir de todos los segmentos. La longitud de segmento fue suficiente para observar la relajación de las curvas de ACF y CCF a cero, y al mismo tiempo obtener una estadística adecuada, con el menor ruido posible.

Las ACF calculadas se analizaron por una versión extendida del modelo de reacción dominante (*Michelman-Ribeiro et al, 2009*), donde la función de correlación $G(\tau)$ incluye una población de moléculas en difusión libre y otra involucradas en la unión a dos poblaciones distintas de sitios fijos (*White et al, 2016*):

$$G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left[f_D \left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} + f_R e^{-\tau/\tau_R} + f_L e^{-\tau/\tau_L} \right] \quad \text{Ec. (6)}$$

En donde N es el número promedio de moléculas móviles en el volumen de observación; D es el coeficiente de difusión; f_D es la fracción poblacional de moléculas involucradas en difusión libre; f_R y f_L son las fracciones poblacionales

involucradas en interacciones rápidas y lentas con sitios fijos; τ_R y τ_L son sus respectivos tiempos de residencia en esos sitios. Las recíprocas de los tiempos de residencia corresponden a las constantes de disociación k_{off} de estos sitios.

Este modelo provee valores promedio de los parámetros poblacionales que interaccionan con los sitios rápidos y lentos, sin considerar la variabilidad intracelular de afinidades que pueden existir en mencionados sitios (Normanno et al, 2015). Además, el modelo asume que las concentraciones de sitios fijos son independientes entre sí, constantes y muy altas en relación a las concentraciones de sitios ocupados (Michelman-Ribeiro et al, 2009).

La ecuación 6 se ajustó a los datos de ACF usando una rutina diseñada en MATLAB. Esta rutina ajustó de manera global los datos provenientes de distintas medidas y una misma condición. Se asumieron entonces tiempos de residencia comunes (rápido y lento) para las distintas medidas de una misma condición, mientras que las dos fracciones poblacionales unidas se ajustaron individualmente para cada medida.

Por otro lado, los datos de FCS de GFP del PR, fueron examinados y ajustados a un de difusión anómala dada por la siguiente ecuación:

$$G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left[\left(1 + \left(\frac{4\tau D}{\omega_0^2} \right)^\alpha \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{4\tau D}{\omega_z^2} \right)^\alpha \right)^{-1/2} \right] \quad \text{Ec. (7)}$$

En donde α es el coeficiente de difusión anómala.

6.8.4.2. Cálculo de constante de asociación aparente o de equilibrio

En los experimentos de FCS, se calculó una constante de equilibrio (K_{eq}) entre los dímeros eGFP-PR y mCherry-GR (y sus variantes mutantes) formados en el núcleo de células T47D-WT vivas en presencia de ambos ligandos. Si bien se ha

demostrado que la activación del GR genera principalmente homodímeros en el núcleo celular (*Presman et al, 2014*), mientras que para el caso del PR se han descrito también estados de oligomerización mayores (por ejemplo, tetrámeros) (*Presman et al, 2016*), teniendo en cuenta la complejidad estequiométrica de los posibles heterocomplejos que se pudieran formar, para el cálculo de K_{eq} hemos acudido a una aproximación. Asumimos que una vez activados simultáneamente ambos receptores, las especies en equilibrio en el núcleo son los homodímeros de cada uno de los receptores (GRGR y PRPR) y el heterodímero PRGR. Dicha asunción la contemplamos teniendo en cuenta los resultados previos del grupo obtenidos por ensayos de N&B (*Presman et al, 2014* y *Presman et al, 2016*), donde las concentraciones GR y PR monomérico son mínimas cuando los receptores se encuentran activados.



$$K_{eq} = \frac{[PRGR]^2}{[PRPR] * [GRGR]} \quad \text{Ec. (9)}$$

El cálculo de la K_{eq} requiere entonces determinar las concentraciones del hterocomplejo y de los homodímeros de PR y GR en el núcleo de las células. Para calcular las concentraciones en el equilibrio de estas tres especies, se utilizaron las amplitudes de las ACF y CCF calculadas a partir de los datos de FCS (*Schwille and Haustein, 2006*):

$$[PRPR] = \frac{\gamma}{G_{PR} \cdot N_A \cdot V_{PSF}} - [PRGR]^2 \quad \text{Ec. (10)}$$

$$[GRGR] = \frac{\gamma}{G_{GR} \cdot N_A \cdot V_{PSF}} - [PRGR]^2 \quad \text{Ec. (11)}$$

$$[PRGR] = \frac{\gamma \cdot G_{cc}}{G_{PR} \cdot G_{GR} \cdot N_A \cdot V_{PSF}} \quad \text{Ec. (12)}$$

En donde $\gamma = 0.35$ es un factor geométrico que depende del perfil de detección óptico (Lakowicz, 2006), $V_{\text{PSF}} = \omega_0^2 \cdot \omega_z \cdot (\pi/2)^{3/2}$ es el volumen de la función de dispersión de punto (PSF, *point spread function*), N_A es el número de Avogadro, y G_{PR} , G_{GR} y G_{CC} son las amplitudes de la ACF del canal del PR, la ACF del canal de GR y la CCF, respectivamente. $\omega_0=0.25 \mu\text{m}$ y $\omega_z=1 \mu\text{m}$ representan la dimensión lateral y la dimensión axial de la PSF, respectivamente.

Las amplitudes de las ACF o CCF se calcularon a partir del valor promedio de los primeros 5 datos de cada curva para disminuir el ruido. Se calculó un valor de Keq para cada medida de FCS de punto único, y luego se realizó un promedio de Keq para medidas correspondientes a una misma condición.

6.8.4.3. Condiciones de adquisición de FCS

Las medidas de FCS de punto único (*single-point FCS*) se realizaron en un microscopio confocal FV1000 (Olympus), con un objetivo de inmersión en aceite UplanSApo 60x (Olympus), de apertura numérica 1.35. Los fluoróforos GFP y mCherry se excitaron con un láser multi-líneas de Argón sintonizado a 488 nm y un láser de Helio-Neón de 543 nm, respectivamente. La potencia promedio de excitación de los láseres sobre las muestras fue de $\sim 700 \text{ nW}$. La apertura confocal se mantuvo en $105 \mu\text{m}$. La fluorescencia proveniente de los dos fluoróforos se separó en dos canales por un espejo dicróico SDM560, y se utilizaron bandas de detección espectrales en 500-530 nm y 600-700 nm para GFP y mCherry, respectivamente. La fluorescencia se detectó con fotomultiplicadores configurados en modo *pseudo photon-counting*. Se eligieron células con expresión baja o media. Las medidas se hicieron en posiciones al azar dentro del núcleo, aunque se evitaron los nucleolos. El tiempo de muestreo fue de $20 \mu\text{s}$ (frecuencia de 50000 Hz) y la duración de cada medida fue $\sim 3 \text{ min}$ (aproximadamente 8×10^6 datos por medida). Los experimentos involucraron la adquisición de 20-35 datos, dependiendo el caso, y realizándose siempre una única medición por célula para minimizar el daño celular.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis de la respuesta celular ante la presencia de R5020 y DEX

Primeramente, evaluamos el efecto del GR en el proceso de de-diferenciación dependiente de progestágenos que ocurre en las células T47D-WT y en las células T47D/A1-2. Esta última línea celular, expresa de manera endógena los receptores PR y GR (Nordeen *et al*, 1989), mientras que la T47D-WT sólo expresa PR (Cittelly *et al*, 2013). Se evaluaron los patrones de expresión de los marcadores CD44 y CD24, donde un perfil $CD44^{high}/CD24^{low}$ aumentado indica de-diferenciación celular.

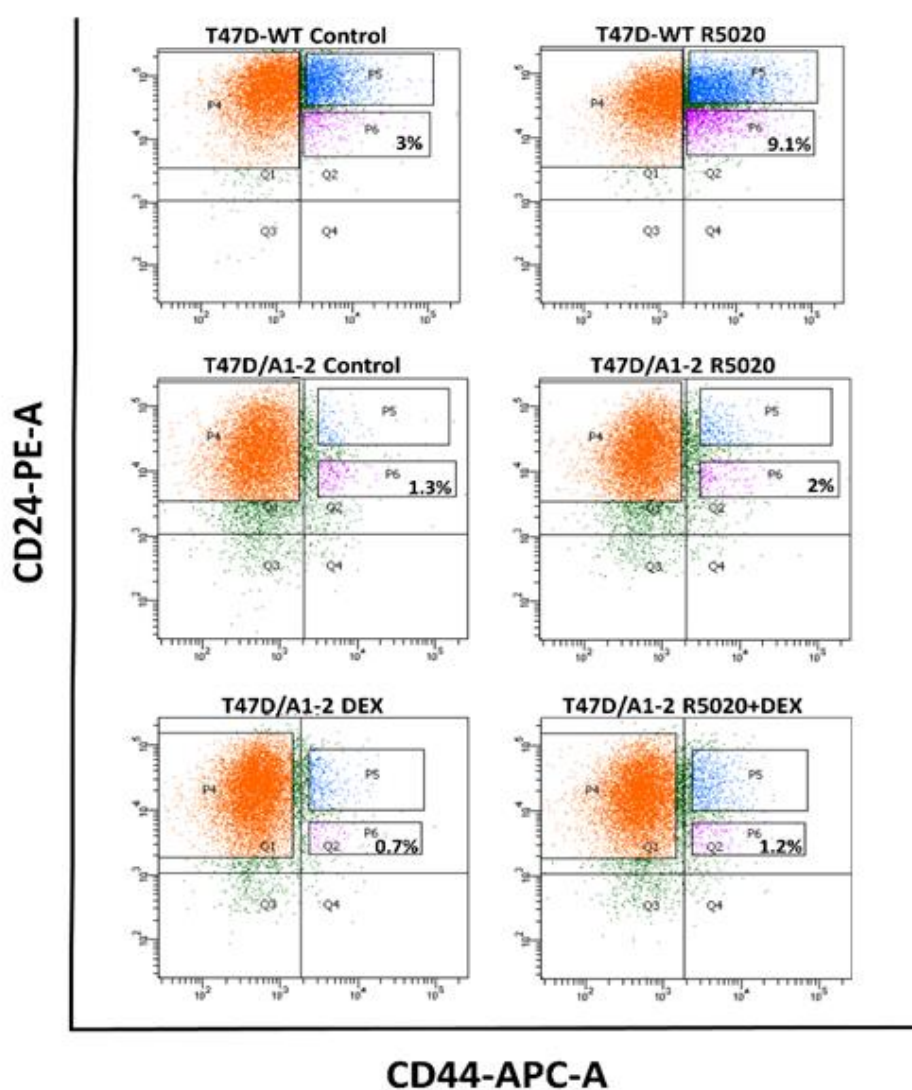


Figura R-1. GR interfiere en la de-diferenciación celular inducidas por progestágenos. Gráfico de puntos representativos de los porcentajes de fenotipo $CD44^{high} / CD24^{low}$ de las células T47DWT y A1-2.

Las líneas celulares fueron tratadas con vehículo o R5020 a una concentración de 10^{-8} M durante 24 horas y se analizó la proporción $CD44^{high}/CD24^{low}$ por citometría de flujo. Observamos que el fenotipo $CD44^{high}/CD24^{low}$ es menor en las células T47D A1-2 en comparación con WT (1.3% vs 3%, respectivamente). El tratamiento con R5020 aumentó significativamente este porcentaje del 3% al 9,1% en células T47D-WT (**Fig. R-1**), mientras que este aumento se vio comprometido en las células T47D/A1-2, lo que indica que la expresión de GR afectaría la de-diferenciación celular dependiente de hormonas (**Fig. R-2A**). Asimismo, la activación de GR con DEX disminuyó significativamente el porcentaje de células $CD44^{high}/CD24^{low}$ a valores comparables con el control en las células A1-2 (0.7% y 1.3%, respectivamente), apoyando la idea de que GR activado también interfiere con el proceso de de-diferenciación celular mediado por PR (**Fig. R-2B**).

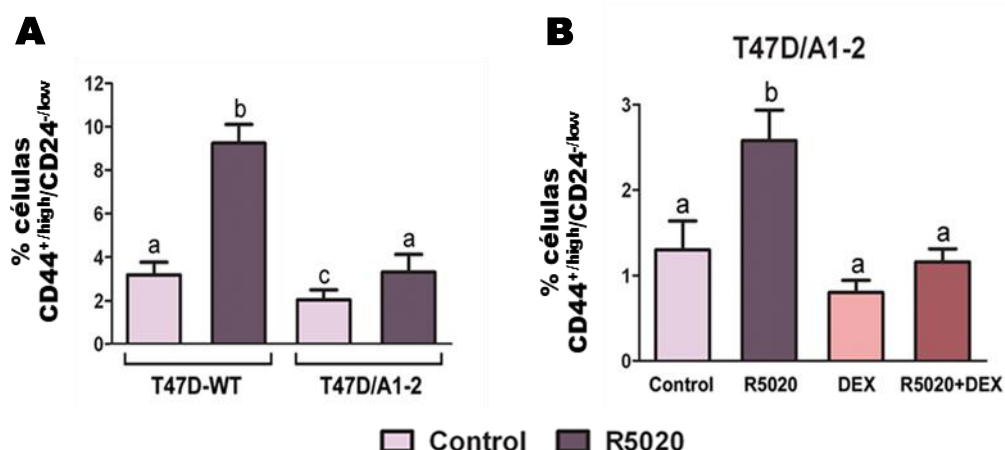


Figura R-2. GR interfiere en la de-diferenciación celular inducidas por progestágenos. Las barras corresponden a los porcentajes de fenotipo $CD44^{high} / CD24^{low}$ de las células (A) T47DWT y (B) A1-2 de los datos de la **Fig- R-1**. Muestran la media y la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Las diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes entre sí (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

Seguidamente, con la finalidad de determinar y analizar las propiedades de migración y proliferación celular en respuesta a glucocorticoides y progestágenos de forma separada y conjunta, se realizaron ensayos de herida y de clonogenicidad.

Para el ensayo de herida se utilizó la línea celular MCF7 que expresa ambos receptores. Se sembraron alrededor de 2×10^6 células por pocillo en una placa p6; las mismas fueron mantenidas por 48 horas en medio completo (DMEM alta glucosa con suero fetal bovino –SFB- al 10%) hasta llegar a confluencia. Luego se realizaron heridas a lo largo del pocillo para posteriormente sacar fotos en el momento inicial (tiempo 0 h) y a las 24 horas (tiempo 24 h) (**Fig.R-3A**). Las células fueron mantenidas hasta finalizar el ensayo con medio sin SFB y con los diferentes tratamientos de hormonas ya mencionados anteriormente.

Se obtuvo el Área Libre de células y el Eje Mayor de cada una de las heridas mediante el uso del programa Image Pro Plus 6.0 (<http://www.mediacy.com>). El cociente entre las medidas mencionadas define el Ancho de Área Libre de células. La diferencia entre el Ancho de Área Libre de células inicial (0 h) y final (24 h) representa la Migración celular obtenida. Todas las condiciones fueron normalizadas por la condición control (**Fig.R-3B**). A pesar de no observarse diferencias significativas, hubo una tendencia que mostró que la presencia de DEX podría disminuir la migración relativa en comparación con las condiciones control y R5020, no obstante, la presencia de ambas hormonas disminuye aún más la capacidad de migración celular en comparación con las otras condiciones.

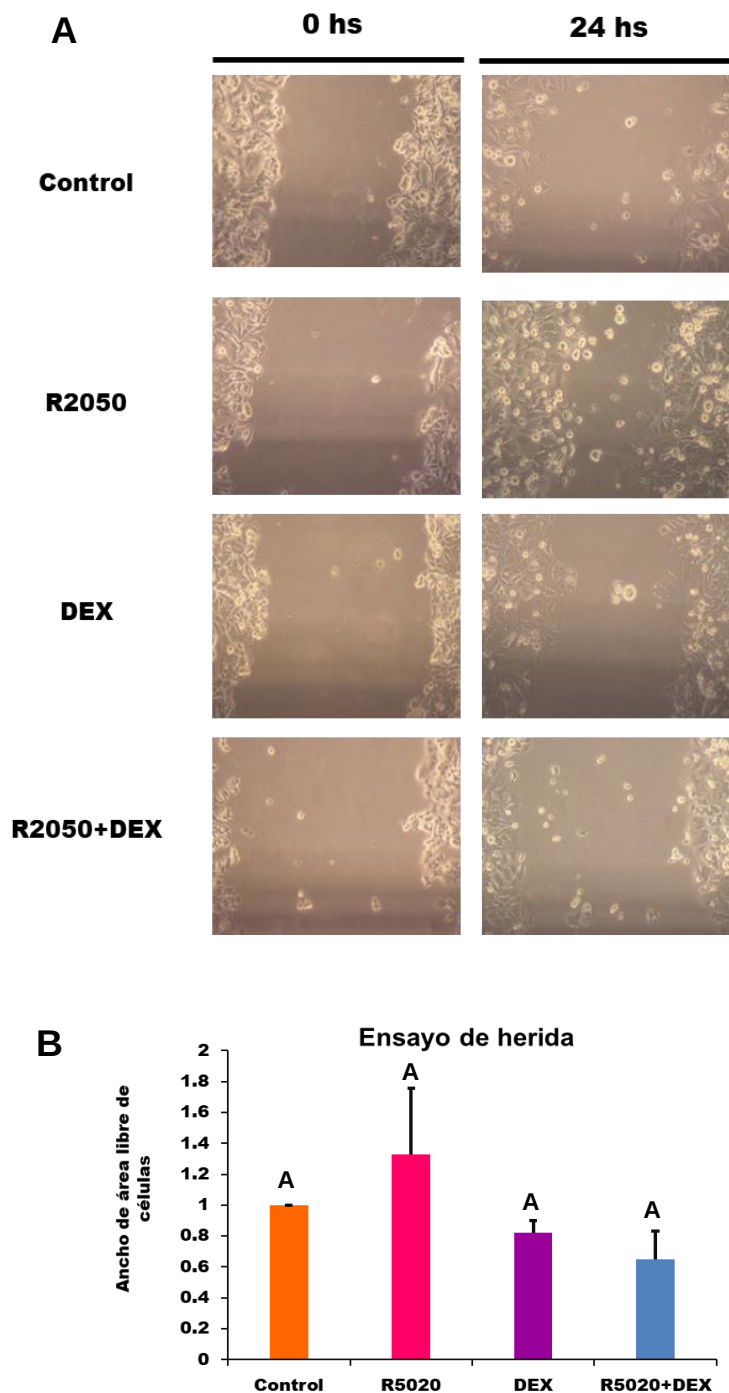


Figura R-3. Análisis de migración celular en las células tumorales mamarias MCF7 mediada por progestágenos. (A) Fotos representativas de las heridas realizadas en el momento inicial y a las 24 h para cada uno de los diferentes tratamientos. **(B)** Cuantificación del cierre de la herida de cada condición. Las barras muestran la media y la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Medias $\pm$ S.D. Se muestran tres experimentos independientes realizados por duplicado (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

En paralelo se llevaron a cabo ensayos de clonogenicidad para evaluar la capacidad proliferativa celular en respuesta a glucocorticoides y progestágenos de forma separada y conjunta. Para ello se sembraron por sextuplicado para cada una de las condiciones 5×10^3 células de la línea MCF7 por pocillo. Las mismas fueron mantenidas en medio completo por 48 horas y luego fueron expuestas a los ligandos en un medio mínimo (DMEM alta glucosa con 2% de suero delipidado) por 15 días con recambio del medio cada 2 días. Finalizado el tratamiento se procedió a la fijación y a la tinción con cristal violeta para poder cuantificar las colonias de células formadas. En la **Fig. R-4** se puede observar que no hay diferencias significativas en el número de colonias comparando los distintos tratamientos.

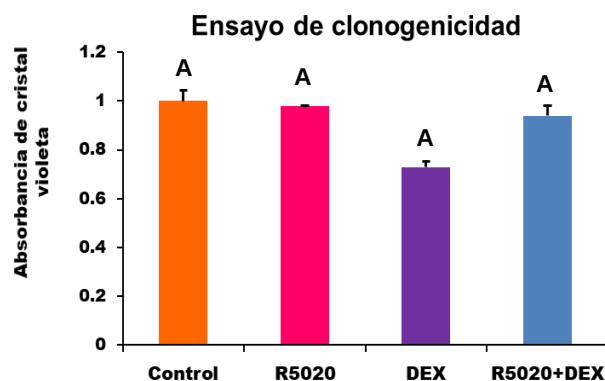


Figura R-4. Análisis de clonogenicidad en las células tumorales mamarias MCF7 Ensayo de clonogenicidad. Las barras muestran la media y la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Medias $\pm$ S.D. Se muestran tres experimentos independientes realizados por duplicado (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

Tomando los resultados de ambos ensayos, no pudimos observar una respuesta celular definida en las células tratadas con los diferentes ligandos. Estos resultados nos hacen pensar que la respuesta celular ante progestágenos y glucocorticoides es bastante compleja y demandaría la presencia de otros factores.

7.2. Análisis de los perfiles de expresión de genes específicos en respuesta a glucocorticoides y progestágenos

En colaboración con el grupo del Dr. Guillermo Vicent (IBMB, Barcelona, España) nuestro grupo realizó ensayos de ChIP-seq en células T47D/A1-2 tratadas durante 60 minutos con R5020 [10^{-8} M] o DEX [10^{-8} M]. Los resultados permitieron identificar 28563 sitios de unión a PR luego del tratamiento con R5020 y 10640 sitios de unión a GR luego del tratamiento DEX.

Del total de sitios de unión a PR activado, más del 80% son sitios exclusivos para este receptor; mientras que, del total de sitios de unión a GR activado, más del 88% son exclusivos del mismo, indicando que en su conjunto ambos receptores tienen el potencial de compartir sitios de unión al ADN (**Fig. R-5**). En ese sentido, la unión de PR y GR a estos sitios podría resultar en la modulación de la expresión de genes blanco compartidos o exclusivos de cada uno de estos receptores.

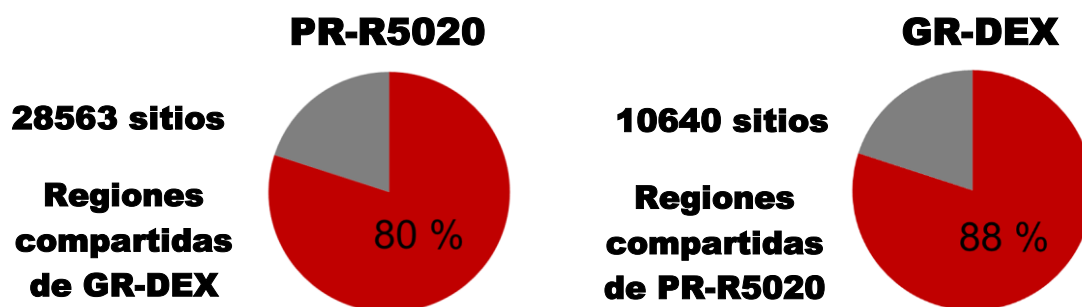


Figura R-5. Resultados de los análisis de ChIP-Seq en la línea T47/A1-2 tratadas con R5020 y DEX. A partir de este análisis se pudieron determinar los genes que poseen los sitios compartidos por el PR y el GR. Datos fueron tomados a partir de *Ogara et al, 2019*.

A fin de conocer si la presencia de GR en células T47D/A1-2 influye sobre la función de PR, se llevaron a cabo ensayos de expresión, analizando mediante RT-qPCR los niveles de transcritos de algunos de los genes que, de acuerdo con los resultados del ChIP-seq contienen HREs compartidos por ambos receptores y cuya expresión se sabe, es regulada por progestágenos.

