



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Impacto de la señalización del receptor tumoral RET
sobre el tejido adiposo mamario
en la progresión del cáncer de mama**

Lic. Sabrina Aldana Vallone

Tesis presentada para optar por el Título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Directora: Dra. Albana Gattelli

Director Adjunto: Dr. Juan Pablo Fededa

Consejera de estudios: Dra. Adali Pecci

Lugar de trabajo: Laboratorio de Blancos Terapéuticos y Microambiente en
Cáncer de Mama, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
(IFIBYNE-UBA-CONICET), Universidad de Buenos Aires (UBA)

Fecha de defensa: 20 de Marzo de 2025

Resumen

En la glándula mamaria, los adipocitos constituyen el principal componente celular del estroma glandular. Durante las distintas etapas del desarrollo mamario, tanto el epitelio como el tejido adiposo experimentan modificaciones reguladas de manera específica. En el contexto del cáncer de mama, se ha observado que el tejido adiposo adyacente al tumor está compuesto por adipocitos modificados, con un fenotipo inmaduro similar al de sus precursores, los pre-adipocitos. Sin embargo, los mecanismos responsables de estas modificaciones siguen siendo desconocidos. En este estudio, identificamos al receptor tirosina quinasa RET como un nuevo modulador de la comunicación entre la célula tumoral mamaria y el tejido adiposo.

RET es un oncogén que está involucrado en varios tipos de cáncer. En cáncer de mama, RET se encuentra sobre-expresado en aproximadamente el 40% de los tumores respecto del tejido normal. Niveles altos de RET correlacionan con una reducción en la supervivencia del paciente. Se ha demostrado que la activación de la vía de señalización de RET en células tumorales mamarias aumenta la proliferación, la migración y la inflamación. Durante el proceso tumorigénico dirigido por RET en la glándula mamaria, además del aumento de la proliferación de las células epiteliales, hemos observado un estroma adiposo aberrante. En este contexto, postulamos que el potencial oncogénico de RET en la célula epitelial mamaria implica una interacción con el tejido adiposo. El objetivo principal de este trabajo de tesis es comprender en profundidad los mecanismos por los cuales RET regula el estado de madurez de los adipocitos mamarios adyacentes y cómo esto puede impactar en la progresión del tumor.

Primero, utilizando un modelo de ratón transgénico inducible para la expresión de RET establecido previamente (Ret/MTB), determinamos que la expresión aberrante de RET durante el desarrollo de la glándula mamaria afecta la transición normal de la lactancia al período siguiente de involución; una etapa de alta inflamación y remodelación tisular. Demostramos que RET aumenta el número de lesiones neoplásicas mamarias acompañadas de tejido adiposo modificado, particularmente en post-lactancia. El análisis posterior de datos de secuenciación de RNA de glándulas transgénicas que expresan RET, reveló una regulación positiva de genes involucrados en el mantenimiento del fenotipo de pre-adipocitos, incluyendo ligandos de la familia PDGF. En concordancia, hallamos que la expresión de RET correlaciona positivamente con PDGF-B en biopsias de tumores de mama humanos. Luego, generamos un nuevo modelo de células tumorales mamarias carentes de expresión de RET, editadas por CRISPR/Cas9. Utilizando este modelo, tanto en ensayos de co-cultivos *in vitro* como *in vivo*, estudiamos el efecto de la presencia de RET en favorecer el estado inmaduro de los adipocitos circundantes. A nivel del mecanismo, confirmamos que PDGF-B es un factor río abajo de la activación de RET y pudimos demostrar que los pre-adipocitos, susceptibles a PDGFs, son capaces de promover el crecimiento tumoral en forma dependiente de RET. Por último, utilizando experimentos de medios condicionados e inhibidores selectivos determinamos que la señalización del eje RET/PDGF-B actúa como un integrador de la comunicación entre la célula tumoral y el tejido adiposo mamario.

En conjunto, los resultados de esta tesis muestran que la señalización disparada por RET en la célula epitelial mamaria afecta el estado de maduración del tejido adiposo circundante en favor de la progresión del cáncer de mama.

Palabras clave: RET, glándula mamaria, cáncer de mama, tejido adiposo, PDGFs

Impact of RET receptor signaling in tumor cells on mammary adipose tissue during breast cancer progression

Abstract

In the mammary gland, adipocytes are the primary cellular component of the stroma. Throughout the various stages of mammary gland development, both the epithelium and adipose tissue undergo specifically regulated modifications. In breast cancer, it has been observed that the adipose tissue adjacent to the tumor is composed of modified adipocytes with an immature phenotype, resembling their precursors, the pre-adipocytes. However, the mechanisms responsible for these modifications remain unknown. In this study, we identify the receptor tyrosine kinase RET as a key modulator in the communication between mammary tumor cells and adipose tissue.

RET is an oncogene involved in several cancer types. In breast cancer, RET is overexpressed in approximately 40% of tumors, and high levels of RET are associated with reduced overall patient survival. Activation of the RET signaling pathway in mammary tumor cells has been shown to enhance proliferation, migration and inflammation. During RET-driven tumorigenesis in the mammary gland, in addition to increased epithelial cell proliferation, we observed aberrant adipose stroma. In this context, we hypothesized that the oncogenic potential of RET in mammary epithelial cells involves interaction with adipose tissue. The main objective of this thesis is to increase our understanding of the mechanisms by which RET regulates the maturity of adjacent mammary adipocytes and how this impacts tumor progression.

First, using a previously established inducible transgenic mouse model for RET expression (Ret/MTB), we determined that aberrant RET expression during mammary gland development disrupts the normal transition from lactation to the subsequent involution period, a phase of high inflammation and tissue remodeling. We demonstrated that RET increases the number of mammary neoplastic lesions accompanied by modified adipose stroma, particularly in the post-lactation period. Subsequent RNA sequencing analysis of transgenic glands expressing RET revealed upregulation of genes involved in maintaining the pre-adipocyte phenotype, including ligands of the PDGF family. Consistently, we found that RET expression positively correlates with PDGF-B expression in human breast tumor biopsies. Next, we generated a new model of mammary tumor cells with RET expression deleted via CRISPR/Cas9, which was implemented in mixed culture systems with adipose cells. Using this model in both in vitro co-culture and in vivo experiments, we studied the effect of RET presence in promoting the immature state of adipocytes. Mechanistically, we confirmed that PDGF-B is a downstream factor of RET activation, and we demonstrated that pre-adipocytes susceptible to PDGFs can promote tumor growth in a RET-dependent manner. Lastly, using conditioned media experiments and selective inhibitors, we determined that signaling via the RET/PDGFB axis acts as an integrator of communication between tumor cells and mammary adipose tissue.

In summary, the findings of this thesis show that RET signaling in mammary epithelial cells disrupts the maturation of surrounding adipose tissue, favoring breast cancer progression.

Keywords: RET, mammary gland, breast cancer, adipose tissue, PDGFs

Abreviaturas

Ad	Adipocito
ANOVA	Análisis de varianza de un factor
BAT	<i>Brown adipose tissue</i>
CM	<i>Conditioned medium</i>
DNAc	ADN copia
sd	<i>standard deviation</i>
DOX	Doxiciclina
ER	Receptor de estrógeno
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GFR α 1	<i>GDNF family receptor alpha 1</i>
H&E	Hematoxilina y eosina
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i>
MMTV-LTR	<i>Mouse mammary tumor virus – Long terminal repeat</i>
PA	Pre-adipocito
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PR	Receptor de progesterona
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
RNAm	RNA mensajero

RTK	Receptor tirosina quinasa
RT-PCR	<i>Reverse transcription - Polymerase chain reaction</i>
rtTA	<i>Reverse tetracycline-controlled transactivator</i>
SFB	Suero fetal bovino
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TdM	Tricrómico de Masson
TEB	<i>Terminal end bud</i>
TetO	<i>Tetracycline operator</i>
WAT	<i>White adipose tissue</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WM	<i>Whole mount</i>