Algunos de los genes que se evaluaron están implicados tanto en la transición epitelio mesénquima (*Epithelial Mesenchymal Transition -EMT-*) como en la de-diferenciación celular, ellos son STAT5A, SNAI1 y ELF5 (*Hilton et al, 2010, Lee et al, 2013, Chakrabarti et al, 2012*), o también involucrados en el control del ciclo celular y/o en proliferación, como GREB1 (*Hodgkinson et al, 2014; Haines et al, 2018*). La expresión de dichos genes fue analizada en células T47D/A1-2 tratadas durante 6 horas con R5020 [10^{-8} M] y/o DEX [10^{-8} M], y para la condición control con el vehículo etanol.

Los resultados mostraron que la incubación con cada uno de estos ligandos por separado afecta la expresión de GREB1, STAT5A y SNAI1 (**Fig. R-6**). Tanto R5020 como DEX indujeron significativamente los niveles de transcritos de los tres genes cuando son aplicados en forma independiente, mientras que no afectaron los niveles de expresión de ELF5 (panel superior derecho). No obstante, es notable observar que cuando las células son tratadas en simultáneo con R5020 + DEX, la inducción de la expresión de GREB1 y STAT5A dependiente de R5020 es significativamente menor comparado con el efecto observado cuando se aplica el progestágeno solo (paneles izquierdos), lo que sugiere que la activación de GR por DEX podría inhibir la acción del PR. Por otro lado, los niveles de transcritos de SNAI1 y el ELF5 no muestran el mismo comportamiento. La co-incubación con ambos ligandos genera niveles transcritos de SNAI1 que corresponden a la suma de los niveles observados cuando se trata con cada ligando por separado (panel inferior derecho), mientras que los niveles de expresión de ELF5 se ven disminuidos en presencia de ambos ligandos (**Fig. R-6**, panel derecho superior).

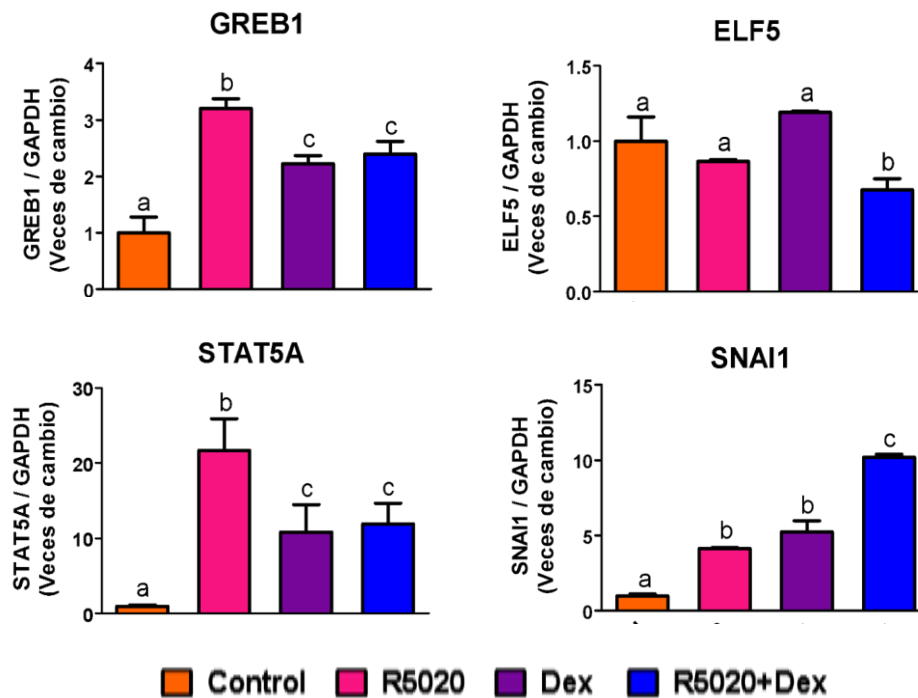


Figura R-6. Niveles de expresión de genes dependientes de progestágenos en células que co-expresan PR y GR. Cambios en la expresión génica determinados por RT-qPCR en genes seleccionados en células T47D/A1-2 no tratadas (control), tratadas con R5020 [10^{-8} M], DEX [10^{-8} M], o ambos ligandos, durante 6 h. Los valores se normalizaron con la expresión de GAPDH. Medias $\pm$ S.D. Se muestran tres experimentos independientes realizados por duplicado (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

Estos resultados sugieren la existencia de una interferencia en la acción de los receptores cuando ambos se encuentran activos. La presencia del GR activado afectaría la acción del PR sobre la expresión de ciertos genes clave en el proceso de de-diferenciación celular.

Seguidamente se evaluó si la mera expresión del GR afecta la expresión de genes dependientes de PR. Para ello, se silenció la expresión del GR mediante la transfección transitoria de ARN de interferencia en células T47D/A1-2 para luego, determinar los niveles de expresión de los genes analizados anteriormente. Como control se realizó también el silenciamiento en células T47D-WT (que no expresan niveles funcionales de GR).

Como podemos observar en la **figura R-7**, el aumento de los niveles de expresión de GREB1, STAT5A y SNAI1 mediado por R5020 es menor en células T47D/A1-2 comparado con células T47D-WT. Mientras que, por el contrario, ELF5, que es reprimido por R5020 en células T47D-WT, no mostró un nivel significativo de represión en las células T47D/A1-2. Estos efectos se ven revertidos cuando se silencia la expresión de GR con ARN de interferencia, recuperándose la acción del progestágeno. En efecto, la eliminación de la función del GR en las células T47D/A1-2 restaura la expresión dependiente de progestágenos de STAT5A, GREB1, SNAI1 y ELF5, alcanzando niveles comparables a los observados en las células WT.

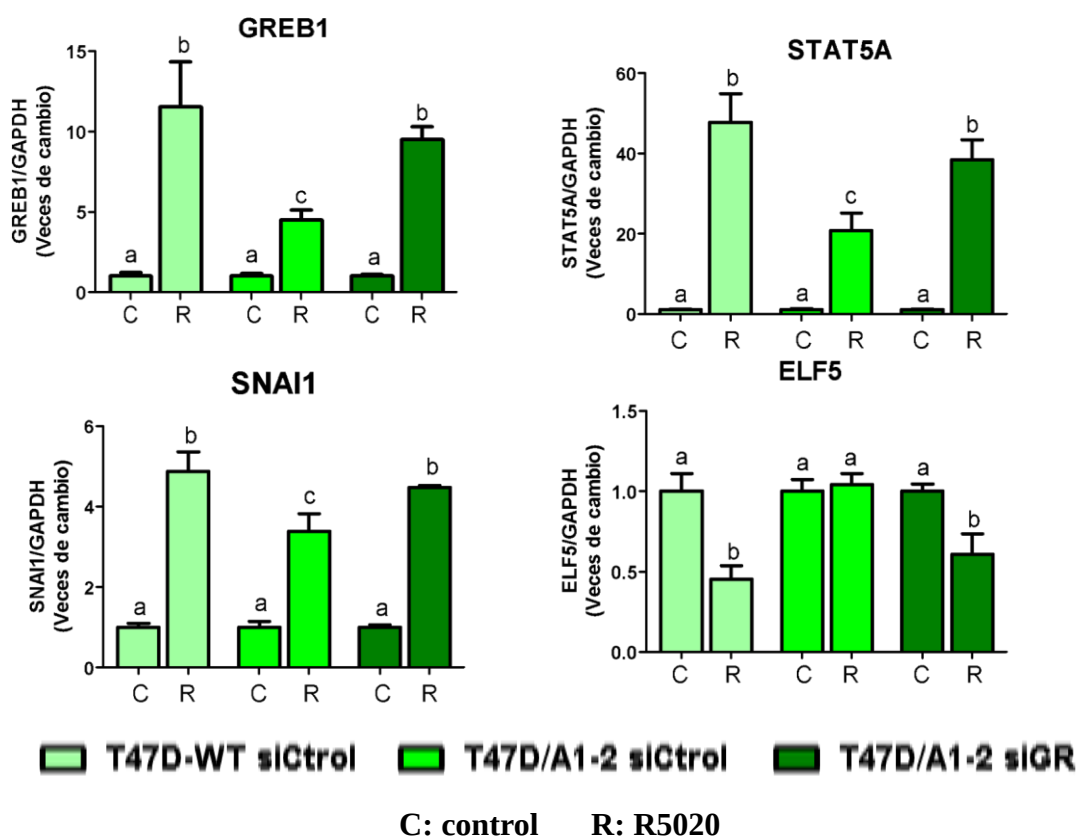


Figura R-7. La presencia del GR afecta la expresión de genes dependiente de PR. Cambios en la expresión génica evaluados por RT-qPCR para genes seleccionados en células T47D/A1-2 transfectadas con ARNsi control (Ctrl) o ARNsiGR y tratadas con R5020 durante 6 h. Como control se utilizó la línea celular T47D-WT. Medias $\pm$ S.D. Se muestran tres experimentos independientes realizados por duplicado (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

7.2.2. Análisis del reclutamiento de PR y GR a los sitios de unión presentes en sus genes blanco

Los resultados expuestos en la sección anterior apoyan la idea de que el GR afectaría la expresión dependiente de PR de ciertos genes. Por lo que nos propusimos evaluar el reclutamiento de ambos receptores a sitios específicos de unión identificados en los ensayos de ChIP-seq (**Fig.R-8**).

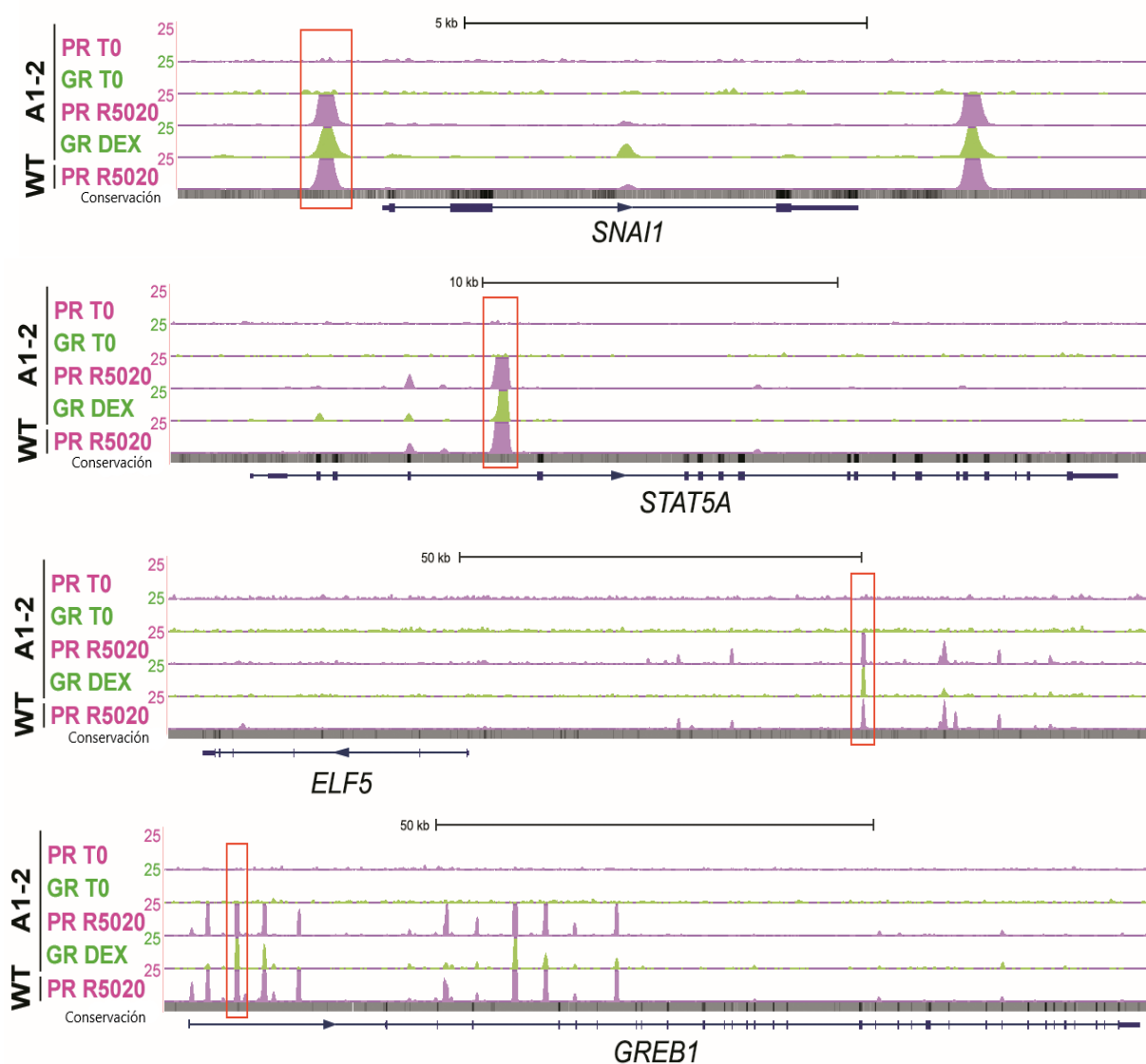


Figura R-8. Genes con sitios compartidos por GR y PR. Perfiles de reclutamiento del PR y GR en los genes SNAI1, STAT5A, ELF5 y GREB1 en células T47D/A1-2 tratadas o no con sus respectivos ligandos. Los recuadros en rojo indican los sitios de unión que son compartidos por ambos receptores. Imagen adaptada de Ogara *et al*, 2019.

Primeramente, evaluamos el reclutamiento del PR en presencia de R5020 en células T47D-WT y en las T47D/A1-2. Como se observa en la figura **R-9** el reclutamiento del PR en las regiones reguladoras ubicadas en las proximidades de los genes SNAI1 y STAT5A es significativamente menor en las células T47D/A1-2 en comparación con las WT. No obstante, en los sitios de unión asociados a los genes GREB1 y ELF5, no se observaron diferencias entre ambas líneas celulares. Este resultado sugiere que, para algunos sitios de unión, la expresión de GR afecta la unión de PR activo.

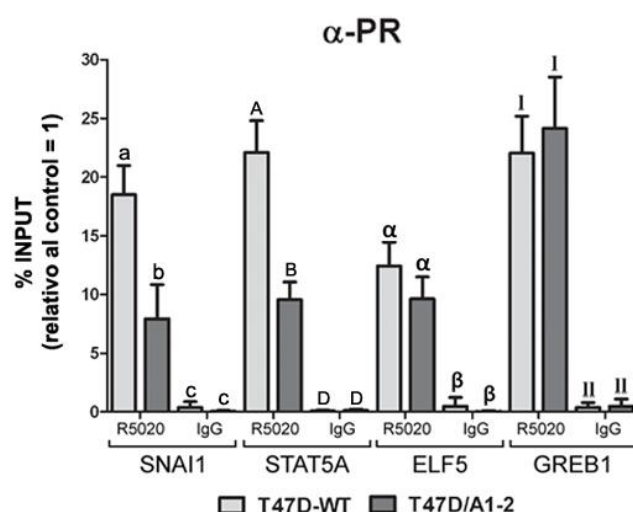


Figura R-9. Análisis de reclutamiento de PR en las regiones compartidas entre las líneas T47D/A1-2 vs T47D-WT tratadas durante 1 h con R5020 [10^{-8} M]. En todos los ensayos de ChIP-qPCR, se utilizó IgG como control de interacciones inespecíficas. Los datos se presentan como porcentaje de Input normalizados a la condición control y las barras muestran la media $\pm$ S.D. de tres experimentos realizados por duplicado (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

Seguidamente evaluamos en las células T47D/A1-2 el reclutamiento de ambos receptores en las distintas condiciones de tratamiento. Se observó que el reclutamiento de PR a los sitios de unión asociados a STAT5A, ELF5 y GREB1 es menor cuando las células son tratadas conjuntamente con ambas hormonas comparado con el tratamiento con R5020 (**Fig.R-10A**), mientras que es significativamente mayor en la región asociada a SNAI1. Por otro lado, cuando se

analizó el reclutamiento de GR en las mismas regiones, también se observó que la unión del GR es mayor en sitios de unión asociados con SNAI1 y STAT5A y menor en sitios de unión asociados a ELF5 y GREB1 cuando se trata las células con ambos ligandos comparados con el tratamiento con DEX sola (**Fig.R-10B**).

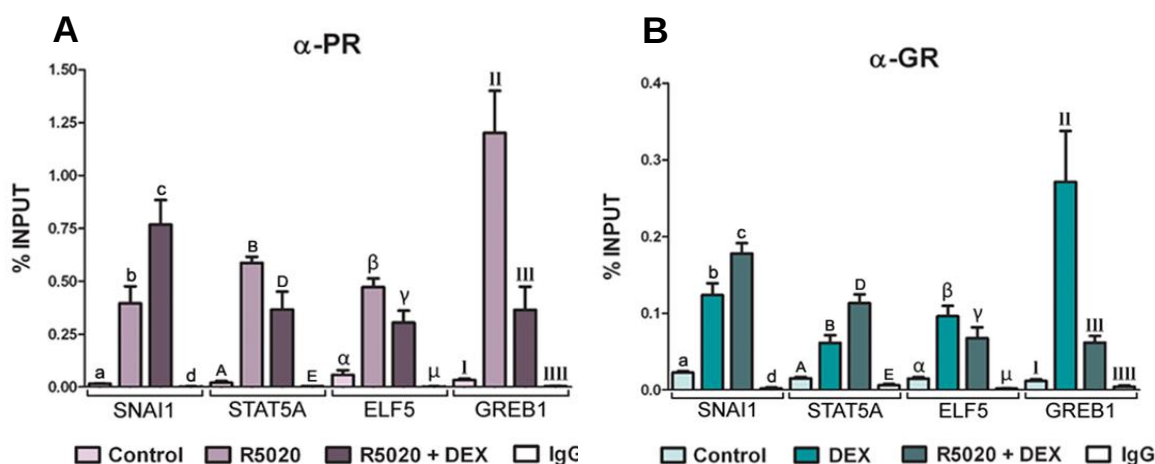


Figura R-10. Interferencia recíproca durante el reclutamiento de GR y PR en regiones regulatorias compartidas. (A) Reclutamiento de PR y (B) GR en células T47D/A1-2 tratadas durante 1 h con R5020 [10^{-8} M], DEX [10^{-8} M] o ambas hormonas. En todos los ensayos de ChIP-qPCR, se utilizó IgG como control negativo. Los datos se presentan como porcentaje de Input y las barras muestran la media $\pm$ S.D. de tres experimentos realizados por duplicado (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

Estos resultados muestran que, a pesar de compartir sitios de unión, la influencia que cada receptor activo ejerce sobre el reclutamiento del otro a los sitios de unión compartidos, es variable y dependiente del tipo de gen blanco, sugiriendo que el contexto cromatínico alrededor de cada región afecta el reclutamiento de los receptores a sus sitios específicos.

Cabe aclarar que la presencia de DEX sola no afecta el reclutamiento de PR a los sitios evaluados (**Fig. R-11 A**). Este resultado concuerda con el hecho que DEX *per se* no tiene capacidad de unirse al PR y promover su activación. Sin embargo, para nuestra sorpresa, si observamos un mayor reclutamiento del GR cuando las células son tratadas con R5020 (**Fig. R-11 B**), sugiriendo que el progestágeno podría activar al GR y promover su unión a dichas regiones. De todos

modos, dicho reclutamiento es mucho menor que el observado cuando el GR está activado con DEX (comparar **Fig.R-11 B con Fig.R-10 B**)).

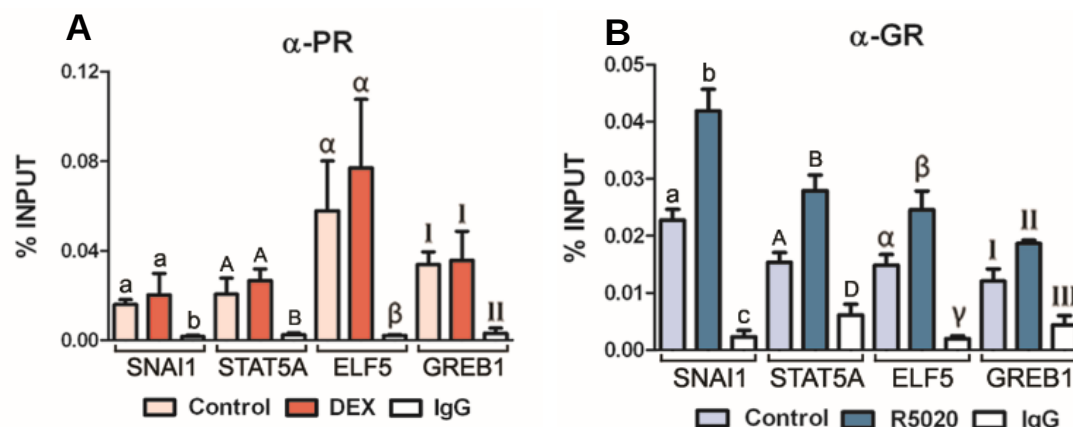


Figura R-11. Interferencia recíproca durante el reclutamiento de GR y PR en regiones regulatorias compartidas. (A) Reclutamiento de PR y (B) GR en células T47D/A1-2 tratadas con DEX [10^{-8} M] y R5020 [10^{-8} M] respectivamente. En todos los ensayos de ChIP-qPCR, se utilizó IgG como control negativo. Los datos se presentan como porcentaje de Input y las barras muestran la media $\pm$ S.D. de tres experimentos realizados por duplicado (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

En su conjunto, los resultados nos indican la existencia de una interferencia recíproca en la accesibilidad a sus sitios de unión entre ambos receptores. Específicamente es el GR, tanto activo unido a DEX como libre de glucocorticoides, el que perturbaría la regulación transcripcional mediada por PR en determinados genes progestágeno-dependientes, que contienen elementos de unión específicos compartidos por ambos receptores. Estas interferencias podrían potenciar o disminuir la expresión de dichos genes y conllevaría una modulación cruzada de la transcripción génica.

7.2.3. Análisis de reclutamiento de co-factores de transcripción en los sitios de unión específicos

Es sabido que la interacción de ambos receptores en sus HREs permite también el reclutamiento de diferentes cofactores de transcripción con actividad de remodeladores de cromatina. Ejemplo de ellos son los co-activadores p300, con actividad acetiltransferasa; la ATPasa BRG1 y el factor pionero FOXA1 (*Jin et al, 2013; He et al. al, 2015; Meyer and Carroll, 2012*), todos ellos factores que favorecen una estructura de cromatina abierta que facilita el proceso de transcripción.

Para probar el reclutamiento de estos co-activadores en las regiones estudiadas, realizamos primeramente ensayos de ChIP en células T47D-WT y T47D/A1-2 tratadas o no con R5020. Como se muestra en la figura **R-12**, el reclutamiento de BRG1 en los genes GREB1, STAT5A y ELF5 luego del tratamiento hormonal no muestran cambios significativos comparando ambas líneas celulares. No obstante, en la región compartida de SNAI1 en las células T47D/A1-2 luego del tratamiento hormonal muestra un menor reclutamiento de este co-activador en comparación a la línea WT (**Fig. R-12A**). A su vez, este último gen, cuya expresión es dependiente de R5020 muestra también un menor reclutamiento de los cofactores p300 y FOXA1 (**Fig. R-12B - C**). Por otro lado, el reclutamiento de p300 se vio también afectado en los genes STAT5A y GREB1 (**Fig. R-12B**).

Cuando se evaluó el reclutamiento de FOXA1 se observó un menor reclutamiento de dicho factor para los genes SNAI1, ELF5 y GREB1. Sin embargo, la región de STAT5A no mostró un cambio significativo en el reclutamiento de mencionado co-activador (**Fig. R-12C**).