Indice

Introducción General.....	11
El receptor RET y los componentes de su vía de señalización.....	12
RET en cáncer.....	13
El cáncer de mama.....	14
RET en cáncer de mama.....	15
Modelo tumoral mamario de ratón transgénico Ret/MTB.....	17
Hipótesis y Objetivos.....	21
Metodología.....	23
Líneas celulares.....	24
Generación de líneas celulares editadas para la expresión de RET (RET-KO)	24
Ensayos en roedores de laboratorio (<i>in vivo</i>).....	29
Obtención de muestras de tejidos mamario en animales WT en distintos estadios del desarrollo de la glándula mamaria.....	29
Ensayo de bloqueo de pezón en hembras lactantes.....	30
Modelo tumoral mamario de alotrasplante EO771 RET-KO.....	30
Modelo tumoral mamario de ratones transgénicos Ret/MTB.....	31
Análisis histológico.....	35
Inmunohistoquímica (IHC).....	35
Análisis de proteínas mediante <i>Western Blot</i> (WB).....	37
Ensayos en cultivo celular (<i>in vitro</i>).....	39
Análisis de activación de vías de señalización intracelulares (<i>signaling</i>).....	39
Preparación de medios condicionados (CM).....	40
Ensayos de diferenciación de adipocitos y efecto de los medios condicionados provenientes de células tumorales.....	40
Ensayos de co-cultivo con insertos <i>transwell</i>	41
Caracterización celular de la función mitocondrial y la glucólisis en analizador de flujo <i>Seahorse</i>	41
Tinción de lípidos con <i>Oil-red</i>	42
Ensayos de viabilidad celular por incorporación de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS).....	42
Ensayos de PCR en tiempo real (RT-qPCR).....	43
Análisis de RNAseq.....	46
Análisis de bases de datos de pacientes.....	47
Análisis estadístico.....	47
Parte I: La expresión aberrante del receptor RET durante el desarrollo de la glándula mamaria afecta la transición normal de lactancia a involución promoviendo la tumorigénesis.....	49
Introducción – Parte I.....	49

La glándula mamaria.....	50
Desarrollo postnatal de la glándula mamaria en el ratón.....	50
La familia de factores de transcripción STAT como reguladores específicos del desarrollo de la glándula mamaria.....	52
Modificaciones del estroma adiposo durante el desarrollo de la glándula mamaria...	54
Resultados – Parte I.....	55
Análisis de la expresión de RET durante el desarrollo de la glándula mamaria.....	55
Análisis de las alteraciones producidas por la sobre-expresión de RET en el epitelio mamario durante la lactancia.....	59
Análisis de los efectos de la expresión de RET en el epitelio mamario durante el proceso de involución.....	60
La expresión sostenida de RET durante la post-lactancia promueve defectos del desarrollo y aumenta la malignidad.....	62
 Parte II: El receptor RET en la célula tumoral regula características del tejido adiposo mamario adyacente promoviendo un estado inmaduro en las células adiposas.....	 66
 Introducción – Parte II.....	 67
El cáncer de mama y el estroma adiposo.....	67
Poblaciones de adipocitos y sus precursores.....	69
El proceso de diferenciación en los adipocitos.....	70
El metabolismo energético en el contexto de la interacción de la célula tumoral con el tejido adiposo.....	72
Resultados – Parte II.....	75
Generación del modelo celular tumoral mamario de ausencia de RET (RET-KO).....	75
Efecto del secretoma dependiente de la expresión de RET en células tumorales sobre cultivos de adipocitos maduros.....	78
Efecto del secretoma dependiente de la expresión de RET en células tumorales sobre cultivos de adipocitos durante el proceso de diferenciación.....	80
Generación del modelo <i>in vivo</i> tumoral mamario RET-KO.....	82
Análisis <i>in vivo</i> del impacto de RET en la célula tumoral sobre el estado de diferenciación de los adipocitos adyacentes.....	84
Validación de los hallazgos en muestras humanas: análisis de muestras de tejido adyacente al tumor en pacientes con cáncer de mama en el contexto de la expresión de RET.....	89
Análisis <i>in vitro</i> , utilizando sistemas de co-cultivo, del impacto del RET tumoral sobre el estado de diferenciación de cultivos de adipocitos y sus consecuencias sobre la célula tumoral.....	90
(A) Análisis sobre células adiposas, cultivos de adipocitos maduros o PA, en co-cultivo con células tumorales.....	91
(B) Análisis sobre células tumorales en co-cultivo con células adiposas.....	93
La interacción entre los PA y la célula tumoral favorece la progresión del cáncer de mama en forma dependiente de RET.....	95