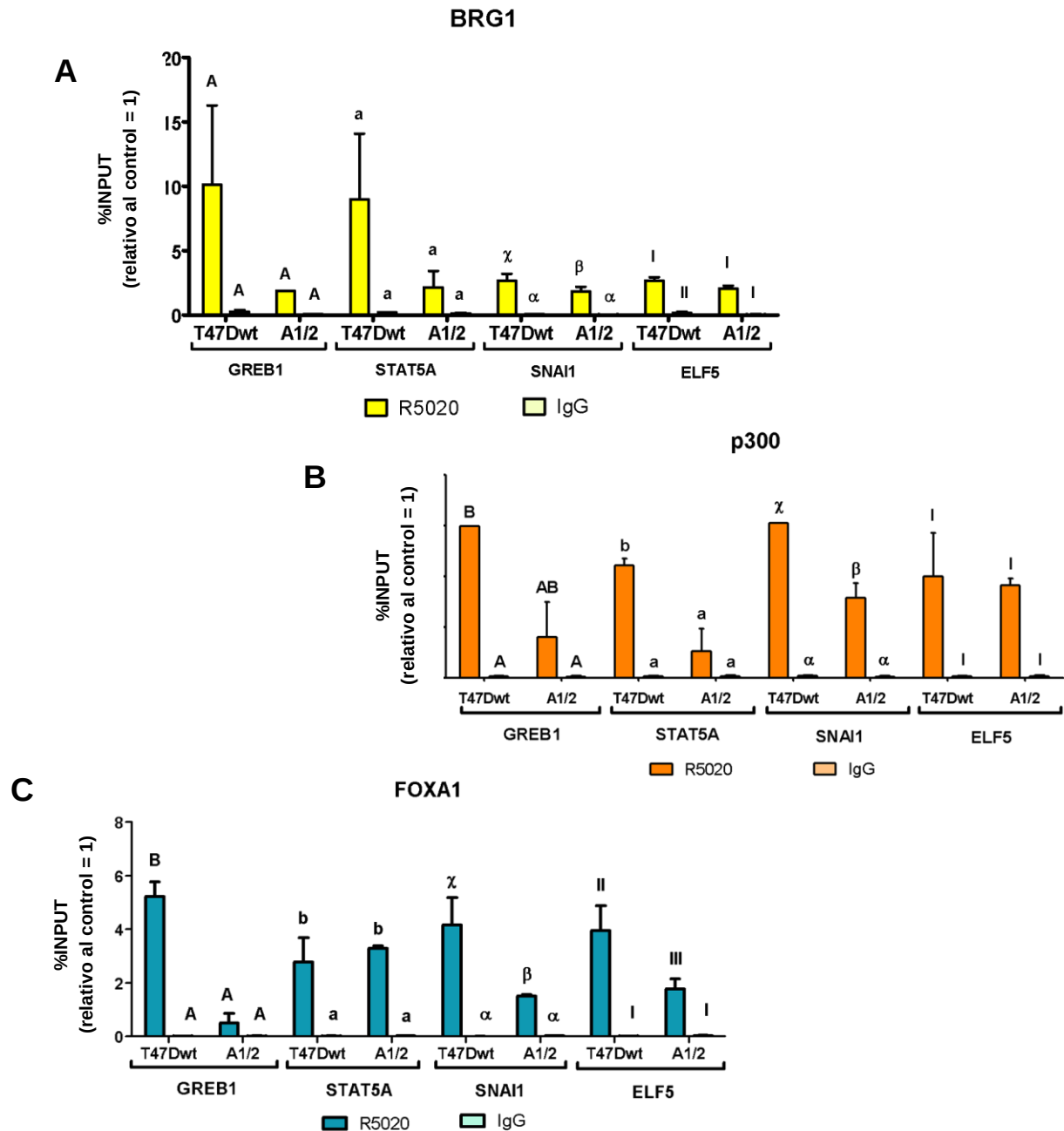


Figura R-12. El GR produce diferencias en el reclutamiento de remodeladores de cromatina. Las células T47D/A1-2 y T47D-WT fueron tratadas o no con R5020 [10^{-8} M] durante 60 min. Los ensayos de ChIP se realizaron con anticuerpos específicos para (A) BRG1, (B) p300 y (C) FOXA1. El ADN se analizó mediante qPCR para determinar la presencia de secuencias correspondientes a los sitios de regulación de los genes GREB1, STAT5A, SNAI1 y ELF5. Los datos se presentan como porcentaje de Input normalizados a la condición control y las barras muestran la media $\pm$ S.D. de tres experimentos realizados por duplicado (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

Estos resultados apoyan la idea de que el reclutamiento de GR en células T47D/A1-2 tratadas con R5020 afectaría no sólo el reclutamiento del propio PR a ciertas regiones compartidas sino también el reclutamiento de determinados remodeladores de cromatina. La tabla **R-I** muestra un resumen cualitativo de los resultados encontrados.

Región\ Factor	PR	BRG1	p300	FOXA1
SNAI1	↓	↓	↓	↓
STAT5A	↓	=	↓	=
ELF5	=	=	=	↓
GREB1	=	=	↓	↓

Tabla R-I: Resumen de los resultados del PR o del coactivador indicado. Se muestran el tipo de respuesta observado en las células T47D/A1-2 respecto a las T47D-WT.

= similar reclutamiento del co-activador; ↓disminución del reclutamiento del co-activador.

Luego, nos preguntamos si el tratamiento con DEX o la combinación de ambos ligandos (DEX + R5020) afecta el reclutamiento de los cofactores BRG1, p300 y FOXA1 en células T47D/A1-2. Si bien, al momento contamos con resultados preliminares, ya que poseemos pocas repeticiones del ensayo, observamos que cuando las células son tratadas con las hormonas de manera independiente, en general el reclutamiento de los co-activadores muestra también diferentes comportamientos. En el caso de BRG1 la presencia de DEX provocó un aumento de su reclutamiento en los genes GREB1 y STAT5A en comparación con células tratadas sólo con R5020. Por otro lado, la presencia DEX provoca un menor enriquecimiento de BRG1 en el gen SNAI1 mientras no muestra diferencias en ELF5 (**Fig. R-13A**).

En el caso de p300, la presencia de DEX provoca un menor reclutamiento en todos los genes analizados, en comparación con células tratadas sólo con R5020 (**Fig. R-13B**).

Finalmente, el reclutamiento de FOXA1 en los genes STAT5A y SNAI1 no se vería afectado cuando las células son tratadas con R5020 o DEX. Sin embargo, no se observa lo mismo con GREB1 y ELF5, donde el primero muestra un reclutamiento menor en presencia de DEX y el segundo un reclutamiento mayor (**Fig. R-13C**).

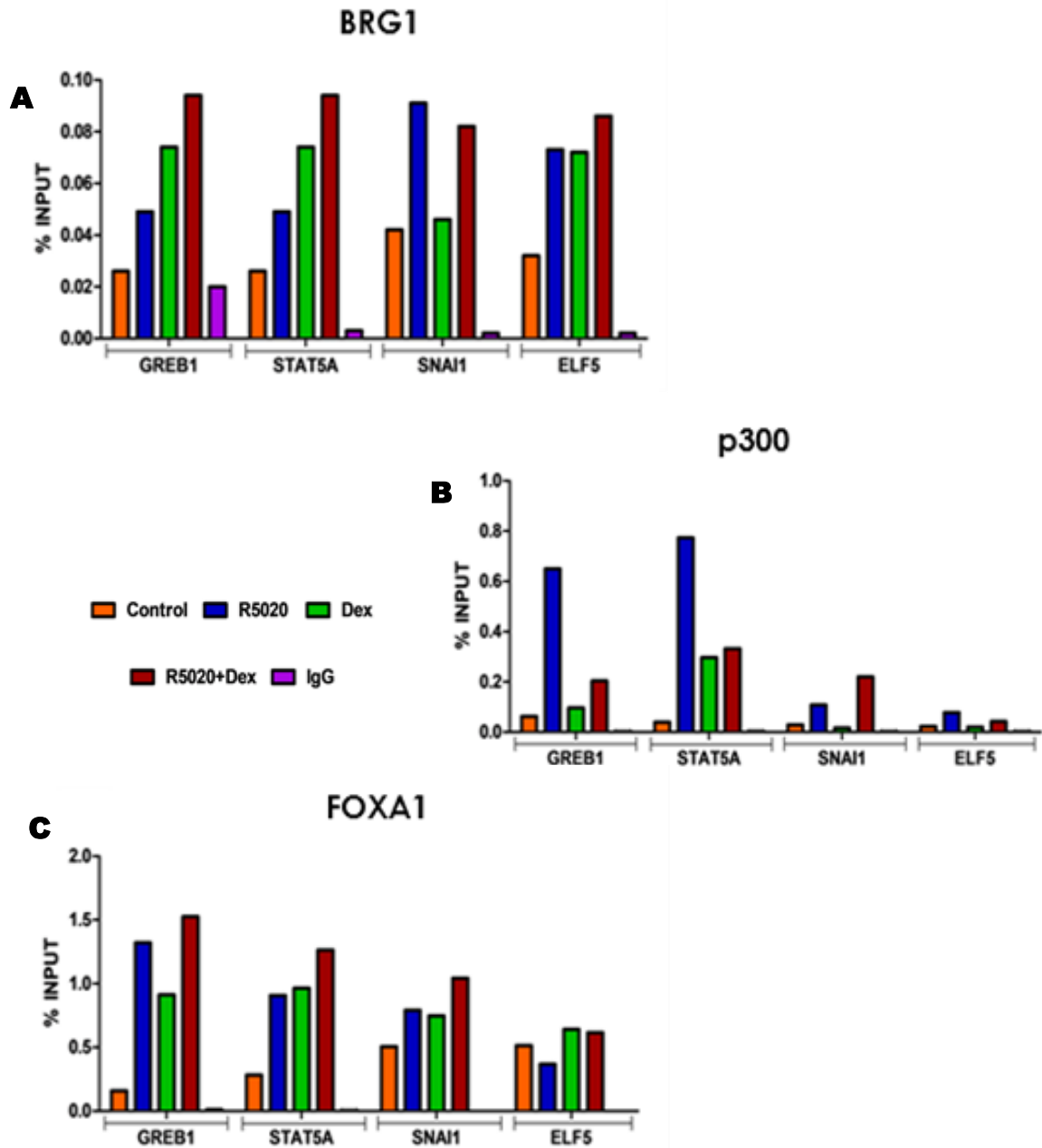


Figura R-13. El GR activo provoca un reclutamiento diferente de los remodeladores de cromatina. Las células T47D/A1-2 fueron tratadas con R5020, DEX o ambas hormonas durante 60 min. Los ensayos de ChIP se realizaron con anticuerpos específicos para **(A)** p300, **(B)** BRG1 y **(C)** FOXA1. El ADN precipitado se analizó mediante QPCR para determinar la presencia de secuencias correspondientes a los sitios de regulación de los genes GREB1, STAT5A, SNAI1 y ELF5.

Cuando analizamos el reclutamiento de los cofactores en presencia de DEX + R5020, los resultados también son muy variables. En el caso del reclutamiento de

BRG1, los genes GREB1, STAT5A y ELF5 muestran un mayor reclutamiento de este cofactor cuando ambas hormonas están presentes en comparación a cuando las células son tratadas con las hormonas por separado. No ocurre lo mismo para SNA1, donde los niveles de reclutamiento de BRG1 son similares ya sea en presencia de R5020 o con ambas hormonas (**Fig. R-13A**). Una situación muy similar se observa con el reclutamiento de FOXA1, donde GREB1, STAT5A y SNAI1 muestran un mayor reclutamiento cuando DEX + R5020 están presentes, en comparación cuando sólo se encuentra uno de los ligandos. En cambio, en el gen ELF5 se observa un reclutamiento similar de este co-activador en los casos donde están presentes ambas hormonas o sólo se encuentra DEX (**Fig. R-13C**). Sin embargo, la presencia de los dos receptores activos no favorece al reclutamiento de p300 en ninguno de los sitios analizados (**Fig. R-13B**). El bajo reclutamiento de p300 cuando el GR está activo, afectaría de alguna manera el reclutamiento de mencionado cofactor mediado por el PR.

Tomando todos estos resultados juntos, podríamos decir que la presencia del GR afectaría el reclutamiento de ciertos co-activadores que también son reclutados por el PR en ciertos genes donde ambos receptores a su vez comparten sitios de unión. No obstante, para llegar a una mejor conclusión, nos queda pendiente confirmar estos resultados preliminares.

7.2.4. Análisis de la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo

Como fue expuesto en la introducción, los receptores de esteroides tienen la capacidad de formar complejos conteniendo al menos dos moléculas de receptor. En ese sentido, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la isoforma alfa del PR (PR α) formaría parte del mismo complejo con GR, sugiriendo una interacción funcional entre ambos receptores (*Shao et al, 2006*). También, es bien conocido el diálogo cruzado que existe entre el PR con el ER, así como el GR con el ER en

células epiteliales tumorales mamarias (*Miranda et al, 2013; Karmakar et al, 2013; Mohamemed et al, 2015*).

Para comprobar si los dos receptores se encuentran asociados en un mismo complejo realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas (Co-IP) en células T47D/A1-2 sometidas a los distintos tratamientos. Para su análisis se inmunoprecipitó el PR a partir de extractos celulares y luego se realizaron WB con anticuerpos específicos anti-PR y anti-GR. Como podemos observar en la **figura R-14**, ambas isoformas del PR y el GR precipitan juntos en todas las condiciones, observándose un ligero aumento de los niveles de GR cuando las células fueron tratadas con ambas hormonas.

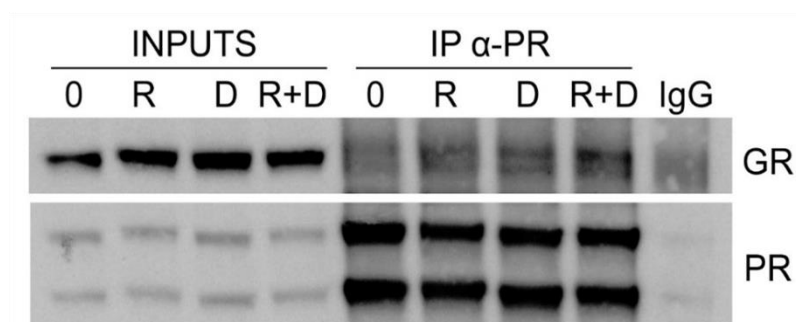


Figura R-14. PR y GR. Western Blot de una Co-Inmunoprecipitación a partir de extractos totales de células T47D/A1-2 sin tratar y tratadas sólo con R5020, DEX y ambas hormonas por 60 min. Los receptores fueron inmunoprecipitados con anticuerpos específicos para PR.

7.2.5. Análisis de la dinámica del PR y el GR en células vivas

7.2.5.1. Determinación de la localización sub-celular de ambos receptores mediante análisis de intensidades medias

Es conocido que en ausencia de ligandos, el PR y el GR se distribuyen de manera diferencial en los compartimentos celulares. Mientras que el PR se encuentra mayoritariamente en el núcleo (*Jacobsen and Horwitz, 2012*), el GR se localiza en la región del citoplasma (*Löwenberg et al, 2007*). La presencia de sus respectivos ligandos, provoca una redistribución subcelular de ambos receptores, especialmente del GR, que lo vuelve mayoritariamente nuclear. Nos preguntamos

entonces si la presencia simultánea de ambos ligandos afecta en forma cruzada la traslocación de cada receptor. Para responder esta pregunta, se llevaron a cabo análisis de intensidad media de ambos receptores en los dos compartimentos (núcleo y citoplasma) en respuesta a diferentes estímulos hormonales. Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, este estudio consiste en determinar la intensidad de emisión de fluorescencia de un dado fluoróforo. En nuestro caso, utilizamos vectores de expresión que codifican para cada uno de los receptores fusionados a proteínas fluorescentes: mCherry-GR y eGFP-PR. Se utilizaron dos líneas celulares, primero las células BHK (*Baby Hamster Kidney*), por su fácil manipulación para llevar a cabo estudios de microscopía en células vivas y luego en las células de la línea epitelial mamaria tumoral humana T47D-Y derivada de las T47D-WT (*Sartorius et al, 1994*).

Primeramente, se realizó una curva de respuesta vs concentración en células BHK transfectadas transitoriamente con eGFP-GR, para posteriormente tratarlas con R5020 a concentraciones de 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M a fin de evaluar si el progestágeno afecta *per se* la traslocación del GR. Como se observa en la **figura R-15**, la concentración de R5020 10^{-8} M, utilizada en esta Tesis, no afecta significativamente la localización mayoritariamente citoplasmática del GR.

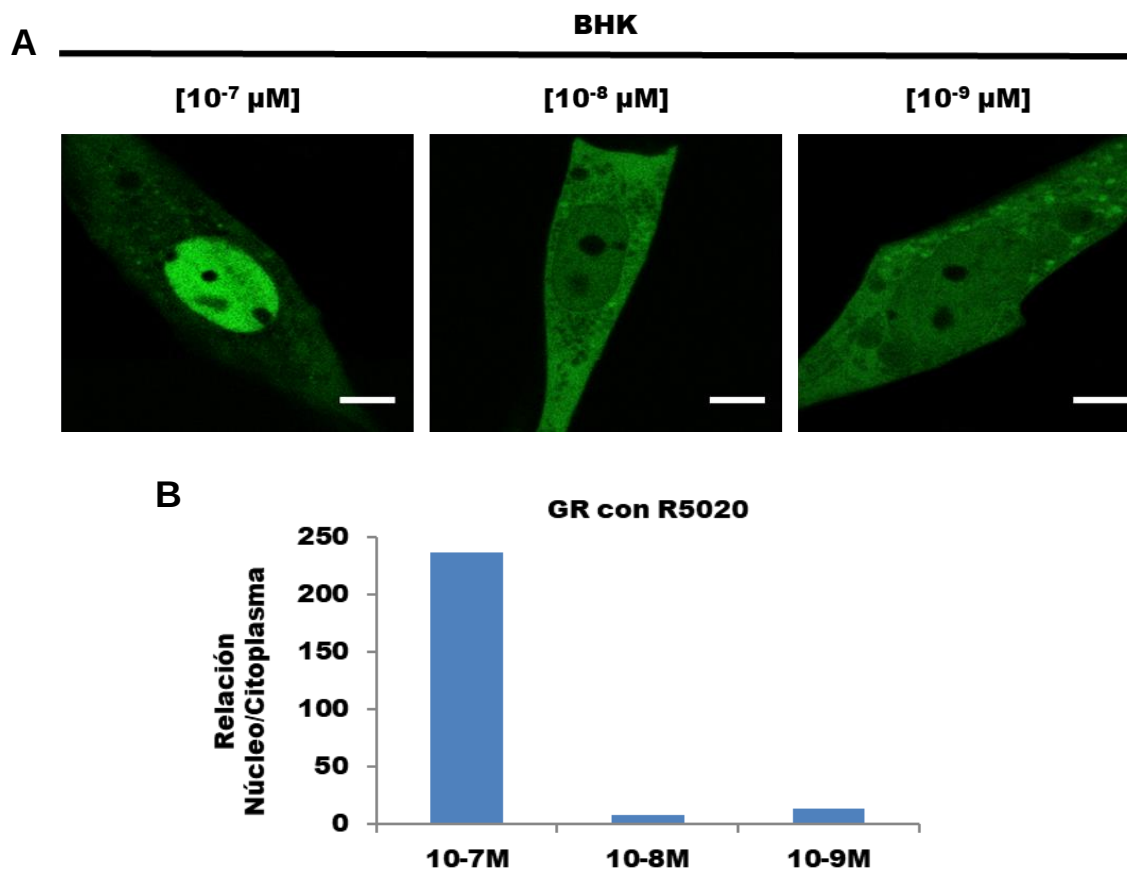


Figura R-15. Localización nuclear del GR en respuesta a diferentes concentraciones de R5020. (A) Distribución sub-celular de GFP-GR en las diferentes concentraciones del progestágeno. Se muestran células representativas (barra de escala: 7 μm). (B) Histograma de los valores de intensidad media en células BHK transfectadas tratadas por 60 min con R5020 (n=15 a 20).

Seguidamente, las células BHK se transfectaron transitoriamente con mCherry-GR y eGFP-PR. Como muestra la **figura R-16**, en condiciones de no estimulación, el PR se encuentra mayoritariamente localizado en el núcleo ($r = 2,24$) mientras que el GR presenta distribución similar entre núcleo y citoplasma ($r = 0,954$). Cuando las células fueron tratadas con R5020 o DEX los valores de intensidades medias nucleares se incrementaron significativamente respecto a la condición sin estimulación. Observamos una mayor translocación al núcleo del PR estimulado con R5020 ($r = 37,32$) y del GR activado con DEX ($r = 10,58$). Para cada receptor se observó el mismo incremento en r cuando las células fueron co-

estimuladas con ambos ligandos: $r = 34,71$ para PR (canal verde) y $r = 11,16$ para GR (canal rojo) (**Fig. R-16**).

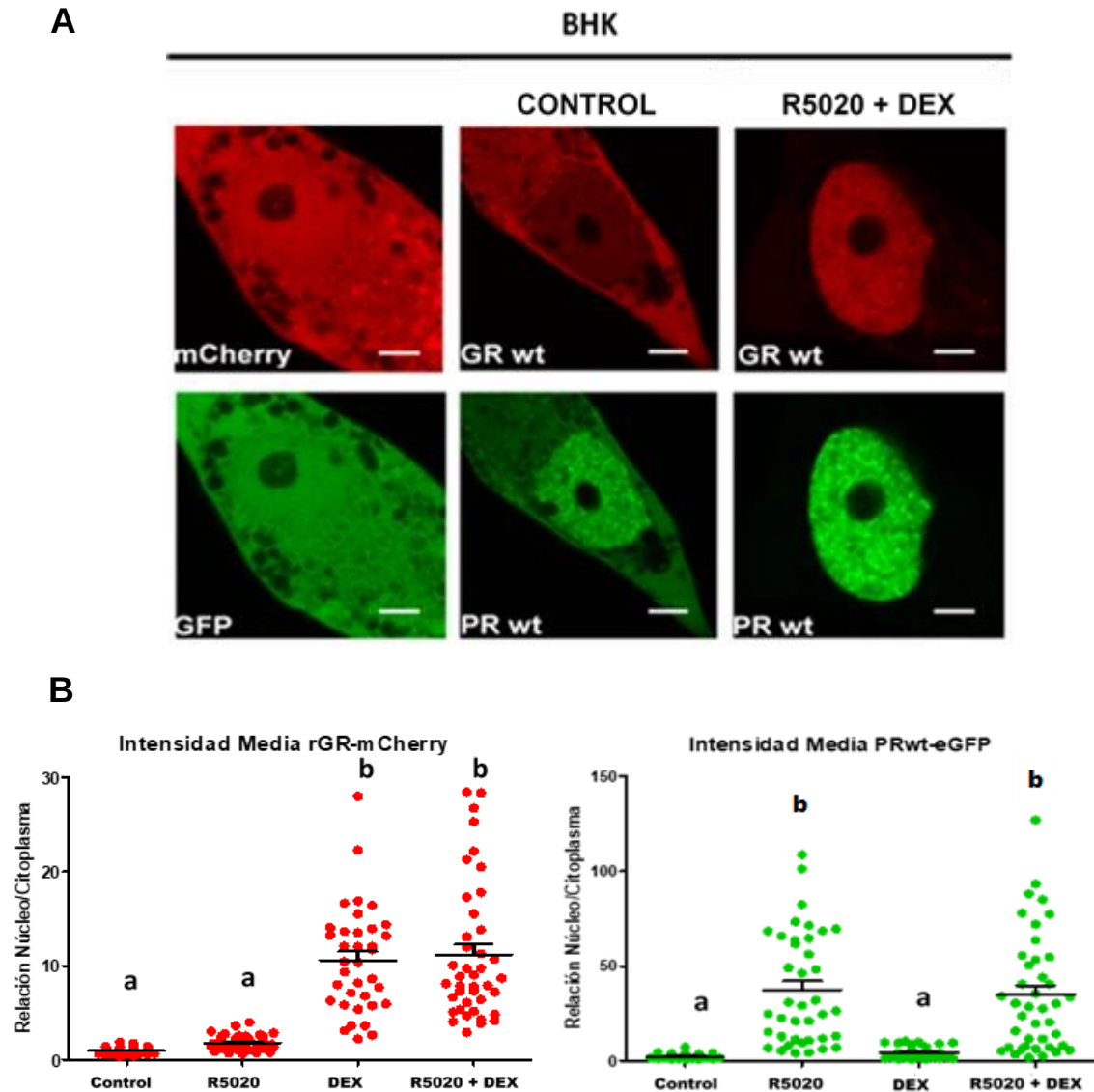


Figura R-16. Comportamiento intracelular del GFP-PR y mCherry-GR en la línea celular BHK. **(A)** Distribución sub-celular de mCherry-GR y GFP-PR y de controles negativos (mCherry y GFP). Las células fueron incubadas por 60 min. con R5020, DEX o con ambas hormonas. Se muestran células representativas (barra de escala: 7 μ m) **(B)** Diagrama de puntos que representan el valor de la intensidad media de la relación entre el núcleo y el citoplasma para GRwt y PRwt (círculos rojo y verde, respectivamente) de cada célula analizada ($n=20$ a 30). Los diagramas muestran la media $\pm$ S.D. de todas las células analizadas (valor de $p < 0.05$ usando test de Kruskal Wallis).