Parte III: La señalización RET/PDGF-B como integradora de la comunicación entre la célula tumoral y el tejido adiposo mamario.....	99
Introducción – Parte III.....	100
Vías de señalización relevantes en los adipocitos inmaduros y PA.....	100
PDGF/PDGFR.....	100
DLK1.....	101
Resultados – Parte III.....	104
Efecto del secretoma de los PA sobre las células tumorales.....	104
Búsqueda de mediadores del secretoma tumoral dependiente de RET que impacten sobre las células adiposas.....	106
Validación de los hallazgos en muestras humanas: análisis de muestras de tumor y tejido adyacente al tumor en pacientes con cáncer de mama en el contexto de la expresión de RET.....	109
Efecto del secretoma dependiente de la expresión/activación de RET en las células tumorales sobre los PA.....	111
La señalización de RET/PDGF-B en la célula tumoral mamaria impacta en los PA perpetuando su estado inmaduro.....	112
Discusión.....	115
Conclusiones.....	124
Bibliografía.....	127

Introducción General

El receptor RET y los componentes de su vía de señalización

RET (en inglés *REarranged during Transfection*) es el receptor tirosina quinasa (RTK) para la familia de péptidos denominados factores neurotróficos derivados de la glía (GDNF). Estos ligandos se unen a RET junto con la familia de co-receptores de los receptores de GDNF (GFR α 1-4), los cuales suelen estar anclados a la membrana, pero también existen en forma soluble (Mulligan 2014). Los GFR α forman homodímeros que son reclutados por GDNF o los ligandos alternativos (NRTN, ARTN, PSPN) formando un complejo de alta afinidad, el cual luego interactúa y activa a homodímeros de RET (**Figura I1**). Róo abajo, a través de su actividad tirosina quinasa, RET activa por fosforilación (p) numerosas vías de señalización intracelular, entre ellas quinasas pertenecientes a vías oncogénicas canónicas relacionadas con proliferación, diferenciación y migración celular (Mulligan 2014) como las MAPK, ERK, JNK y p38, o la quinasa FAK (Chiariello et al. 1998; Iván Plaza-Menacho et al. 2011).

Tanto en humanos como en ratón, el gen de RET (*RET* o *Ret*, respectivamente) codifica para tres isoformas proteicas (RET9, RET43 y RET51) las cuales difieren en sus dominios carboxilo-terminales y en sus residuos tirosina quinasa (**Figura I1**). RET51 representa la forma completa, o *full length*, de la proteína, es decir que posee todos los residuos susceptibles a fosforilación, y junto con RET9 constituyen las isoformas más abundantes en los tejidos en general (Ibáñez 2013) y en líneas celulares mamarias tumorales humanas (Boulay et al. 2008).