Para corroborar si el comportamiento de los receptores en la línea BHK, se reproduce en la línea humana epitelial mamaria tumoral, realizamos el mismo diseño experimental en las células T47D-Y (**Fig. R-17**). Como se mencionó esta línea celular es derivada de la T47D-WT y fue utilizada por no expresar PR ni GR endógenos. Los resultados son similares a los obtenidos con la línea celular BHK. Efectivamente, en células no estimuladas el PR localiza mayormente en el núcleo ($r = 3,66$) mientras que el GR se distribuye principalmente en citoplasma ($r = 0,62$). El tratamiento con sus respectivos ligandos (DEX o R5020) provocó un aumento significativo en la población nuclear de PR y GR ($r = 11,04$ y $r = 11,74$, respectivamente). En estas células la presencia conjunta de ambos ligandos aumentaría aún más la intensidad media nuclear del PR ($r = 18,90$), pero no del GR ($r = 10,08$). Cabe aclarar que no se observó traslocación nuclear cruzada de los receptores. Es decir, el valor de r del GR en células tratadas con R5020 y el valor de r del PR en células tratadas con DEX no presentaron diferencias significativas respecto de la condición control ($r = 1,57$ y $r = 3,22$, respectivamente). (**Fig. R-17B**).

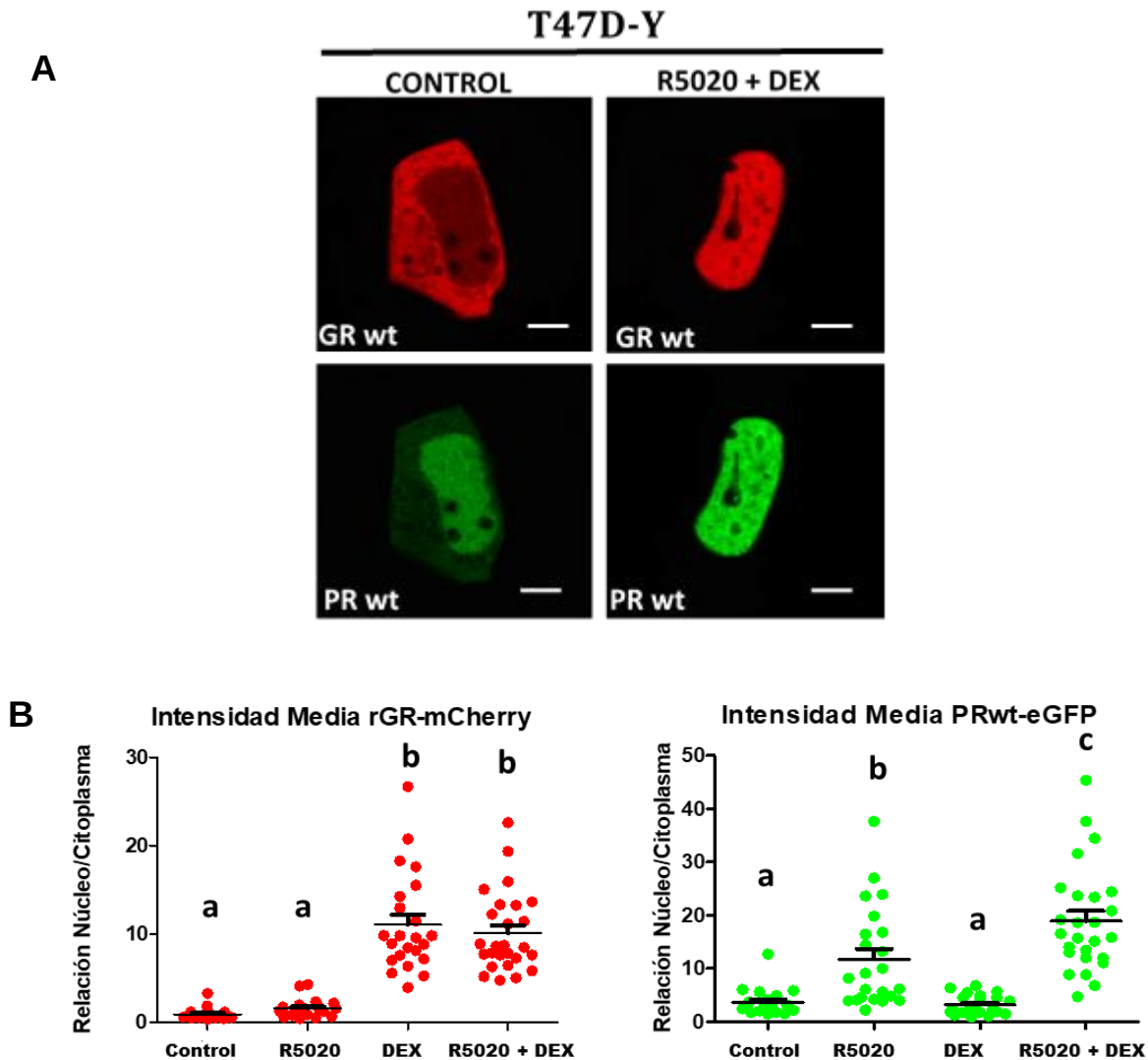


Figura R-17. Comportamiento intracelular del GFP-PR y mCherry-GR en la línea celular T47D-Y. (A) Distribución subcelular de mCherry-GR y GFP-PR. Las células fueron incubadas por 60 min. con R5020 [10^{-8} M], DEX [10^{-8} M] o con ambas hormonas. Se muestran células representativas (barra de escala: 7 μ m) (panel izquierdo). (B) Diagrama de puntos de los valores de intensidad media de PRwt y GRwt (círculos rojo y verde, respectivamente) en las diferentes condiciones de tratamiento (n=20 a 30). Los diagramas muestran la media $\pm$ S.D. de todas las células analizadas (valor de $p < 0.05$ usando test de Kruskal Wallis).

Los resultados obtenidos en ambas líneas celulares, nos sugieren que el co-tratamiento hormonal favorece la translocación de ambos receptores al núcleo similar a cuando el PR y el GR son activados por sus propios ligandos de manera independiente.

7.2.5.2. Determinación de la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo mediante análisis de Correlación Cruzada de Brillo (Bcc)

Con el objeto de evaluar si es posible detectar complejos conteniendo ambos receptores en células vivas, se transfectaron transitoriamente células BHK con los vectores de expresión que codifican cada uno de los receptores fusionados a proteínas fluorescentes (mCherry-GR y eGFP-PR). Las células fueron sometidas a los distintos tratamientos para luego analizar mediante correlación cruzada de brillo la presencia de complejos PR-GR. Como control negativo se utilizaron vectores de expresión de las proteínas fluorescentes eGFP y mCherry. Como control positivo, se utilizaron los vectores de expresión mCherryGRwt y GFPGRwt, sabiendo que esta técnica permite detectar complejos que contienen dos o más moléculas de GR cuando las células se tratan con DEX (*Presman et al, 2014*). Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos (**Fig. MyM-3**), cuando los valores de correlación de Brillo (Bcc) obtenidos para los dos canales (verde y rojo) no son significativamente distintos de cero ($Bcc = 0$), se asume que las fluctuaciones de intensidad son independientes, es decir, que no hay interacción. Si por el contrario las fluctuaciones para ambos colores dan una correlación positiva ($Bcc > 0$), ambas partículas estarían moviéndose juntas, es decir, formarían parte de un mismo complejo (*Digman et al, 2009*).

Como era de esperar, la distribución de Bcc promedio en las células transfectadas con eGFP y mCherry es simétrica alrededor de la línea del cero (**Fig.R-18 A**). Este resultado indica que bajo estas condiciones no hay formación de complejos que contengan ambas proteínas fluorescentes, ya que en promedio hay el mismo número de contribuciones positivas y negativas a la co-varianza entre las fluctuaciones observadas en cada canal. Por otro lado, en células transfectadas con mCherryGRwt y GFPGRwt y estimuladas con DEX, el valor de Bcc es mayor a 0, indicando formación de complejos (**Fig.R-18 B**). Cuando las células fueron co-transfectadas con GR y PR, y tratadas con R5020 [10^{-8} M] o con DEX [10^{-8} M] por separado, el valor Bcc también dio cero, indicando la ausencia de correlación entre

ambas proteínas fluorescentes estimuladas con cada uno de sus respectivos ligandos. Sin embargo, cuando las células fueron co-incubadas con ambos ligandos en simultáneo, el valor de Bcc aumentó significativamente. Ese valor positivo de Bcc sugiere que ambos receptores activos estarían formando parte de un mismo complejo (**Fig.R-18 A**).

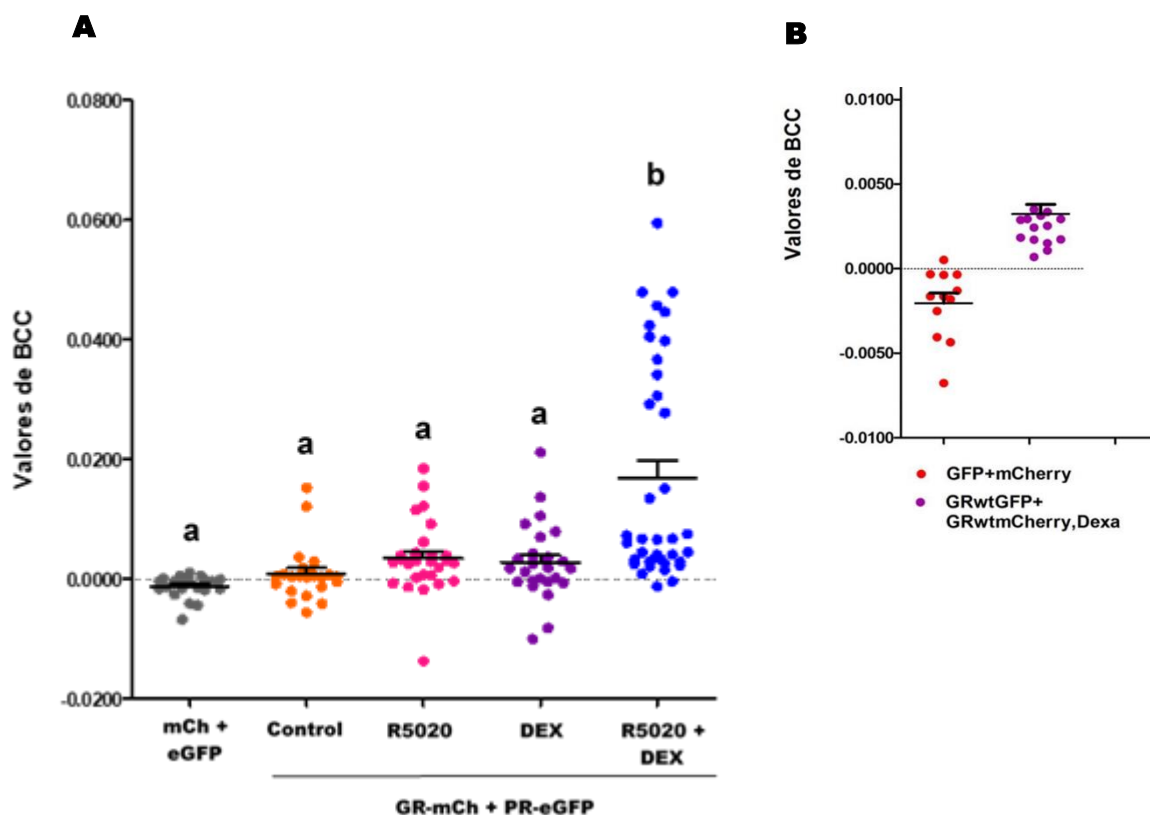


Figura R-18. Análisis de Bcc de PR y GR en células BHK. A. Diagrama de puntos representan el valor de Bcc de cada célula en cada condición analizada (n = 30 a 50). **B.** Controles negativo (eGFP + mCherry) y positivo (eGFP-GR + mCherry-GR). Los diagramas muestran la media $\pm$ S.D. de todas las células analizadas (valor de $p < 0.05$ usando test de Kruskal Wallis).

Estos resultados nos alentaron a evaluar la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo en las células epiteliales tumorales mamarias humanas. Para ello se llevó a cabo el mismo experimento utilizando la línea celular T47D-WT transfectando transitoriamente los mismos vectores de expresión y estimulando las células bajo las mismas condiciones que las utilizadas en la línea

celular BHK. Cuando las células fueron tratadas con R5020 [10^{-8} M] o con DEX [10^{-8} M] el valor Bcc fue cercano o incluso menor a cero y similares al control sin estimular, indicando la ausencia de correlación entre ambas proteínas fluorescentes y en consecuencia la ausencia de complejo formado por ambos receptores. Sin embargo, similar a lo que ocurría en la línea celular BHK, cuando las células fueron co-incubadas con ambos ligandos el valor de Bcc fue mayor a cero. Este resultado, consistente con los resultados de CO-IP (**Fig. R-14**), apoya la idea de que ambos receptores activos podrían formar parte de un mismo complejo (**Fig.R-19B**).

A pesar de que este análisis no es estrictamente cuantitativo, proponemos que ambos receptores pueden interactuar en el núcleo de células vivas estimuladas simultáneamente con ambos ligandos.

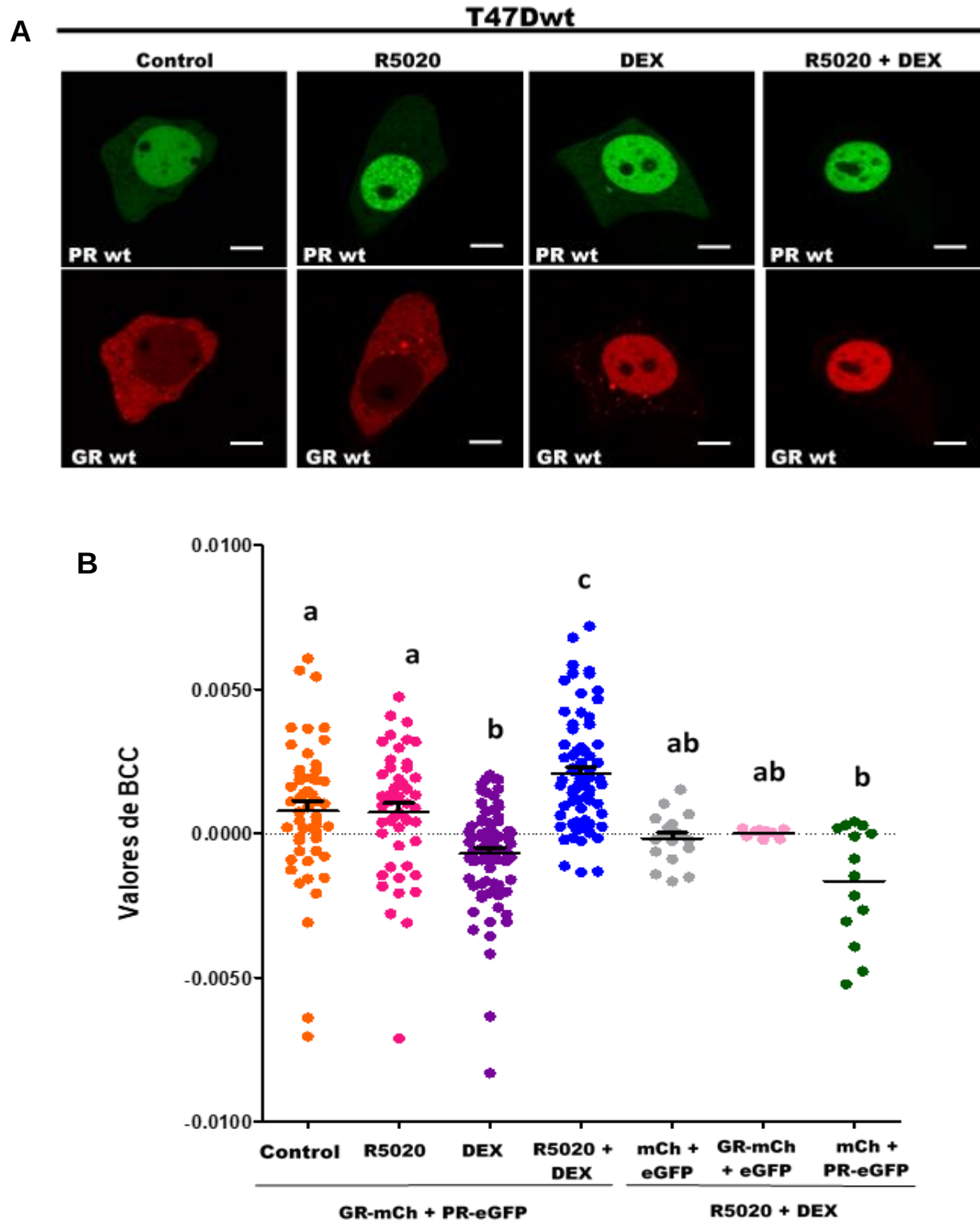


Figura R-19. PR y GR forman parte del mismo complejo. (A) Distribución sub-celular de mCherry-GR y eGFP-PR. Las células T47Dwt fueron incubadas por 60 min. con R5020, DEX o con ambas hormonas. Se muestran células representativas (barra de escala: 7 μ m) (B) Diagrama de puntos representan el valor de Bcc de cada célula en cada condición analizada (n = 30 a 50). Los diagramas muestran la media $\pm$ S.D. de todas las células analizadas (valor de p < 0.05 usando test de Kruskal Wallis).

7.2.5.3. Relevancia de los dominios de unión al ADN y de unión al ligando del GR en la formación del complejo con PR

Para caracterizar la formación de los heterocomplejos GR-PR, se utilizaron dos vectores que expresan la proteína de fusión mCherry-GR que poseen mutaciones puntuales en el dominio de unión al ADN (DBD) (mCherry-GR_DIM) (Presman et al, 2004) y en el dominio de unión al ligando (LBD) (mCherry-GR_LBD) (Presman et al, 2014) (**Fig.R-20A**). Estas mutaciones afectarían la estructura de los dímeros de GR debido a cambios conformacionales en la interfaz de dimerización asociadas a cada uno de esos dominios. Se realizaron co-transfecciones transitorias en células BHK con el vector de expresión eGFP-PR_WT y cada uno de los mencionados vectores. Las células fueron tratadas con ambas hormonas durante 60 minutos. Cuando se evaluaron los valores de Bcc, se observó que para ambos mutantes dichos valores, si bien >0 sugiriendo capacidad de formar parte de un mismo complejo con PR, esos valores fueron ligeros pero significativamente menores que el valor de Bcc observado con el mCherry-GR_WT (GR_DIM = 0.003 y GR_LBD = 0.004 vs GR_WT = 0.006) (**Fig.R-20B**). Estos resultados, abren la posibilidad de pensar que ambas mutantes podrían formar complejos menos estables con el PR o con estequiometrias diferentes.

El mismo ensayo y bajo las mismas condiciones, fue realizado en las células humanas T47D-WT. También, los valores de Bcc de las mutantes fueron significativamente menores que los del receptor WT (GR_DIM = 0.004 y GR_LBD = 0.003 vs GR_WT = 0.018) en células estimuladas con ambos ligandos (**Fig.R-20C**).

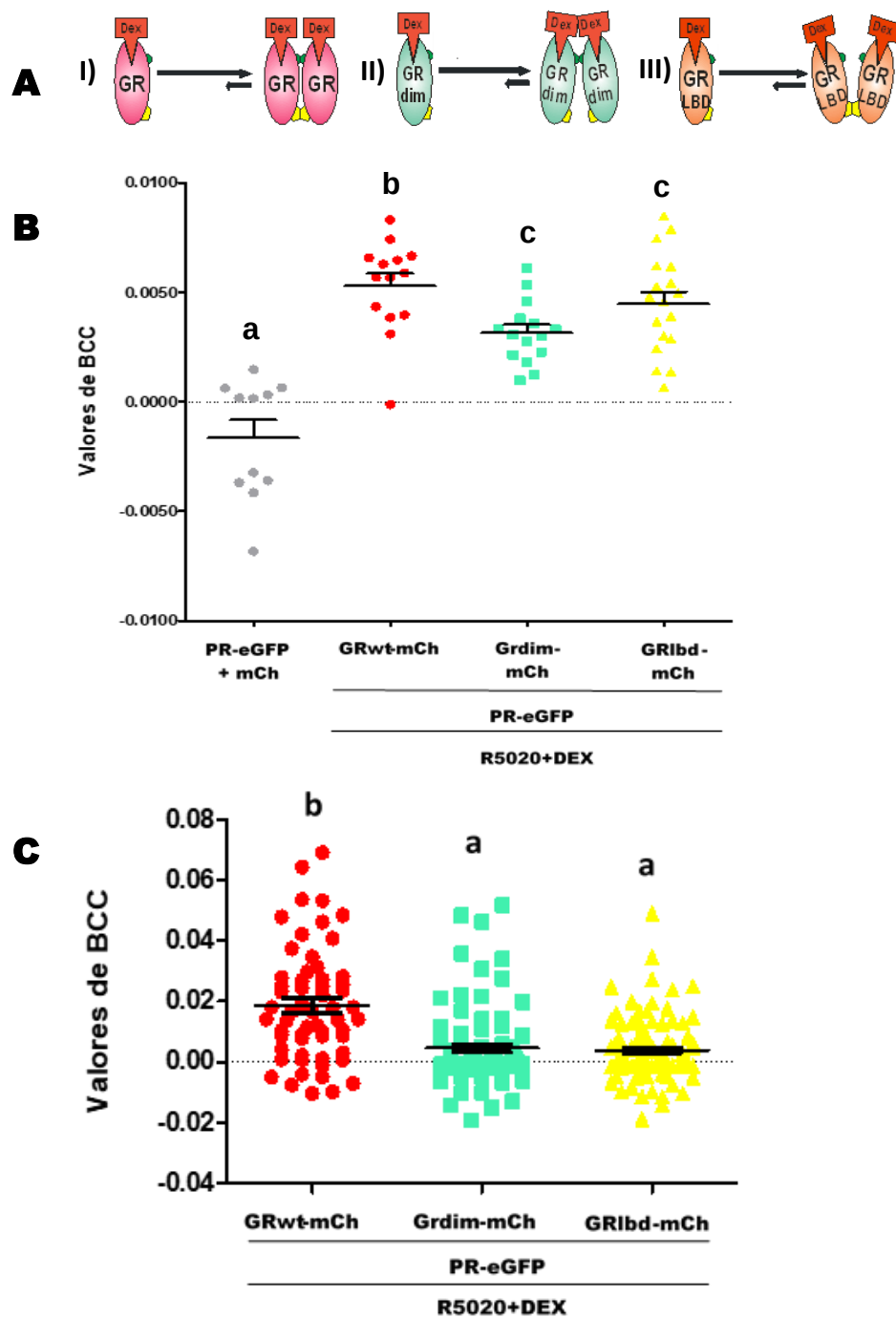


Figura R-20. (A) I) Formación de dímeros de GRwt en presencia de su ligando (Imagen adaptada de *Presman et al, 2004*). II) El GR con una mutación en el dominio de dimerización (GRdim) III) y en el dominio de unión al ligando (GRlbd), ambos en presencia del ligando. (B) Diagrama de puntos de células BHK, transfectadas transitoriamente con los diferentes plásmidos de las mutantes de GR todas en presencia de ambas hormonas durante 60 min. (n = 15). (C) Diagrama de puntos de células T47DWT transfectadas transitoriamente con los diferentes plásmidos de las mutantes de GR todas en presencia de ambas hormonas durante 60 min. (n=100). Los diagramas muestran la media $\pm$ S.D. de todas las células analizadas (valor de $p < 0.05$ usando test de Kruskal Wallis).

Teniendo en cuenta que el GR_DIM forma homodímeros conformacionalmente diferentes al GR_WT mientras que la mutante GR_LBD además forma homodímeros menos estables (*Presman et al, 2014*), el hecho de haber observado diferencias en los valores de Bcc entre las mutantes y el GR_WT sugiere que las superficies de dimerización afectadas por las mutaciones del GR, podrían estar involucradas en la formación del complejo con el PR, cuando ambos receptores se encuentran activos. Dada la similitud estructural del PR y del GR, estos hallazgos llevan a postular la posibilidad de que ambos receptores hetero-oligomericen.

7.2.5.4. Análisis de la dinámica intranuclear de GR y PR

Con el objeto de conocer la dinámica de ambos receptores en el núcleo de células vivas, se transfectaron transitoriamente células T47D-WT con los vectores de expresión mCherry-GR y eGFP-PR y luego se sometieron a los distintos tratamientos.

Posteriormente se procedió a realizar un ensayo de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS). Como se mencionó en M&M esta técnica se basa en el análisis de fluctuaciones de fluorescencia provocadas por el movimiento de partículas fluorescentes en un volumen de observación pequeño. No obstante, antes de mencionar los resultados de este ensayo, debemos aclarar que sólo analizamos los valores obtenidos del canal verde, es decir el fluoróforo eGFP-PR, esto se debe a la baja fotoestabilidad de mCherry y la débil señal detectada en este canal. En consecuencia, las AFC calculadas para este canal son más ruidosas y no se pueden sacar conclusiones concretas.

Se procedió entonces a la adquisición de datos a partir de la captura de las señales emitidas por los fluoróforos verdes en un punto aleatorio de la región nuclear. Luego se obtuvieron las curvas promedio de autocorrelación (ACF).

En la **figura R-21** se muestran las curvas de autocorrelación normalizadas en función de τ ($G(\tau)$). Las mismas describen el comportamiento del PR bajo las distintas condiciones ensayadas.

La dinámica del PR (canal verde) se ajustó a un modelo que incluye difusión y unión a dos poblaciones de sitios fijos, es decir, el PR podría estar difundiendo en el núcleo o interactuar con dos tipos de sitios fijos: lentos (t_1) y rápidos (t_2). Los primeros se caracterizan por estar en un rango de tiempo del orden de 1 a 10 segundos, mientras que los rápidos pueden estar entre 1 a 100 milisegundos.

Cuanto más hacia la izquierda se ubica la curva ACF, menores restricciones al movimiento tiene la proteína que difunde por el núcleo. Por otro lado, la geometría del núcleo impone un marco de restricciones a la movilidad de las biomoléculas que difunden. De esta manera, las interacciones entre las moléculas que difunden y, especialmente entre estas moléculas y la superficie de ciertas estructuras nucleares, como por ejemplo la cromatina, contribuyen a reducir notablemente la movilidad de las mismas, y eso se ve reflejado en el desplazamiento de las curvas ACFs hacia la derecha de la gráfica (*Mazza et al, 2012*). El ejemplo claro de menor restricciones al movimiento de una proteína dentro del núcleo es la curva del control negativo GFP + mCherry, (**Fig.R-21**). Sin embargo, el resto de las curvas se encuentran más desplazadas hacia la derecha, indicándonos que su movimiento es más restrictivo (**Fig.R-21**).

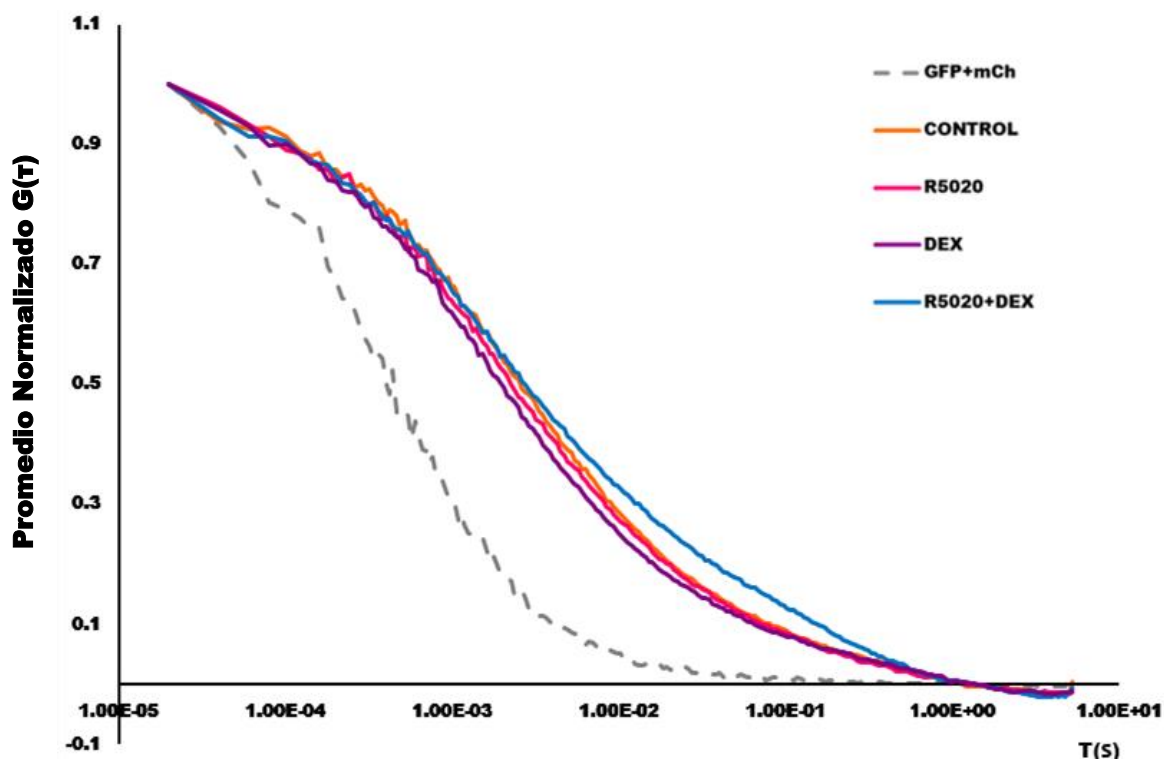


Figura R-21. Movilidad del PR en presencia del GR en el núcleo. Curvas de Autocorrelación de GFP-PR (ACFs eGFP-PR) en las diferentes condiciones de tratamiento hormonal.

A partir del análisis de las ACFs determinamos los tiempos de residencia del PR en los sitios fijos lentos (t_1) y sitios fijos rápidos (t_2), así como la fracción de moléculas unidas a los mismos (p_1 y p_2 , respectivamente). A pesar de no mostrar diferencias en los tiempos de residencia en los dos tipos de sitios fijos (**Fig.R-22A**), la fracción de moléculas de PR unidos a los sitios lentos es significativamente mayor en presencia de R5020, comparado con la condición control. Más aún, la co-incubación de R5020 con DEX, aumenta significativamente la fracción de PR unido a sitios lentos comparado con el tratamiento con el progestágeno solo. Por otro lado, la fracción de PR unido a sitios rápidos no mostró diferencias en ninguno de los tratamientos (**Fig. R-22B**).

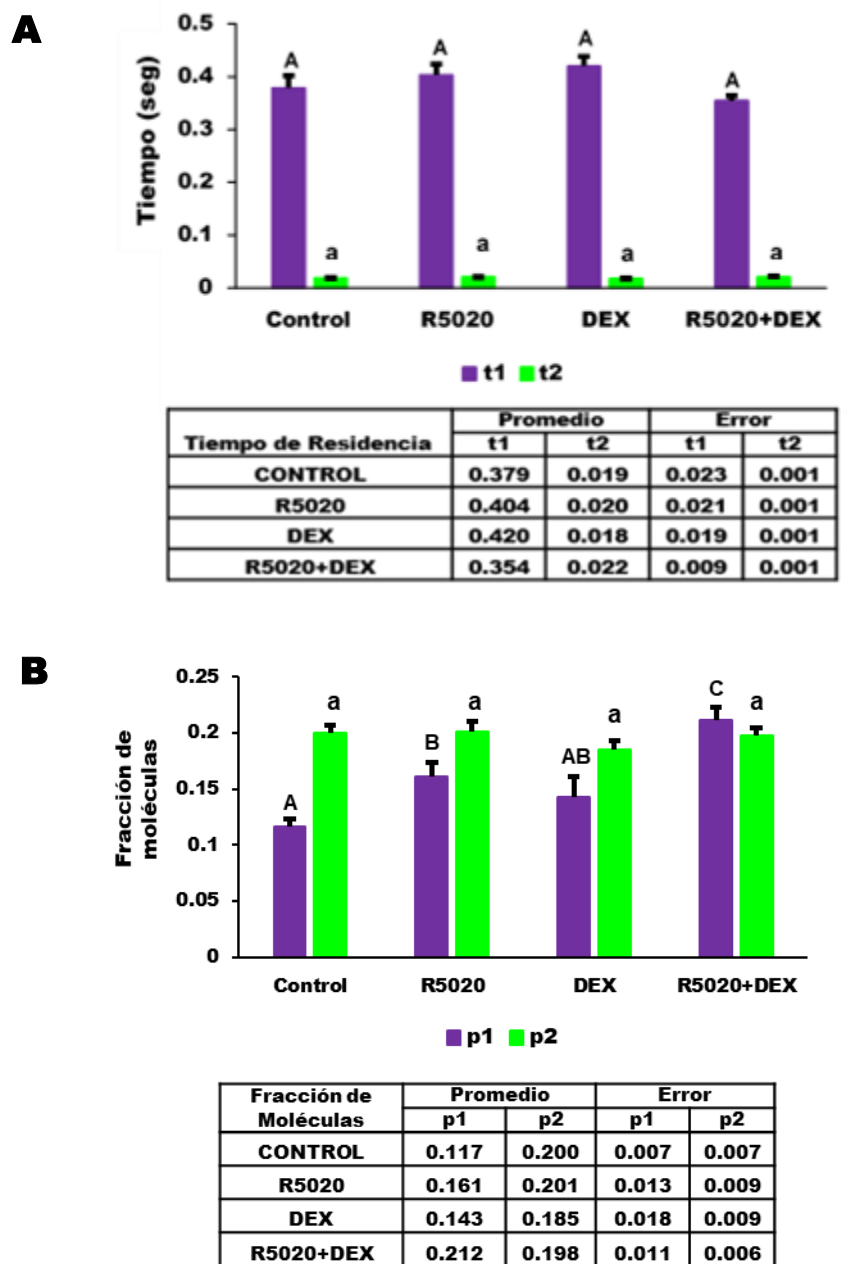


Figura R-22. La activación del GR afecta la dinámica molecular del PR. (A) Tiempo de residencia t1 y t2 de las respectivas **(B)** fracciones de moléculas de PR unida a los sitios fijos (p1) y rápidos (p2) respectivamente para cada una de las condiciones analizadas (n= 30 a 50). Los diagramas muestran la media $\pm$ S.D. de todas las células analizadas (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

De acuerdo con los estudios de Bcc, estos resultados nos sugieren que, cuando ambos receptores están activos aumentaría la formación de heterocomplejos y a su vez según el análisis ACF, este suceso provocaría un cambio en la movilidad del PR, así como un aumento significativo de su presencia en los sitios lentos. De todas maneras, queda aún pendiente evaluar el comportamiento dinámico del GR para confirmar esta hipótesis.

Uno de los resultados presentados en esta tesis indica que mutaciones puntuales que afectan las interfaces de dimerización del GR localizadas en los dominios DBD y LBD podrían influenciar en la formación de heterocomplejos con PR. Hipotetizamos que si es el heterocomplejo quien se encuentra favorablemente unido a los sitios lentos cuando ambos receptores se encuentran activos, entonces la curva de autocorrelación del PR debería verse afectada cuando el GR activo no es la variante WT sino alguna de sus variantes mutadas GR_DBD o GR_DIM. Para evaluar esta hipótesis se llevaron a cabo estudios de FCS, analizando las curvas ACFs del PR en células T47D-WT co-transfectadas con mCherry-GR_DIM y mCherry-GR_LBD y tratadas conjuntamente con ambos ligandos. Tomamos como condición control las células transfectadas con el PR y el GR salvajes tratadas con ambos ligandos.

Similar a los experimentos previos, los datos obtenidos se ajustaron a un modelo de difusión y unión a dos poblaciones de sitios fijos (*Michelman-Ribeiro et al, 2009*) (**Fig.R-23**).

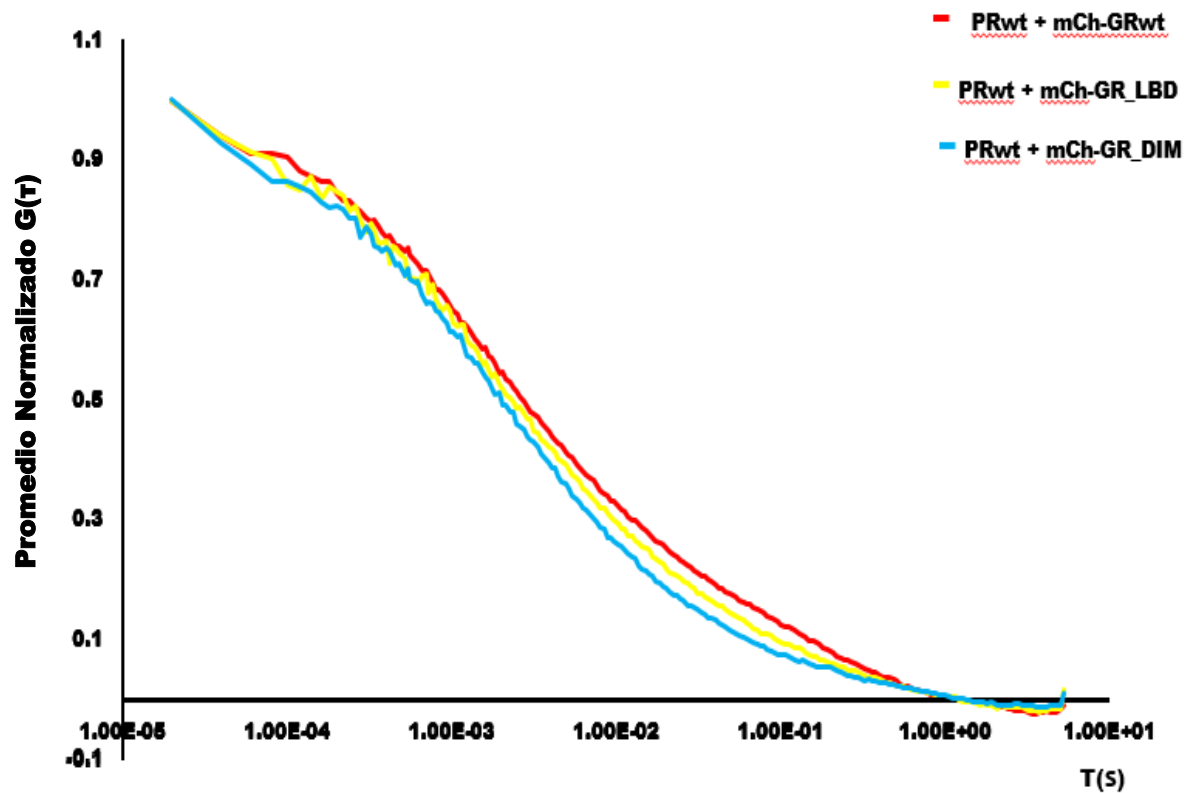


Figura R-23. Movilidad del PR en presencia de las mutantes de GR. Curvas de Autocorrelación de GFP-PR (ACFs eGFP-PR) en las diferentes condiciones de transfección con las mutantes de GR y de tratamiento hormonal.

Observamos que las curvas ACFs del PR, correspondientes a células transfectadas con las mutantes de GR se encuentran más desplazadas hacia la izquierda comparadas con la curva correspondiente a células que expresan el GR_WT. Este resultado nos indica que el PR tiene una mayor movilidad cuando las mutantes están presentes, en especial en presencia del GR_DIM (**Fig.R-23**). A pesar de que no hubo diferencias en los tiempos de residencia en las diferentes condiciones (**Fig.R-24A**), si se observó una fracción unida significativamente menor del PR activo a los sitios lentos en células que expresan el GR_DIM comparado con células que el GR_WT (**Fig.R-24B**). Estas diferencias en las fracciones de moléculas del PR unidas a sitios lentos comparando células que coexpresan el GR_WT con células que coexpresan a las variantes mutadas (especialmente el

GR_DIM) podrían deberse a una mayor población de homodímeros del PR respecto de heterodímeros o, a una dinámica diferente de los distintos heterocomplejos. Más aún, de acuerdo con los resultados de los ensayos de Bcc (sección **7.2.5.3**), los mutantes de GR podrían formar complejos menos estables con PR o complejos con estequiometrias diferentes y ambas posibilidades podrían explicar las diferencias observadas en la fracción de moléculas de PR unidas a los sitios lentos.

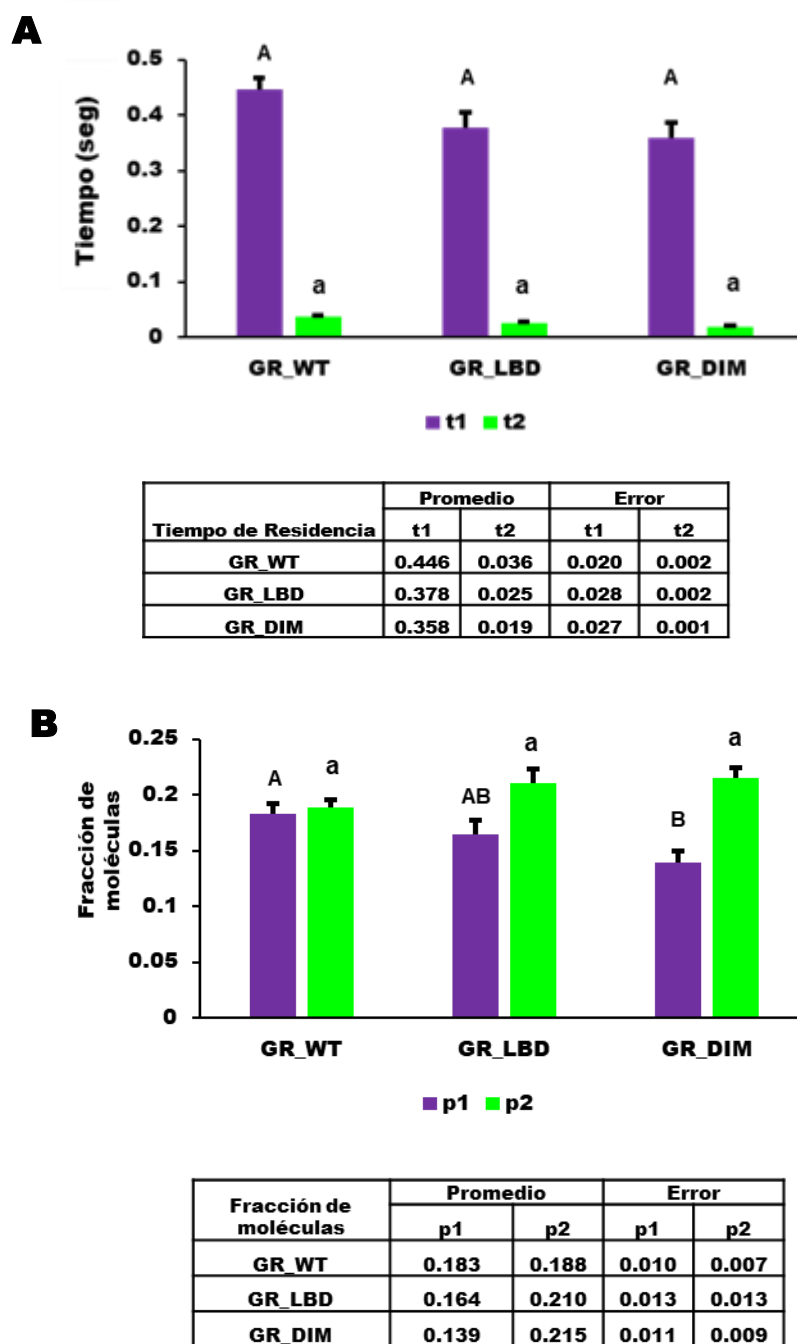


Figura R-24. Dinámica del PR en presencia de las mutantes de GR. (A) Fracción de moléculas de PR unida a los sitios fijos (p1) y rápidos (p2), **(B)** así como el tiempo de residencia del PR en mencionados sitios denominados t1 y t2, respectivamente para cada una de las condiciones (n= 20 a 40). Los diagramas muestran la media $\pm$ S.D. de todas las células analizadas (valor de $p < 0.05$ usando ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

A fin de caracterizar esas diferencias observadas en células que expresan el GR_WT respecto a aquellas que expresan las variantes mutadas, se calcularon las K_{eq} entre los complejos formados cuando ambos receptores están activados. Para su cálculo, consideramos que una vez que ambos receptores se encuentran activos, la presencia de monómeros es despreciable frente a las concentraciones de especies de mayor estado de oligomerización. Además, para nuestro cálculo también asumimos que las especies mayoritarias presentes en el núcleo celular son homodímeros de GR y de PR y heterodímeros PRGR. Por lo tanto, nos planteamos el siguiente equilibrio:



La figura **R-25** muestra los valores de constantes de asociación aparente K_{eq} correspondiente a la formación de heterocomplejos GR/PR calculadas para cada una de las variantes de GR ensayadas. Se observó que las K_{eq} de formación complejos PR/GR fue menor con las variantes mutadas del GR, en comparación con el GR_WT (**Fig.R-25A**). Esto se ve reflejado en la concentración de complejo formado (**Fig.R-25B**), siendo la del complejo PR/GR_DIM la más afectada.

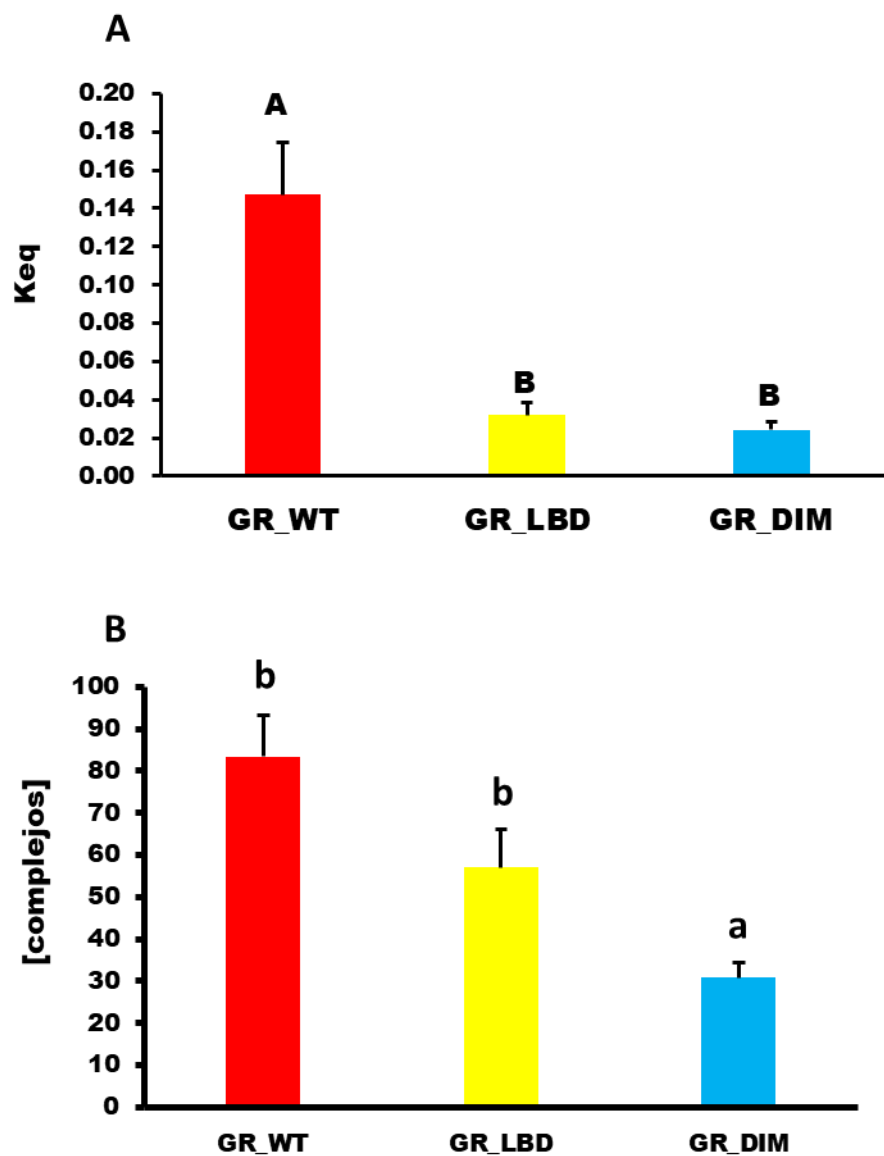


Figura 25. Valores promedio de las Keq (**A**) y la concentración de heterocomplejo formado (**B**) para cada una de las condiciones (n= 20-45). Las diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes entre sí (valor de $p < 0.05$ usando test de Kruskal Wallis).

8. DISCUSIÓN

Las células epiteliales de la mama están contenidas en un entorno fisiológico complejo, donde coexisten variadas señales hormonales y celulares. Por ello, la respuesta celular es un producto de la activación simultánea de múltiples vías de señalización, que a su vez se pueden influir mutuamente unas a otras. La existencia de un diálogo cruzado entre los diferentes receptores de esteroides ha sido propuesta en el contexto del control del desarrollo del epitelio mamario. Por ejemplo, es bien conocido el papel de los receptores PR y ER ya sea en un contexto normal como patológico tal como es el cáncer de mama. Asimismo, se sabe que en el epitelio mamario tumoral también se expresa GR. En nuestro grupo, Hoijman et al. demostraron que la activación del GR con DEX en células epiteliales mamarias indiferenciadas, en particular la línea LM3 derivada de células epiteliales tumorales de ratón (*Bal de Kier et al, 1986*), indujo la expresión de inhibidores del ciclo celular como p21CIP1 y en consecuencia redujo el proceso proliferativo de dichas células, mientras que en las células epiteliales mamarias diferenciadas reprimió la expresión de ese inhibidor del ciclo celular y promovió la supervivencia celular, indicando que el estado de diferenciación de las células epiteliales mamarias podría influir en el efecto de los glucocorticoides sobre su propio destino (*Hoijman et al, 2012*). Además, hemos determinado que la inhibición de p21CIP1 mediaría la actividad de los glucocorticoides en células mamarias diferenciadas porque la sobreexpresión de esta proteína bloqueó la protección contra la apoptosis inducida por DEX.

Sin embargo, son escasos los trabajos publicados que estudian las respuestas del PR y GR en un mismo contexto tumoral mamario. El diálogo funcional entre GR y ER ha sido ampliamente estudiado (*Karmakar et al, 2013; Mohammed et al, 2015; Hegde et al, 2016*). Los glucocorticoides ejercen un efecto antagonista sobre el crecimiento celular dependiente de estrógenos en células de carcinoma uterino y de mama ER⁺/GR⁺ (*Zhou et al, 1989; Bolt et al, 2013*) y reducen la proliferación de células de epitelio mamario tumoral humano, MCF-7 en más del 30% en comparación con las células no tratadas (*Buxant et al, 2015*).

A diferencia de los estudios de ER y GR, se sabe poco sobre la influencia de GR en la actividad transcripcional de PR. Transfecciones con PR en la línea mamaria tumoral GR+ MDA-MB-231 revelaron que la corticosterona, un GC endógeno, induce cambios morfológicos similares a la progesterona (Leo *et al*, 2004). Esto sugiere que los GC pueden regular la morfología celular a través de la vía controlada por PR. Por otra parte, hay poca información disponible sobre el efecto del tratamiento con progesterona sobre la actividad de GR en modelos de células de cáncer de mama (Karalis *et al*, 1996). Comprender cómo se comportan estos receptores es relevante no sólo desde una perspectiva fisiológica sino también farmacológica. Es por ello que en esta tesis nos enfocamos en evaluar el posible diálogo cruzado entre los receptores PR y GR en células epiteliales mamarias tumorales que expresan ambos receptores.

8.1. La presencia del GR afecta la de-diferenciación y proliferación celular inducida por R5020

El sólo hecho de que el GR se exprese en la misma célula que el PR, como ocurre en la línea celular T47D/A1-2, provoca cambios en los procesos de de-diferenciación celular (**Fig. R-1**). Es más, cuando el GR se encuentra activo por unión a su respectivo ligando, la dediferenciación celular dependiente de progestágenos se ve afectada (**Fig. R-2B**). Estos resultados se complementan con los obtenidos por Wan y Nordeen (Wan and Nordeen, 2002) y son similares a los observados en la línea celular MCF-7 (Hegde, *et al*, 2016). Más aún, estudios de nuestro laboratorio realizados con la línea celular MCF-7L, que co-expresan PR y GR endógenos, mostraron un aumento significativo del porcentaje de células en fase S cuando eran tratadas durante 18 h con R5020. Este aumento dependiente del progestágeno se vio inhibido en presencia de DEX, reforzando la idea de que el GR activado modula la proliferación celular dependiente del PR (Ogara *et al*, 2019).

Sin embargo, los parámetros de progresión tumoral evaluados en esta Tesis, es decir la capacidad de migración celular y la capacidad de formar clones a partir de una sola célula, no arrojaron resultados concluyentes. Estos últimos resultados podrían deberse a que las respuestas celulares ante la presencia de progestágenos y glucocorticoides son más complejas como para producir una respuesta celular visible en las condiciones ensayadas.

8.2. El GR modula el contexto cromatínico durante la transcripción de genes dependientes de progestágenos

Los genes que evaluamos en esta tesis fueron elegidos a partir de los estudios de ChIP-Seq llevados a cabo por nuestro grupo (*Ogara et al, 2019*). De acuerdo con la literatura, inicialmente las regiones regulatorias de estos genes habían sido clasificadas como blancos del PR (*Hilton et al, 2010; Ballere et al, 2013; Wierer et al, 2013; Lee et al, 2013; Kougioumtzi et al, 2014; Hodgkinson and Vanderhyden, 2014; Haines et al, 2018*). No obstante, en esta Tesis se pudo determinar que el GR también puede reconocer a las mencionadas regiones.

Los niveles de expresión de los 4 genes evaluados nos muestran respuestas diferentes. La mera expresión del GR afecta la expresión dependiente del PR de los cuatro genes. Sin embargo, cuando el GR se activa con DEX la expresión de GREB1 y STAT5A dependiente de PR disminuye mientras que la expresión de SNAI1 y ELF5 se potencia. Estos resultados toman más solidez al observar que el silenciamiento del GR restituye la respuesta transcripcional del PR. Sin embargo, los mismos difieren con los observados en la línea celular epitelial tumoral MCF-7L, donde la presencia del GR activo con DEX inhibió la expresión de STAT5A y SNAI1, y aumentó la de GREB1 y ELF5 (*Ogara et al, 2019*). Esto nos lleva a pensar que estas diferencias observadas en la expresión de los genes entre las líneas celulares evaluadas, podría deberse a distintos estados epigenéticos en los sitios de unión de los receptores.

Por otro lado, los resultados de ChIP-qPCR mostraron un efecto complejo específico en cada uno de los genes analizados. Para SNAI1, tanto GR como PR activos se unen independientemente a los sitios compartidos y, de manera consistente, aumentan la transcripción de ambos genes. Por otro lado, el GR activo inhibe la expresión de STAT5A dependiente de progestágenos. Se observa un efecto transcripcional similar sobre GREB1, sin embargo, tanto GR como PR disminuyen su unión a los sitios compartidos. Este efecto complejo visto en el reclutamiento de los receptores podría deberse a que ambos son reclutados de manera simultánea a dichos sitios. En ese sentido, los resultados obtenidos en el ChIP secuencial realizado por Ogara y colaboradores (*Ogara et al, 2019*), apoyan esa hipótesis. De hecho, con sólo la presencia de R5020, se observó un reclutamiento simultáneo de PR y GR en las regiones compartidas; e incluso la co-estimulación con ambas hormonas, aumentó aún más el mencionado reclutamiento. La evidencia del reclutamiento simultáneo de ambos receptores a esos sitios compartidos nos permite interpretar aún mejor los resultados obtenidos en el análisis del reclutamiento de los cofactores y apoyan la idea de que el GR interfiere en la actividad del PR en dichos sitios.

Todos estos resultados, nos indican que ambos receptores activados modularían mutuamente sus actividades transcripcionales. A pesar de que DEX *per se* no afectó el reclutamiento del PR, para nuestra sorpresa también se reclutó GR en aquellas regiones reguladoras en células solamente tratadas con R5020, apoyando la idea de que el GR se une a las regiones compartidas y afectaría el reclutamiento del PR aún en ausencia de DEX. Esto fue observado en los análisis de ChIP-seq realizado por Ogara y colaboradores (*Ogara et al, 2019*), donde se identificaron un total de 321 sitios únicos de unión del GR cuando las células son estimuladas con R5020. El análisis de motivos *de novo* en estas regiones únicas de GR+R5020 están relacionadas con los motivos REL y no con el motivo del GRE canónico (*Ogara et al, 2019*).

Se sabe que los SRs requieren la interacción con diferentes co-reguladores para poder regular la expresión génica. Esto conduce a la formación de complejos proteicos que requieren un ensamblaje preciso y secuencial de sus diferentes participantes. Como los SRs comparten una gran homología estructural, resulta complejo poder determinar diferencias en cuanto al reclutamiento y afinidad por los diferentes co-reguladores. A pesar de ello, es bien conocido que el PR y el GR exhiben un reclutamiento similar en algunos co-reguladores y en otros un reclutamiento más preferencial. Por ejemplo, en el caso de la familia de los SRCs, el PR es más afín por la familia de los SRC-1 y el GR por SRC-2, esto conlleva al reclutamiento posterior de proteínas co-reguladoras específicas (*Li et al, 2003*). Por otro lado, están aquellos co-activadores como FOXA1, p300 y BRG1 que muestran un reclutamiento muy similar entre los receptores (*Li et al, 2003; Brosens et al, 2004; Severson et al, 2018*). Sin embargo, en base a los trabajos publicados, no fueron analizados en un sistema donde el PR y el GR estén co-expresados. Los ChIP-s llevados a cabo en esta tesis nos muestran que la presencia del GR provoca una disminución en el reclutamiento de FOXA1, p300 y BRG1 a los sitios progestágenos dependientes que también unen GR. Esta disminución en el reclutamiento de los co-activadores podría ser una pequeña evidencia de que el GR “ajustaría” la respuesta transcripcional del PR. Este mecanismo ya fue propuesto en la interacción entre el ER y el GR en células tumorales mamarias, donde se requiere la presencia de co-activadores como SRC-2 y SRC-3, así como un componente mediador MED14 (por su sigla en inglés, *Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14*), para que de manera cooperativa regulen la expresión de determinados genes dianas (*Bolt et al, 2013*).

8.3. El GR y el PR se encuentran en un mismo heterocomplejo

Los datos obtenidos a partir de los abordajes experimentales como co-inmunoprecipitación y análisis de intensidades medias, nos demostraron que el comportamiento del PR y GR co-activos en el mismo sistema es similar a cuando cada receptor es inducido de manera independiente.

Por otro lado, poco se sabe de la dinámica y el comportamiento del GR y el PR co-activados en un mismo sistema. Los resultados obtenidos por correlación cruzada de brillo nos mostraron que ambos receptores formarían parte de un mismo complejo cuando ambos se encuentran activos. A su vez, mediante la aplicación de la técnica de FCS, observamos que en presencia del GR, se producen cambios en la movilidad del PR, provocando que este receptor ralentice su movilidad en el núcleo celular.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de microscopía determinamos que cuando se afecta ciertos puntos de la superficie de dimerización del GR, la formación y la dinámica del heterocomplejo con el PR se verían afectadas significativamente. En presencia del mutante GR_DIM, el heterocomplejo mostró una menor constante aparente de asociación y el PR una dinámica diferente comparadas con la obtenida con del GR_WT. Este hecho sugiere que el GR_DIM podría tener afectada la interacción con el PR y también una menor unión de los posibles heterocomplejos GR_DIM/PR en sitios fijos nucleares como por ejemplo en cromatina. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en las simulaciones realizadas en el trabajo del Dr. Álvarez (*Alvarez et al, 2017*) que indican que el mutante GR_DIM produce una reorganización local del dominio DBD del receptor que modifica el entorno químico de los átomos adyacentes a esta región (*Álvarez et al, 2017*).

Cabe aclarar que el cálculo de la constante aparente de formación del heterocomplejo, si bien permitió comparar el comportamiento entre las variantes del GR, tuvo en cuenta varios supuestos a modo de simplificar el análisis. En ese sentido, resultados de Presman y colaboradores (*Presman et al, 2016*) demuestran que ambos receptores tienen la capacidad de formar homo-dímeros y homotetrámeros, por lo que nos podríamos preguntar si en el heterocomplejo formado entre GR y PR realmente existe como heterodímero o con diferentes estequiometrías. De ser así, ¿cuál sería la estequiometría predominante? y ¿cómo influye la formación de los heterocomplejos en la modulación transcripcional de aquellos genes cuyos elementos de respuesta son compartidos por ambos receptores? Esta

idea nos lleva también a pensar que en presencia de ambos ligandos coexisten en el núcleo celular homo-oligómeros GR-GR, PR-PR y heterocomplejos GR-PR, estos últimos podrían ser con distintas estequiometrías (i.e 1:1; 1:3; 3:1), que competirían por los mismos sitios de unión específica. ¿Cuánto afectarán esos complejos el resultado de la transcripción de cada uno de esos genes? En ese sentido, como se discutió anteriormente, nuestros resultados muestran que el GR modula a la actividad transcripcional del PR de manera diferencial según la estructura del elemento de respuesta presente en los distintos genes cuya expresión es dependiente de progestágenos (i.e no la afecta, como ocurre en ELF5 y GREB1 o la inhibe, como es el caso de SNAI1 y STAT5A). Asimismo, se observó que el GR también influye diferencialmente el reclutamiento de cofactores en esos elementos de respuesta. ¿Dicha variabilidad de acciones será consecuencia de diferencias estructurales de los heterocomplejos formados? Todas estas, son preguntas que surgen a partir de los resultados de este trabajo de Tesis y que quedan aún pendientes de responder en futuros estudios que permitan entender las bases moleculares de la interferencia GR-PR.

La complejidad en la modulación de la actividad de los receptores y en consecuencia el tipo de maquinaria remodeladora de cromatina que se reclute, contribuye a una modulación general de la respuesta celular, como la que se observa en los ensayos de de-diferenciación y proliferación celular en las distintas condiciones estudiadas. La mayoría de los estudios de los receptores de esteroides implicados en patologías tumorales han sido analizados de manera individual y en condiciones de tratamiento con una sola hormona. Los mismos nos han permitido comprender la dinámica de cada receptor en un contexto aislado, sin embargo, fisiológica y patológicamente eso no ocurre. Las células reciben múltiples estímulos y los mismos provocan respuestas moduladas (*Truong and Lange, 2018*). Por ende, el estudio de las interacciones entre los receptores esteroides implicados en un tipo de cáncer hormono-dependiente, es significativo. Los resultados expuestos en esta Tesis abren una ventana a una mejor comprensión en aquellos tumores mamarios donde ambos receptores se expresan y en consecuencia pueden contribuir al desarrollo de nuevas terapias hormonales combinadas.

9. CONCLUSIONES

Tan sólo la presencia del GR, ya sea que se encuentre activo o no, causa una disminución en la desdiferenciación y proliferación celular provocadas por los progestágenos, sugiriendo que GR promueve y mantiene un fenotipo diferenciado en células tumorales mamarias PR+. Este efecto podría ser consecuencia de una compleja y dinámica regulación de la expresión de ciertos genes implicados en la transición epitelio-mesenquimal y en progresión tumoral.

Uno de los mecanismos involucrados en la interferencia que ejerce GR sobre la transcripción mediada por PR sería la formación de diferentes especies de heterocomplejos PRGR cuando ambas hormonas se encuentran presentes y la modulación del reclutamiento de co-activadores, tales como p300, FOXA1 y BRG1 en algunas regiones reguladoras asociadas a genes blanco del PR y del GR.

Muchas preguntas quedan abiertas a partir de los resultados de este trabajo de tesis, por ejemplo cómo influye la formación de los heterocomplejos PRGR en la modulación transcripcional de aquellos genes cuyos elementos de respuesta son compartidos por ambos receptores, cuál sería la dinámica nuclear de estos heterocomplejos y cómo afectarían el destino celular. Las respuestas a estos interrogantes, permitirán sin duda echar luz sobre las bases moleculares que gobiernan la respuesta hormonal.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Hafiz H., Takimoto G.S., Tung L., Horwitz K.B. The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression, *J. Biol. Chem.* 277 (37) (2002) 33950–33960, 3395.

Abdel-Hafiz HA, Dudevoir ML, Perez D, Abdel-Hafiz M, Horwitz KB. SUMOylation Regulates Transcription by the Progesterone Receptor A Isoform in a Target Gene Selective Manner. *Diseases*. 2018 Jan 2;6(1):5.

Abdel-Hafiz HA, Horwitz KB. Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Mar; 140:80-9.

Allred D. C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Modern Pathology* 23 (2010) S52-S59.

Almlof, T., Gustafsson, J. A. and Wright, A. P. (1997) Role of hydrophobic amino acid clusters in the transactivation activity of the human glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 17, 934–945

Almlof, T., Wallberg, A. E., Gustafsson, J. A. and Wright, A. P. (1998) Role of important hydrophobic amino acids in the interaction between the glucocorticoid receptor tau 1-core activation domain and target factors. *Biochemistry* 37, 9586–9594

Álvarez L.D., Síntesis, actividad biológica y bases moleculares de acción de análogos rígidos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales, *Química Organica*, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2009.

Álvarez LD, Presman DM, Pecci A. Molecular dynamics simulations of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain suggest a role of the lever-arm mobility in transcriptional output. *PLoS One*. 2017 Dec 15;12(12):e0189588.

Amsterdam A., Sasson R. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis, *Mol Cell Endocrinol* 189(1-2) (2002) 1-9.

Archer TK, Lee HL, Cordingley MG, Mymryk JS, Fragos G, Berard DS, et al. Differential steroid hormone induction of transcription from the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol Endocrinol.* 1994;8:568-76.

Bachelot A, Binart N. 2007. Reproductive role of prolactin. *Reproduction* 133: 361–369.

Bal de Kier Joffe E, Puricelli L, Lustig ES. Modified adhesion behavior after in vitro passage of two related murine mammary adenocarcinomas with different metastasizing ability. *Invasion Metastasis* 1986;6:302–12

Ballare C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, Auricchio F & Beato M 2003. Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* 23 1994–2008.

Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 1995;95 (6):2435-41.

Beato M, Vicent GP. Impact of chromatin structure and dynamics on PR signaling. The initial steps in hormonal gene regulation. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;357:37-42.

Beato MH, P. and Schütz, G. Steroid hormone receptors: Many Actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83:851-7.

Beck I.M., De Bosscher K., Haegeman G., Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research, *Trends Endocrinol Metab* 22(8) (2011) 295-310.

Beck I.M., W. Berghe Vanden, Vermeulen L., Yamamoto K.R., Haegeman G., De Bosscher K. Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases, *Endocr Rev* 30(7) (2009) 830-82.

Bertucci PY, Nacht AS, Alló M, Rocha-Viegas L, Ballaré C, Soronellas D, Castellano G, Zaurin R, Kornblihtt AR, Beato M, Vicent GP, Pecci A. Progesterone receptor induces bcl-x expression through intragenic binding sites favoring RNA polymerase II elongation. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jul;41(12):6072-86.

Biggadike K, Bledsoe RK, Hassell AM, Kirk BE, McLay IM, Shewchuk LM, Stewart EL. X-ray crystal structure of the novel enhanced-affinity glucocorticoid agonist fluticasone furoate in the glucocorticoid receptor-ligand binding domain. *J Med Chem* 2008;51 (12):3349-52.

Bledsoe RK, Stewart EL, Pearce KH. Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain. *Vitam Horm* 2004;68:49-91.

Bledsoe, R.K., Montana, V.G., Stanley, T.B., Delves, C.J., Apolito, C.J., McKee, D.D., Consler, T.G., Parks, D.J., Stewart, E.L., Willson, T.M., Lambert, M.H., Moore, J.T., Pearce, K.H., Xu, H.E., 2002. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110, 93–105.

Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkilä P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Bégin LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Cafourek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Severi G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis IO, Sherman ME, Lissowska J, Anderson WF, Cox A, Cross SS,

Reed MW, Provenzano E, Dawson SJ, Dunning AM, Humphreys M, Easton DF, García-Closas M, Caldas C, Pharoah PD, Huntsman D. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 2010 May 25;7(5):e1000279.

Bolt, M. J., Stossi,F., Newberg,J.Y., Orjalo,A., Johansson,H.E. and Mancini,M.A. (2013) Coactivators enable glucocorticoid receptor recruitment to fine-tune estrogen receptor transcriptional responses. *Nucleic Acids Res.*, 41, 4036–4048.

Boonyaratanakornkit V., Bi Y., Rudd M., Edwards D.P. 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)(2008) 922–928.

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., Moras, D., 1995. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR α . *Nature* 375, 377–382.

Bresnick E.H., Dalman F.C., Sanchez E.R., Pratt W.B., Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor, *J Biol Chem* 264(9) (1989) 4992-7.

Briskin C, Kaur S, Chavarria TE, Binart N, Sutherland RL, Weinberg RA, Kelly PA, Ormandy CJ. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol* 1999, 210:96–106.

Briskin C, O'Malley B. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Dec;2(12):a003178.

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

Briskin C. Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nat Rev Cancer* 2013, 13:385–396.

Briskin Cathrin and Ataca Dalya. Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. *WIREs Dev Biol* 2015.

Brosens JJ, Tullet J, Varshochi R, Lam EW. Steroid receptor action. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004 Apr;18(2):265-83.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., Carlquist, M., 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753–758.

Burstein H. J., Temin S., Anderson H., Buchholz T. A., Davidson N. E., Gelmon K. E. et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-

positive breast cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline focused update, *J Clin Oncol.* 32 (2014) 2255-2269.

Buttgereit F., Burmester G.R., Lipworth B.J., Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear, *Lancet* 365(9461) (2005) 801-3.

Buxant,F., Kindt,N., Laurent,G., Noel,J.C. and Saussez,S. (2015) Antiproliferative effect of dexamethasone in the MCF-7 breast cancer cell line. *Mol. Med. Rep.*, 12, 4051–4054.

Buzon V, Carbo LR, Estruch SB, Fletterick RJ, Estebanez-Perpina E (2012) A conserved Surface on the ligand binding domain of nuclear receptors for allosteric control. *Mol Cell Endocrinol* 348:394–402

Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995;9 (4):401-12.

Carp HJA. Progestogens and pregnancy loss. *Climacteric.* 2018 Aug;21(4):380-384. doi: 10.1080/13697137.2018.1436166. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29565684.

Carroll, J.S., Hickey, T.E., Tarulli, G.A., Williams, M. and Tilley, W.D. (2017) Deciphering the divergent roles of progestogens in breast cancer. *Nat Rev Cancer*, 17, 54-64.

Casa, A.J., Hochbaum, D., Sreekumar, S., Lee, A.V., 2016. The estrogen receptor alpha nuclear localization sequence is critical for fulvestrant-induced degradation of the receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 424, 129–140.

Ceccato F., Boscaro M., Cushing's Syndrome: Screening and Diagnosis, *High Blood Press Cardiovasc Prev* 23(3) (2016) 209-15.

Chakrabarti R, Hwang J, Andres Blanco M, Wei Y, Lukačičin M, Romano RA, Smalley K, Liu S, Yang Q, Ibrahim T, Mercatali L, Amadori D, Haffty BG, Sinha S, Kang Y. (2012) Elf5 inhibits epithelial mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2/Slug. *Nat Cell Biol.* ;14(11):1212-1222.

Chan DW, Slaunwhite WR Jr. The binding of a synthetic progestin, R5020 to transcortin and serum albumin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977 May;44(5):983-5.

Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T. P., et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 2008, 456(7220), 350–356.

Chen Qinchang, Tan Haoyue, Yua Hongxia, Shi Wei. Activation of steroid hormone receptors: Shed light on the in silico evaluation of endocrine disrupting chemicals. *Science of the Total Environment* 631–632 (2018) 27–39.

Chen S, Smith DF. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* 1998;273 (52):35194-200.

Chen Sy, Wang J, Yu Gq, Liu W, Pearce D. Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J Biol Chem*. 1997 May 30;272(22):14087-92.

Chen T., Nuclear receptor drug discovery, *Curr Opin Chem Biol* 12(4) (2008) 418-26.

Chuffa LG, Alves MS, Martinez M, Camargo IC, Pinheiro PF, Domeniconi RF, Júnior LA, Martinez FE. Apoptosis is triggered by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Feb;23(2):65-76.

Chuffa LG, Lupi-Júnior LA, Costa AB, Amorim JP, Seiva FR. The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. *Steroids*. 2017 Feb;118:93-108.

Cittelly,D.M., Finlay-Schultz,J., Howe,E.N., Spoelstra,N.S., Axlund,S.D., Hendricks,P., Jacobsen,B.M., Sartorius,C.A. and Richer,J.K. (2013) Progesterin suppression of miR-29 potentiates dedifferentiation of breast cancer cells via KLF4. *Oncogene*, 32, 2555–2564.

Clark A.R., Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes, *Molecular and cellular endocrinology* 275(1-2) (2007) 79-97.

Clark A.R., Belvisi M.G., Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor, *Pharmacol Ther* 134(1) (2012) 54-67.

Clarke CL, Graham JD. Non-overlapping progesterone receptor cistromes contribute to cell-specific transcriptional outcomes. *PLoS One*. 2012;7:e35859.

Cole T.J., Glucocorticoid action and the development of selective glucocorticoid receptor ligands, *Biotechnol Annu Rev* 12 (2006) 269-300.

Collingwood,T.N. Urnov F.D., Wolffe A.P., Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription, *J Mol Endocrinol* 23(3) (1999) 255-75.

Contrò Valentina, Basile John R., Proia Patrizia. Sex steroid hormone receptors, their ligands, and nuclear and non-nuclear pathways[J]. *AIMS Molecular Science*, 2015, 2(3): 294-310.

Courtin A, Communal L, Vilasco M, Cimino D, Mourra N, de Bortoli M, Taverna D, Faussat AM, Chaouat M, Forgez P, Gompel A. Glucocorticoid receptor activity discriminates between progesterone and medroxyprogesterone acetate effects in breast cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jan;131(1):49-63.

Coutinho A.E., Chapman K.E., The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights, *Mol Cell Endocrinol* 335(1) (2011) 2-13.

Csapo AI, Pulkkinen MO, Kaihola HL. The effect of luteectomy-induced progesterone-withdrawal on the oxytocin and prostaglandin response of the first trimester pregnant human uterus. *Prostaglandins*. 1973 Sep;4(3):421-9. doi: 10.1016/0090-6980(73)90030-0. PMID: 4783575.

Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Gräf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S; METABRIC Group, Langerød A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Børresen-Dale AL, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C, Aparicio S. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012 Apr 18;486(7403):346-52.

Czar MJ, Lyons RH, Welsh MJ, Renoir JM, Pratt WB. Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Mol Endocrinol* 1995;9 (11):1549-60.

Dahlman-Wright K., Wright A., J Gustafsson.A., J Carlstedt-Duke., Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids, *J Biol Chem* 266(5) (1991) 3107-12.

Davies TH, Ning YM, Sanchez ER. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem* 2002;277 (7):4597-600.

De Bosscher K, Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 2009;23 (3):281-91.

De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G., Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB, *Oncogene* 25(51) (2006) 6868-86.

De Martino MU, Bhattachryya N, Alesci S, Ichijo T, Chrousos GP, Kino T. The glucocorticoid receptor and the orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II interact with and mutually affect each other's transcriptional activities: implications for intermediary metabolism. *Mol Endocrinol* 2004;18 (4):820-33.

Deeg H.J., Henslee-Downey P.J., Management of acute graft-versus-host disease, *Bone Marrow Transplant* 6(1) (1990) 1-8.

Delaunay, F., Pettersson, K., Tujague, M. and Gustafsson, J. A. (2000) Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol. Pharmacol.* 58, 584–590

Derendorf H., Hochhaus G., Mollmann H., Barth J., Krieg M., Tunn S., Mollmann C., Receptor-based pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of corticosteroids, *J Clin Pharmacol* 33(2) (1993) 115-23.

Deroo BJ, Archer TK. Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene* 2001;20 (24):3039-46.

Dieken ES, Miesfeld RL. Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis. *Mol Cell Biol* 1992;12 (2):589-97.

Diep, C.H., Charles, N.J., Gilks, C.B., Kalloger, S.E., Argenta, P.A. and Lange, C.A. (2013) *Cell Cycle*, 12, 1433-1449

Digman M.A., Dalal R., Horwitz A.F., Gratton E., Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope, *Biophys J* 94(6) (2008) 2320-32.

Digman M.A., Gratton E., Imaging barriers to diffusion by pair correlation functions, *Biophys J* 97(2) (2009) 665-73.

Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD, Pratt WB. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor. hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J Biol Chem* 1998;273 (13):7358-66.

Dittmar KD, Pratt WB. Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem* 1997;272 (20):13047-54.

Dull, A., Goncharova, E., Hager, G., McMahon, J.B., 2010. Development of an image analysis screen for estrogen receptor alpha (ER α) ligands through measurement of nuclear translocation dynamics. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122, 341–351.

Dutertre, M. and Smith, C. L. (2003) Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: Regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol. Endocrinol.* 17, 1296–1314

Ferlay J, Forman D, Mathers CD, Bray F. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010. *Lancet.* 2012 Apr 14;379(9824):1390-1.

Filicori M, Butler JP, Crowley WF Jr. Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidences for pulsatile gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol.* 1984; 73:1638–47.

Ford, J., McEwan, I. J., Wright, A. P. and Gustafsson, J. A. (1997) Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the

N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor in vitro. *Mol. Endocrinol.* 11, 1467–1475

Frasor J, Gibori G. 2003. Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends Endocrinol Metab* 14: 118–123.

Frederick JL, Shimanuki T, diZerega GS. Initiation of angiogenesis by human follicular fluid. *Science.* 1984; 224:389–90.

Fryer CJ, Archer TK. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* 1998;393 (6680):88-91.

Galigniana, N.M., Ballmer, L.T., Toneatto, J., Erlejman, A.G., Lagadari, M., Galigniana, M.D., 2012. Regulation of the glucocorticoid response to stress-related disorders by the Hsp90-binding immunophilin FKBP51. *J. Neurochem.* 122, 4–18.

Garg D, Ng SSM, Baig KM, Driggers P, Segars J. Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2017 Sep;28(9):656-668.

Gebhardt J.C., Suter D.M., Roy R., Zhao Z.W., Chapman A.R., Basu S., Maniatis T., Xie X.S., Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells, *Nat Methods* 10(5) (2013) 421-6.

Genazzani AR (ed). *Endocrinologia ginecologica*. Editeam, Cento (FE), Italy. 2004;1–464.

Gitschier J, Drayna D, Tuddenham EG, White RL, Lawn RM. Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a BclI polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* 314: 738-740, 1985.

Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000;14 (2):121-41.

Godowski PJ, Rusconi S, Miesfeld R, Yamamoto KR. Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature* 1987;325 (6102):365-8.

Goya,L., Maiyar,A.C., Ge,Y. and Firestone,G.L. (1993) Glucocorticoids induce a G1/G0 cell cycle arrest of Con8 rat mammary tumor cells that is synchronously reversed by steroid withdrawal or addition of transforming growth factor-alpha. *Mol. Endocrinol.*, 7, 1121–1132.

Graham J. Dinny and Clarke Christine I. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocr Rev.* 1997 Aug;18(4):502-19.

Griekspoor A., Zwart W., Neefjes J., Michalides R., Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells, *Nucl Recept Signal* 5 (2007) e003.

Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol.* 2016 Sep 25;428(19):3831-49.

Grimm SL, Seagroves TN, Kabotyanski EB, Hovey RC, Vonderhaar BK, Lydon JP, Miyoshi K, Hennighausen L, Ormandy CJ, Lee AV, et al. 2002. Disruption of steroid and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development. *Mol Endocrinol* 16: 2675–2691.

Groner B, Altiock S, Meier V. Hormonal regulation of transcription factor activity in mammary epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1994 Apr;100(1-2):109-14.

Gross KL, Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19 (9):331-9.

Hagan C.R., Daniel A.R., Dressing G.E., Lange C.A., Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity, *Mol. Cell Endocrinol*. 357(1–2) (2012) 43–49.

Hagan C.R., Regan T.M., Dressing G.E., Lange CA: ck2-dependent phosphorylation of progesterone receptors (PR) on Ser81 regulates PR-B isoform-specific target gene expression in breast cancer cells, *Mol. Cell. Biol.* 31 (12) (2011) 2439–2452.

Haines, C.N., Braunreiter, K.M., Mo, X.M. and Burd, C.J. (2018) GREB1 isoforms regulate proliferation independent of ERα co-regulator activities in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 25, 735–746.

Hardman J.G., Limburt L.E., Gilman A.G., Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, 2000.

Haverinen, M., Passinen, S., Syvala, H., Pasanen, S., Manninen, T., Tuohimaa, P., Ylikomi, T., 2001. Heat shock protein 90 and the nuclear transport of progesterone receptor. *Cell Stress Chaperones* 6, 256–262.

He Hongpeng, Wang Dandan, Yao Hailin, Wei Zhaoqiang, Laia Yongwei, Hu Juan, Liu Xuena, Yijie Wang, Zhou Hao, Wang Nan, Luo Xue-Gang and Zhang Tong-Cun (2015). Transcriptional factors p300 and MRTF-A synergistically enhance the expression of migration-related genes in MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 467, Issue 4, 27 November 2015, Pages 813-820

He, B. and Wilson, E. M. (2002) The NH₂-terminal and carboxyl-terminal interaction in the human androgen receptor. *Mol. Genet. Metab.* 75, 293–298

He, B., Kemppainen, J. A., Voegel, J. J., Gronemeyer, H. and Wilson, E. M. (1999) Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH₂-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 274, 37219–37225

Heck S., Kullmann M., Gast A., Ponta H., Rahmsdorf H.J., Herrlich P., Cato A.C., A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1, *Embo J* 13(17) (1994) 4087-95.

Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., Parker, M.G., 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733–736.

Hegde, S.M., Kumar, M.N., Kavya, K., Kumar, K.M., Nagesh, R., Patil, R.H., Babu, R.L., Ramesh, G.T. and Sharma, S.C. (2016) Interplay of nuclear receptors (ER, PR, and GR) and their steroid hormones in MCF-7 cells. *Mol. Cell Biochem.*, 422, 109–120.

Heldring, N., Pawson, T., McDonnell, D., Treuter, E., Gustafsson, J.A., Pike, A.C., 2007. Structural insights into corepressor recognition by antagonist-bound estrogen receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 10449–10455.

Helsen C., Kerkhofs S., Clinckemalie L., Spans L., Laurent M., Boonen S., Vanderschueren D., Claessens F. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding, *Molecular and cellular endocrinology* 348(2) (2012) 411-7.

Helsen Christine, Claessens Frank. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382 (1) (2014) 97-106.

Hessenkemper, W., Baniahmad, A., 2012. Chaperones for proper androgen action a plethora of assistance to androgen receptor function. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 11, 321–328.

Hilton, H.N., Kalyuga, M., Cowley, M.J., Alles, M.C., Lee, H.J., Caldon, C.E., Blazek, K., Kaplan, W., Musgrove, E.A., Daly, R.J. et al. (2010) The antiproliferative effects of progestins in T47D breast cancer cells are tempered by progestin induction of the ETS transcription factor Elf5. *Mol. Endocrinol.*, 24, 1380–1392.

Hodgkinson, K.M. and Vanderhyden, B.C. (2014) Consideration of GREB1 as a potential therapeutic target for hormone-responsive or endocrine-resistant cancers. *Expert Opin. Ther. Targets*, 18, 1065–1076.

Hoijsman, E., Rocha-Viegas, L., Kalko, S.G., Rubinstein, N., Morales-Ruiz, M., Joffe, E.B., Kordon, E.C. and Pecci, A. (2012) Glucocorticoid alternative effects on proliferating and differentiated mammary epithelium are associated to opposite regulation of cell-cycle inhibitor expression. *J. Cell Physiol.*, 227, 1721–1730.

Holsboer F. The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety, *J Psychiatr Res* 33(3) (1999) 181-214.

Holst F. Estrogen receptor alpha gene amplification in breast cancer: 25 years of debate, *World J Clin Oncol.* 7 (2016) 160-173.

Horwitz KB. The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogesterins in the treatment of breast cancer? *Endocr Rev.* 1992 May;13(2):146-63.

Hovey RC, Trott JF, Ginsburg E, Goldhar A, Sasaki MM, Fountain SJ, Sundararajan K, Vonderhaar BK. 2001. Transcriptional and spatiotemporal

regulation of prolactin receptor mRNA and cooperativity with progesterone receptor function during ductal branch growth in the mammary gland. *Dev Dyn* 222: 192–205.

Hubner S., Dejage L. r, Libert C., Tuckermann J.P., The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: transrepression is not enough, *Biol Chem* 396(11) (2015) 1223-31.

Ishizuka T., Lazar M.A., The nuclear receptor corepressor deacetylase activating domain is essential for repression by thyroid hormone receptor, *Mol Endocrinol* 19(6) (2005) 1443-51.

Iwabuchi, E., Miki, Y., Ono, K., Onodera, Y., Suzuki, T., Hirakawa, H., Ishida, T., Ohuchi, N., Sasano, H., 2017. In situ detection of estrogen receptor dimers in breast carcinoma cells in archival materials using proximity ligation assay (PLA). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165, 159–169.

Jacenic D, Cygankiewicz AI, Krajewska WM. The G protein-coupled estrogen receptor as a modulator of neoplastic transformation. *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Jul 5;429:10-8.

Jacobsen B.M., Horwitz K.B. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription, *Mol. Cell Endocrinol.* 357 (1–2) (2012)18–29.

Jenkins BD, Pullen CB, Darimont BD. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12 (3):122-6.

Jenster, G., van der Korput, H. A., Trapman, J. and Brinkmann, A. O. (1995) Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 7341–7346

Jewell C.M., Scoltock A.B., Hamel B.L., Yudit M.R., Cidlowski J.A., Complex human glucocorticoid receptor dim mutations define glucocorticoid induced apoptotic resistance in bone cells, *Molecular endocrinology* 26(2) (2012) 244-56.

Jiménez-Panizo A, Pérez P, Rojas AM, Fuentes-Prior P, Estébanez-Perpiñá E. Non-canonical dimerization of the androgen receptor and other nuclear receptors: implications for human disease. *Endocr Relat Cancer.* 2019 Aug;26(8):R479-R497.

Jin Bai, Pengjin Mei, CuiPeng Zhang, Feifei Chen,ChenLi, Zhenqiang Pan, Hui Liu, Junnian Zheng (2013) BRG1 Is a Prognostic Marker and Potential Therapeutic Target in Human Breast Cancer. *PLoS ONE* 8(3): e59772

Johnston, P.A., Nguyen, M.M., Dar, J.A., Ai, J., Wang, Y., Masoodi, K.Z., Shun, T., Shinde, S., Camarco, D.P., Hua, Y., Huryn, D.M., Wilson, G.M., Lazo, J.S., Nelson, J.B., Wipf, P., Wang, Z., 2016. Development and implementation of a high-throughput highcontent screening assay to identify inhibitors of androgen receptor nuclear localization in castration-resistant prostate cancer cells. *Assay Drug Dev. Technol.* 14, 226–239.

Jones M.T., Gillham B., Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/beta-lipotrophic hormone, *Physiol Rev* 68(3) (1988) 743-818.

Judge SM, Chatterton RT Jr. Progesterone-specific stimulation of triglyceride biosynthesis in a breast cancer cell line (T-47D). *Cancer Res.* 43: 4407-4412, 1983.

Kalkhoven E., Wissink S., van der Saag P.T., B. van der Burg, Negative interaction between the RelA(p65) subunit of NF-kappaB and the progesterone receptor, *J. Biol. Chem.* 271 (11) (1996) 6217–6220.

Kamei Y., Xu L., Heinzel T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S.C., Heyman R.A., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G., A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors, *Cell* 85(3) (1996) 403-14.

Karalis K, Goodwin G, Majzoub JA. Cortisol blockade of progesterone: a possible molecular mechanism involved in the initiation of human labor. *Nat Med.* 1996 May;2(5):556-60.

Karmakar Sudipan, Jin Yetao, and Nagaich Akhilesh K. Interaction of Glucocorticoid Receptor (GR) with Estrogen Receptor (ER) α and Activator Protein 1 (AP1) in Dexamethasone-mediated Interference of ER α Activity. *the journal of biological chemistry* vol. 288, no. 33, pp. 24020–24034 (2013).

Kassel O, Herrlich P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275 (1-2):13-29.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 1990; 9:1603–1614.

Kleiman A, Tuckermann JP. Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275 (1-2):98-108.

Kloet E.R., M. Joels, F. Holsboer, Stress and the brain: from adaptation to disease, *Nat Rev Neurosci* 6(6) (2005) 463-75.

Kotaja, N., Aittomaki, S., Silvennoinen, O., Palvimo, J. J. and Janne, O. A. (2000) ARIP3 (androgen receptor-interacting protein 3) and other PIAS (protein inhibitor of activated STAT) proteins differ in their ability to modulate steroid receptor-dependent transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.* 14, 1986–2000

Kougioumtzi, A., Tsaparas, P. and Magklara, A. (2014) Deep sequencing reveals new aspects of progesterone receptor signaling in breast cancer cells. *PLoS One*, 9, e98404.

Kuhl H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric*. 2005 Aug;8 Suppl 1:3-63.

Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5925–5930

Kumar R, Thompson EB. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94 (5):383-94.

Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 1999;64 (5):310-9.

Kumar R, Thompson EB. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol* 2003;17 (1):1-10.

Kumar, R., Lee, J. C., Bolen, D. W. and Thompson, E. B. (2001) The conformation of the glucocorticoid receptor $\alpha 1/\tau 1$ domain induced by osmolyte binds co-regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 18146–18152

Lain AR, Creighton CJ, Conneely OM. Research resource: progesterone receptor targetome underlying mammary gland branching morphogenesis. *Mol Endocrinol*. 2013;27:1743-61.

Lakowicz J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, NY, USA, 2006.

Lange CA. Challenges to Refining a role for progesterone in breast cancer. *Steroid* 2008;73:914-921.

Lange, C. A. (2004) Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: Who will have the last word? *Mol. Endocrinol.* 18, 269–278

Lange, C.A., Sartorius, C.A., Abdel-Hafiz, H., Spillman, M.A., Horwitz, K.B. and Jacobsen, B.M. (2008) Progesterone receptor action: translating studies in breast cancer models to clinical insights. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 630, 94–111.

Langley, E., Kempainen, J. A. and Wilson, E. M. (1998) Intermolecular NH₂- / carboxyl-terminal interactions in androgen receptor dimerization revealed by mutations that cause androgen insensitivity. *J. Biol. Chem.* 273, 92–101

Lavery, D.N., McEwan, I.J., 2005. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem. J.* 391, 449–464.

Lee, D. K., Duan, H. O. and Chang, C. (2000) From androgen receptor to the general transcription factor TFIID. Identification of cdk activating kinase (CAK) as an

androgen receptor NH2-terminal associated coactivator. *J. Biol. Chem.* 275, 9308–9313

Lee, D. K., Duan, H. O. and Chang, C. (2001) Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation. *J. Biol. Chem.* 276, 9978–9984

Lee, H.J., Gallego-Ortega, D., Ledger, A., Schramek, D., Joshi, P., Szwarc, M.M., Cho, C., Lydon, J.P., Khokha, R., Penninger, J.M. et al. (2013) Progesterone drives mammary secretory differentiation via RankL-mediated induction of Elf5 in luminal progenitor cells. *Development*, 140, 1397–1401.

Leo, J.C., Guo, C., Woon, C.T., Aw, S.E. and Lin, V.C. (2004) Glucocorticoid and mineralocorticoid cross-talk with progesterone receptor to induce focal adhesion and growth inhibition in breast cancer cells. *Endocrinology*, 145, 1314–1321.

Levin, E.R., Hammes, S.R., 2016. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signaling by steroid receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 783–797.

Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA. Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol Cell Biol* 2007;27 (6):2266-82.

Li X, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol.* 2003 Jun;23(11):3763-73.

Li, C.I., Uribe, D.J., and Daling, J.R. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British journal of cancer* 93, 1046-1052

Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of androgens and antiandrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res* 1976;36:4610-8.

Lombardi S, Honeth G, Ginestier C, Shinomiya I, Marlow R, Buchupalli B, Gazinska P, Brown J, Catchpole S, Liu S, Barkan A, et al. Growth hormone is secreted by normal breast epithelium upon progesterone stimulation and increases proliferation of stem/progenitor cells. *Stem Cell Reports* 2014, 2:780–793.

Lonard D.M., O'Malley W. B, Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation, *Mol Cell* 27(5) (2007) 691-700.

Lonard DM, O'Malley BW. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci* 2005;30 (3):126-32.

Losel R.M., Falkenstein E., Feuring M., Schultz A., Tillmann H.C., Rossol-Haseroth Wehling K., M., Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers, *Physiol Rev* 83(3) (2003) 965-1016.

Lowenberg M., Verhaar A.P., van den Brink G.R., Hommes D.W., Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression, *Trends Mol Med* 13(4) (2007) 158-63.

Luisi B.F., Xu W.X., Otwinowski Z., Freedman L.P., Yamamoto K.R., Sigler P.B., Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA, *Nature* 352(6335) (1991) 497-505.

Lyons WR. 1958. Hormonal synergism in mammary growth. *Proc R Soc Lond Ser B* 149: 303–325.

Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, Nishio Y, Arimoto-Ishida E, Yada-Hashimoto N, Tasaka K, Murata Y. Estrogen inhibits paclitaxel-induced apoptosis via the phosphorylation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in human ovarian cancer cell lines. *Endocrinology*. 2004 Jan;145(1):49-58.

Mani SK, Mermelstein PG, Tetel MJ, Anesetti G. Convergence of multiple mechanisms of steroid hormone action. *Horm Metab Res*. 2012 Jul;44(8):569-76.

Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, Boren J, Stark R, Fazli L, et al. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *Embo j*. 2011; 30:2719-33.

Mazur EC, Vasquez YM, Li X, Kommagani R, Jiang L, Chen R, et al. Progesterone receptor transcriptome and cistrome in decidualized human endometrial stromal cells. *Endocrinology*. 2015; 156:2239-53.

Mazza D., Abernathy A., Golob N., Morisaki T., McNally J.G., A benchmark for chromatin binding measurements in live cells, *Nucleic acids research* 40(15) (2012) e119.

McEwan, I. J. (2004) Sex, drugs and gene expression: Signalling by members of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem*. 40, 1–10

McEwan, I. J. and Gustafsson, J. (1997) Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8485–8490

McEwan, I. J., 2016. The nuclear receptor superfamily at thirty. *Methods Mol Biol*. 2016; 1443:3-9.

McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69 (1-6):3-12.

McMaster A., Ray D.W., Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects, *Exp Physiol* 92(2) (2007) 299-309.

Meijsing S.H., Pufall M.A., So A.Y., Bates D.L., Chen L., Yamamoto K.R., DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity, *Science* 324(5925) (2009) 407-10.

Meyer KB, Carroll JS. FOXA1 and breast cancer risk. *Nat Genet.* 2012 Nov;44(11):1176-7.

Meyer T., Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Glucocorticoid-dependent transcriptional repression of the osteocalcin gene by competitive binding at the TATA box, *DNA Cell Biol* 16(8) (1997) 919-27.

Michelman-Ribeiro A., Mazza D., Rosales T., Stasevich T.J., Boukari H., Rishi V., Vinson C., Knutson J.R., McNally J.G. Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys J* 97(1) (2009) 337-46.

Miranda Tina B., Voss Ty C., Sung Myong-Hee, Baek Songjoon, John Sam, Hawkins Mary, Grøntved Lars, Schiltz R. Louis, and Hager Gordon L. Reprogramming the Chromatin Landscape: Interplay of the Estrogen and Glucocorticoid Receptors at the Genomic Level. *Cancer Res* August 15 2013 (73) (16) 5130-5139.

Mocklinghoff, S., Rose, R., Carraz, M., Visser, A., Ottmann, C., Brunsveld, L., 2010. Synthesis and crystal structure of a phosphorylated estrogen receptor ligand binding domain. *Chembiochem* 11, 2251–2254.

Mohammed Hisham, Russell I. Alasdair, Stark Rory, Rueda Oscar M., Hickey Theresa E., Tarulli Gerard A., Serandour Aurelien A. A., Birrell Stephen, Bruna N. Alejandra, Saadi Amel, Menon Suraj, Hadfield James, Pugh Michelle, Raj Ganesh V., Brown Gordon D., D'Santos Clive, Robinson Jessica L. L., Silva Grace, Launchbury Rosalind, Perou Charles M., Stingl John, Caldas Carlos, Tilley Wayne D. and Carroll Jason S. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature* 523, 313–317 (2015)

Mottis A., Mouchiroud L., Auwerx J., Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis, *Genes Dev* 27(8) (2013) 819-35.

Mrusek S., Classen-Linke I., Vloet A., Beier, H.M. C.A. Krusche. Estradiol and medroxyprogesterone acetate regulated genes in T47D breast cancer cells, *Mol. Cell Endocrinol.* 235 (1–2) (2005) 39–50.

Muscat G.E., Burke L.J., Downes M., The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIIB, TAFII32 and TAFII70, *Nucleic Acids Res* 26(12) (1998) 2899-907.

Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, Krishna V, Chatterjee K, Evans RM, Schwabe JW. Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev* 1999;13 (24):3209-16.

Naylor MJ, Lockefeer JA, Horseman ND, Ormandy CJ. 2003. Prolactin regulates mammary epithelial cell proliferation via autocrine/paracrine mechanism. *Endocrine* 20: 111–114.

Necela B.M., Cidlowski J.A., Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells, *Proc Am Thorac Soc* 1(3) (2004) 239-46.

Nieman L.K., Chrousos G.P., Kellner C., Spitz I.M., Nisula B.C., Cutler G.B., Merriam G.R., Bardin C.W., Loriaux D.L., Successful treatment of Cushing's syndrome with the glucocorticoid antagonist RU 486, *J Clin Endocrinol Metab* 61(3) (1985) 536-40.

Nishida, T. and Yasuda, H. (2002) PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 41311–41317

Nishimura, R., and Arima, N. (2008). Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? *Breast Cancer* 15, 303–308.

Nordeen SK, Kuhnel B, Lawler-Heavner J, Barber DA, Edwards DP (1989) A quantitative comparison of dual control of a hormone response element by progestins and glucocorticoids in the same cell line. *Mol Endocrinol* 3: 1270-1278

Normanno D., Boudarene L., Dugast-Darzacq C., Chen J., Richter C., Proux F., Benichou O., Voituriez R., Darzacq X., Dahan M., Probing the target search of DNA-binding proteins in mammalian cells using TetR as model searcher, *Nat Commun* 6 (2015) 7357.

Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Nov;132(5):1033-44.

Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem* 1996;271 (16):9550-9.

Oakley, R.H., Busillo, J.M., Cidlowski, J.A., 2017. Cross-talk between the glucocorticoid receptor and MyoD family inhibitor domain-containing protein provides a new mechanism for generating tissue-specific responses to glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 292, 5825–5844.

Ogara MF, Rodríguez-Seguí SA, Marini M, Nacht AS, Stortz M, Levi V, Presman DM, Vicent GP, Pecci A. The glucocorticoid receptor interferes with progesterone receptor-dependent genomic regulation in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2019 Nov 18;47(20):10645-10661.

Ogawa S., Lozach J., Benner C., Pascual G., Tangirala R.K., Westin S., Hoffmann A., Subramaniam S., David M., Rosenfeld M.G., Glass C.K., Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors, *Cell* 122(5) (2005) 707-21.

Orizaba-Chávez Bernardett, Alba-Jasso Gerardo Andrés, Ocharán-Hernández María Esther. Farmacocinética de la progesterone. Rev Hosp Jua Mex 2013; 80(1): 59-66

Orqueda A.J., Dansey M.V., Espanol A., Veleiro A.S., Bal de Kier Joffe E., Sales M.E., Burton G., Pecci A. The rigid steroid 21-hydroxy-6,19-epoxyprogesterone (21OH-6,19OP) is a dissociated glucocorticoid receptor modulator potentially useful as a novel coadjuvant in breast cancer chemotherapy, Biochem Pharmacol 89(4) (2014) 526-35.

Overman R.A., Yeh J.Y., Deal C.L., Prevalence of oral glucocorticoid usage in the United States: a general population perspective, Arthritis Care Res (Hoboken) 65(2) (2013) 294-8.

Parise, C.A., and Caggiano, V. Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. Journal of cancer epidemiology 2014, 469251.

Parise, C.A., Bauer, K.R., and Caggiano, V. Variation in breast cancer subtypes with age and race/ethnicity. Critical reviews in oncology/hematology (2010)76, 44-52.

Pascual-Le Tallec, L., Simone, F., Viengchareun, S., Meduri, G., Thirman, M. J. and Lombes, M. (2005) The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. Mol. Endocrinol. 19, 1158–1169

Peluso JJ. Progesterone receptor membrane component 1 and its role in ovarian follicle growth. Front Neurosci. 2013; 10:3389–95.

Perlmann, T., Umesono, K., Rangarajan, P.N., Forman, B.M., Evans, R.M., 1996. Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. Mol. Endocrinol. 10, 958–966.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000;406:747–752.

Picard, D., Kumar, V., Chambon, P., Yamamoto, K.R., 1990. Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. Cell. Regul. 1, 291–299.

Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. J Clin Invest. 2007 Nov;117(11):3155-63.

Pratt W.B., Galigniana M.D., Harrell J.M., De Franco D.B., Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement, Cell Signal 16(8) (2004) 857-72.

Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 2004; 40:41-58.

Presman D.M., Ganguly S., Schiltz R.L., Johnson T.A., Karpova T.S., Hager G.L., DNA binding triggers tetramerization of the glucocorticoid receptor in live cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(29) (2016) 8236-41.

Presman D.M., Ogara M.F., Stortz M., Alvarez L.D., Pooley J.R., Schiltz R.L., Grontved L., Johnson T.A., Mittelstadt P.R., Ashwell J.D., Ganesan S., Burton G., Levi V., Hager G.L., Pecci A., Live cell imaging unveils multiple domain requirements for in vivo dimerization of the glucocorticoid receptor, *PLoS Biol* 12(3) (2014) e1001813.

Propper AY, Howard BA, Veltmaat JM. Prenatal morphogenesis of mammary glands in mouse and rabbit. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2013, 18:93–104.

Rastinejad F, Huang P, Chandra V, Khorasanizadeh S (2013) Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *J Mol Endocrinol* 51:T1–T21

Reddy TE, Pauli F, Sprouse RO, Neff NF, Newberry KM, Garabedian MJ, et al. Genomic determination of glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res.* 2009;19:2163-71.

Reichardt H.M., Kaestner K.H., Tuckermann J., Kretz O., Wessely O., Bock R., Gass P., Schmid W., Herrlich P., Angel P., Schutz G., DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival, *Cell* 93(4) (1998) 531-41.

Reichardt H.M., Tuckermann J.P., Gottlicher M., Vujic M., Weih F., Angel P., Herrlich P., Schutz G., Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor, *The EMBO journal* 20(24) (2001) 7168-73.

Reid, J., Murray, I., Watt, K., Betney, R. and McEwan, I. J. (2002) The androgen receptor interacts with multiple regions of the large subunit of general transcription factor TFIIF. *J. Biol. Chem.* 277, 41247–41253

Rep., 3, 2021–2032.

Revindranath N, Little-Ihrig L, Benyo DF, Zeleznik AJ. Role of LH in the expression of cholesterol side-chain cleavage Cyt P-450 and 3 α -hydroxy dehydrogenase isomerase messenger ribonucleic acids in the primate corpus luteum. *Endocrinol.* 1992; 131:2065–8.

Rodríguez-Cortés Y. M., Mendieta-Zerón H. La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo. *Rev de Med e Inv.* 2(1) (2014) 28-34.

Rogatsky I., Wang J.C., Derynck M.K., Nonaka D.F., Khodabakhsh D.B., Haqq C.M., Darimont B.D., Garabedian M.J., Yamamoto K.R., Target-specific

utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24) (2003) 13845-50.

Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Dedhar S, de Herreros AG, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2005 Dec 15;65(24):11649-57.

Rosen J., Miner J.N., The search for safer glucocorticoid receptor ligands, *Endocr Rev* 26(3) (2005) 452-64.

Rowan BG, O'Malley BW. Progesterone receptor coactivators. *Steroids.* 2000 Oct-Nov;65(10-11):545-9.

Sadovsky, Y., Webb, P., Lopez, G., Baxter, J. D., Fitzpatrick, P. M., Gizang-Ginsberg, E., Cavailles, V., Parker, M. G. and Kushner, P. J. (1995) Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1554–1563

Sartorius Carol A., Groshong Steve D., Miller Louise A., Powell Roger L., Tung Lin, Takimoto Glenn S. and Horwitz Kathryn B. New T47D Breast Cancer Cell Lines for the Independent Study of Progesterone B- and A-Receptors: Only Antiprogesterin-occupied B-Receptors Are Switched to Transcriptional Agonists by cAMP. *Cancer Res.* 1994 Jul 15;54(14):3868-77.

Savory J.G., Prefontaine G.G., Lamprecht C., Liao M., Walther R.F., Lefebvre Y.A., Hache R.J., Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces, *Mol Cell Biol* 21(3) (2001) 781-93.

Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;83 (1-5):37-48.

Schacke H., Docke W.D., Asadullah K., Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids, *Pharmacology & therapeutics* 96(1) (2002) 23-43.

Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta* 2004;1680 (2):114-28.

Schwille P., Haustein E., *Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications*, 2006.

Schwille, P. & Haustein, E. *Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications* (2006).

Segard-Maurel I, Rajkowski K, Jibard N, Schweizer-Groyer G, Baulieu EE, Cadepond F. Glucocorticosteroid receptor dimerization investigated by analysis of receptor binding to glucocorticosteroid responsive elements using a monomer dimer equilibrium model. *Biochemistry* 1996;35 (5):1634-42.

Severson TM, Kim Y, Joosten SEP, Schuurman K, van der Groep P, Moelans CB, Ter Hoeve ND, Manson QF, Martens JW, van Deurzen CHM, Barbe E, Hedenfalk I, Bult P, Smit VTHBM, Linn SC, van Diest PJ, Wessels L, Zwart W. Characterizing steroid hormone receptor chromatin binding landscapes in male and female breast cancer. *Nat Commun.* 2018 Feb 2;9(1):482.

Shao R, Egecioglu E, Weijdegård B, Ljungström K, Ling C, Fernandez-Rodriguez J, Billig H. Developmental and hormonal regulation of progesterone receptor A-form expression in female mouse lung in vivo: interaction with glucocorticoid receptors. *J Endocrinol.* 2006 Sep;190(3):857-70.

Sheppard K.A., Phelps K.M., Williams A.J., Thanos D., Glass C.K., Rosenfeld M.G., Gerritsen M.E., Collins T., Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1, *The Journal of biological chemistry* 273(45) (1998) 29291-4.

Shi L, Dong B, Li Z, Lu Y, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Wang Z, Xie Y. Expression of ER- α 36, a novel variant of estrogen receptor α , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 20;27(21):3423-9.

Silberstein GB, Daniel CW. Investigation of mouse mammary ductal growth regulation using slow-release plastic implants. *J Dairy Sci.* 1987 Sep;70(9):1981-90.

Simental, J. A., Sar, M., Lane, M. V., French, F. S. and Wilson, E. M. (1991) Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 510–518

Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol.* 1988;50:427-40.

Skowron KJ, Booker K, Cheng C, Creed S, David BP, Lazzara PR, Lian A, Siddiqui Z, Speltz TE, Moore TW. Steroid receptor/coactivator binding inhibitors: An update. *Mol Cell Endocrinol.* 2019 Aug 1;493:110471.

Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody Agent Against Her2 For Metastatic Breast Cancer That Overexpresses Her2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–792.

Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 2004;25 (1):45-71.

Smith GH, Medina D. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J Cell Sci.* 1988 May;90 (Pt 1):173-83.

Smith, I., Procter, M., Gelber, R.D., Guillaume, S., Feyereislova, A., Dowsett, M., Goldhirsch, A., Untch, M., Mariani, G., Baselga, J., et al. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 369, 29–36.

So AY, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR. Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet.* 2007 Jun;3(6):e94.

Spitz I.M., Bardin C.W., Mifepristone (RU 486) --a modulator of progestin and glucocorticoid action, *N Engl J Med* 329(6) (1993) 404-12.

Storer C.L., Dickey C.A., Galigniana M.D., Rein T., Cox M.B., FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22(12) (2011) 481-90.

Stortz M, Presman DM, Bruno L, Annibale P, Dansey MV, Burton G, Gratton E, Pecci A, Levi V. Mapping the Dynamics of the Glucocorticoid Receptor within the Nuclear Landscape. *Sci Rep.* 2017 Jul 24;7(1):6219.

Stumpf WE, Narbaitz R, Sar M. 1980. Estrogen receptors in the fetal mouse. *J Steroid Biochem* 12: 55–64.

Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943-945, 1985.

Sundahl N., Bridelance J., Libert C., De Bosscher K., Beck I.M., Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds, *Pharmacology & therapeutics* 152 (2015) 28-41.

Takimoto, G. S., Hovland, A. R., Tasset, D. M., Melville, M. Y., Tung, L. and Horwitz, K. B. (1996) Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 271, 13308–13316

Takimoto, G. S., Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Abel, M. G., Sartorius, C. A., Richer, J. K., Jacobsen, B. M., Bain, D. L. and Horwitz, K. B. (2003) Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 209–219

Talleg, L. P., Kirsh, O., Lecomte, M. C., Viengchareun, S., Zennaro, M. C., Dejean, A. and Lombes, M. (2003) Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: Implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Mol. Endocrinol.* 17, 2529–2542

Taraborrelli S. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015; 94: 8–16.

Thornton JW, Need E, Crews D. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* 2003;301 (5640):1714-7.

Tian, S., Poukka, H., Palvimo, J. J. and Janne, O. A. (2002) Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem. J.* 367, 907–911

Truong TH, Lange CA. Deciphering Steroid Receptor Crosstalk in Hormone-Driven Cancers. *Endocrinology*. 2018 Dec 1;159(12):3897-3907.

Tung, L., Shen, T., Abel, M. G., Powell, R. L., Takimoto, G. S., Sartorius, C. A. and Horwitz, K. B. (2001) Mapping the unique activation function 3 in the progesterone B-receptor upstream segment. Two LXXLL motifs and a tryptophan residue are required for activity. *J. Biol. Chem.* 276, 39843–39851

Van der Laan S, Meijer OC. Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur J Pharmacol* 2008;585 (2- 3):483-91.

Vandevyver S., Dejager L., Tuckermann J., Libert C., New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation, *Endocrinology* 154(3) (2013) 993-1007.

Vegeto, E., Shahbaz, M. M., Wen, D. X., Goldman, M. E., O'Malley, B. W. and McDonnell, D. P. (1993) Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.*, 7, 1244–1255.

Vicent GP, Zaurin R, Nacht AS, Font-Mateu J, Le Dily F & Beato M 2010 Nuclear factor 1 synergizes with progesterone receptor on the mouse mammary tumor virus promoter wrapped around a histone H3/H4 tetramer by facilitating access to the central hormone-responsive elements. *Journal of Biological Chemistry* 285 2622–2631.

Vicent, G. P. *et al.* (2013) Nucleosome-driven transcription factor Vinson GW, B; Hinson, J. *The Adrenal Cortex*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1992.

Voutsadakis IA. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. *J Clin Med*. 2016 Jan 19;5(1):11.

Wan, Y. and Nordeen, S. K. (2002) Overlapping but distinct gene regulation profiles by glucocorticoids and progestins in human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.*, 16, 1204–1214.

Wang, Z., Frederick, J. and Garabedian, M. J. (2002) Deciphering the phosphorylation 'code' of the glucocorticoid receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 26573–26580

Warnmark, A., Wikstrom, A., Wright, A. P., Gustafsson, J. A. and Hard, T. (2001) The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. *J. Biol. Chem.* 276, 45939–45944

Watson L. C., Kuchenbecker K. M., Schiller B. J., Gross J. D., Pufall M. A., Yamamoto K. R., The glucocorticoid receptor dimer interface allosterically transmits sequence-specific DNA signals, *Nat Struct Mol Biol* 20(7) (2013) 876-83.

Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL, Quinn PG. An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRC, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol*. 1996 Nov;10(11):1379-87.

Weigel, N. L. (1996) Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J*. 319, 657–667

Weigelt, B., Geyer, F.C., and Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 4, 192-208.

Weikum, E.R., Knuesel, M.T., Ortlund, E.A., Yamamoto, K.R., 2017. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 18, 159–174.

Welboren WJ, van Driel MA, Janssen-Megens EM, van Heeringen SJ, Sweep FC, Span PN, et al. ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *The EMBO Journal*. 2009;28:1418-28.

Welshons, W.V., Lieberman, M.E., Gorski, J., 1984. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307, 747–749.

West,D.C., Pan,D., Tonsing-Carter,E.Y., Hernandez,K.M., Pierce,C.F., Styke,S.C., Bowie,K.R., Garcia,T.I.,

Westphal U. Steroid–protein interactions II. *Monogr. Endocrinology* 1986;27: 1-63.

White M.D., Angiolini J.F., Alvarez Y.D., Kaur G., Zhao Z.W., Mocskos E., Bruno L., Bissiere S., Levi V., Plachta N., Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo, *Cell* 165(1) (2016) 75-87.

Wierer,M., Verde,G., Pisano,P., Molina,H., Font-Mateu,J., Di Croce,L. and Beato,M. (2013) PLK1 signaling in breast cancer cells cooperates with estrogen receptor-dependent gene transcription. *Cell*

Williams JM, Daniel CW. Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol*. 1983 Jun;97(2):274-90.

Williams, S.P., Sigler, P.B., 1998. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393, 392–396.

Wintermantel TM, Bock D, Fleig V, Greiner EF, Schutz G. The epithelial glucocorticoid receptor is required for the normal timing of cell proliferation during mammary lobuloalveolar development but is dispensable for milk production. *Mol Endocrinol* 2005, 19:340–349.

Wu, S.-P., & DeMayo, F. J. (2017). Progesterone Receptor Signaling in Uterine Myometrial Physiology and Preterm Birth. *Current Topics in Developmental Biology*, 125, 171–190.

Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., Gronemeyer, H., 1996. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* 3, 87–94.

Yang, J., Fuller, P.J., 2012. Interactions of the mineralocorticoid receptor and without. *Mol. Cell Endocrinol.* 350, 196–205.

Yeh, S., Lin, H. K., Kang, H. Y., Thin, T. H., Lin, M. F. and Chang, C. (1999) From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5458–5463

Yeo SK, Guan JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer.* 2017 Nov;3(11):753-760.

Yin P, Roqueiro D, Huang L, Owen JK, Xie A, Navarro A, et al. Genome-wide progesterone receptor binding: cell type-specific and shared mechanisms in T47D breast cancer cells and primary leiomyoma cells. *PLoS One.* 2012;7:e29021.

You S.H., Lim H.W., Sun Z., Broache M., Won K.J., Lazar M.A., Nuclear receptor co-repressors are required for the histone-deacetylase activity of HDAC3 in vivo, *Nat Struct Mol Biol* 20(2) (2013) 182-7.

Yudt MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 2002;16 (8):1719-26.

Yue W., Yager J. D., Wang J. P., Jupe E. R., Santen R. J., Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis, *Steroids* 78 (2013) 161-170.

Zhang XT, Kang LG, Ding L, Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY. A positive feedback loop of ER- α 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene.* 2011 Feb 17;30(7):770-80.

Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids.* 2005 May-Jun;70(5-7):407-17.

Zhou,F., Bouillard,B., Pharaboz-Joly,M.O. and Andre,J. (1989) Non-classical antiestrogenic actions of dexamethasone in variant MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Mol. Cell Endocrinol.*, 66, 189–197.