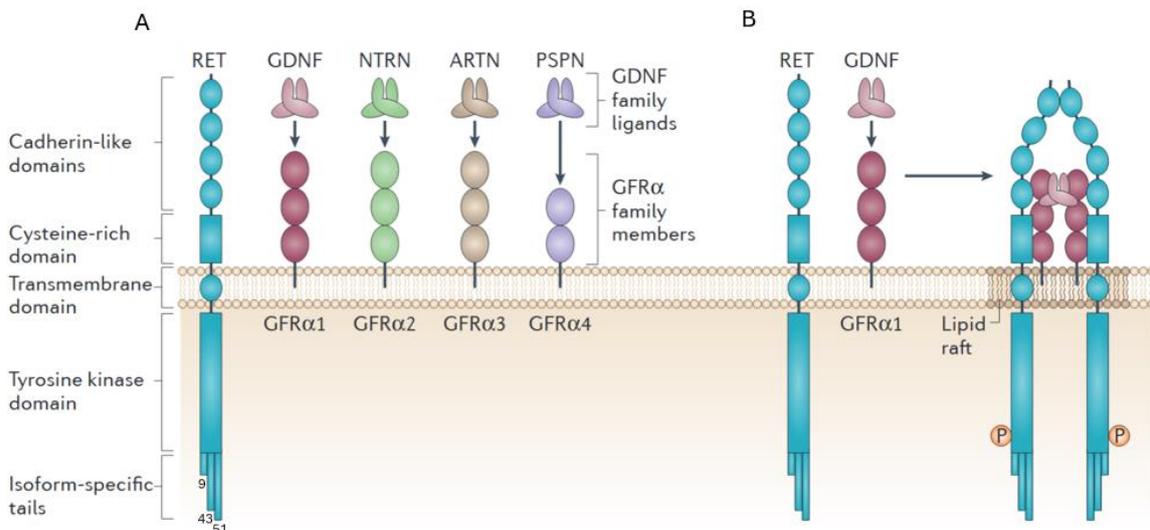


Figura I1. El receptor RET, sus ligandos y co-receptores. (A) RET es un receptor transmembrana del tipo tirosina quinasa. Posee un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio con actividad tirosina quinasa intracelular. En el extremo carboxilo, el RET humano tiene tres secuencias de aminoácidos alternativas, que se generan por *splicing* alternativo, y las proteínas producidas se denominan RET9, RET43 y RET51. RET es el receptor para los factores neurotróficos derivados de la glía (GDNF), que incluyen GDNF, neurturin (NTRN), artemin (ARTN) y persepin (PSPN); y otros más estudiados en neurogénesis como BDNF. Cada uno de estos ligandos interactúa con RET a través de un co-receptor (GFR α) que consiste en dos o tres dominios proteicos globulares unidos a la membrana celular (o en sus versiones solubles). (B) El ligando se une a dímeros de co-receptores GFR α para formar un complejo homodimérico, que luego recluta a RET. Una vez unidos al complejo ligando/co-receptor, los cambios conformacionales facilitan la

asociación de los monómeros de RET a través de los dominios homólogos a cadherina y conducen a la dimerización del receptor, su autofosforilación (P) y la fosforilación de moléculas de señalización río abajo (p). Adaptación de (Mulligan 2014).

En la fisiología normal, RET se expresa en las células precursoras de la cresta neural y del tracto urogenital donde cumple un rol esencial durante el desarrollo (Ibáñez 2013). En tejidos adultos de ratón, éste receptor se expresa en cerebro y en glándulas salivales (De Groot et al. 2006). En tejido mamario humano, tanto RET como el co-receptor GFR α 1 y su ligando GDNF se expresan en niveles muy bajos o indetectables (Esseghir et al. 2007). Previo al desarrollo de esta tesis, no existían reportes publicados acerca de la expresión de los co-receptores o de los ligandos alternativos de RET en tejido mamario murino, ni de la expresión de RET durante las distintas etapas del desarrollo de la glándula mamaria. En estos aspectos, la realización de los experimentos de la primera parte (Parte I) de este trabajo y los resultados obtenidos representan una contribución original (Vallone et al. 2022).

RET en cáncer

Se han identificado varias mutaciones puntuales en el gen de RET relacionadas con neoplasias endócrinas múltiples (Mulligan 2014). Sin embargo, la primera manifestación clínica de la función oncogénica de RET fue identificada como re-arreglos génicos en carcinoma de tiroides (Grieco et al. 1990). En este tipo de tumor, la activación constitutiva de la señalización de RET es producida por la presencia de una mutación de alta frecuencia (50-100% de los casos dependiendo de la cohorte de pacientes analizados) que genera una proteína de fusión, denominada RET-PTC, la cual es responsable de la activación de RET independientemente de la unión del ligando (Grieco et al. 1990). Con el avance en los estudios de secuenciación masiva en muestras de tumores de pacientes, se han identificado numerosos rearrreglos génicos que dan lugar a distintas proteínas de fusión con RET, altamente frecuentes en adenocarcinomas de pulmón (Kohno et al. 2012) y colon (Rolle et al. 2015). Sin embargo, en cáncer de próstata, páncreas y en cáncer mamario las mutaciones en el gen de *RET* solo se presentan en un bajo porcentaje, menor al 1% (Stransky et al. 2014). En cáncer de mama, independientemente de la presencia o no de mutaciones, los niveles de expresión de RET se encuentran elevados respecto del tejido normal (Esseghir et al. 2007; Gattelli et al. 2013).

La señalización de RET ha sido estudiada, para los distintos tipos de cáncer, tanto *in vitro*, mediante cultivo de líneas celulares tumorales (Esseghir et al. 2007; Gattelli et al. 2013; Boulay et al. 2008), como *in vivo*, utilizando diferentes modelos pre-clínicos de cáncer en ratón (Gattelli et al. 2013; 2018; Andreucci et al. 2016). Para estos últimos se han utilizado tanto ratones transgénicos, especialmente diseñados para que contengan en su genoma, por ejemplo, el receptor RET con mutaciones activantes (Jhiang et al. 1998), como modelos de trasplantes de líneas celulares tumorales portadoras de RET mutado o *wild-type* (WT). En el contexto de la formación y progresión del tumor, la activación de RET conduce a la supervivencia y proliferación de las células tumorales, así como a su migración y diseminación en órganos secundarios (metástasis) (Gattelli et al. 2013; Drilon, Lin, et al. 2018; Jagust et al. 2024).

Además de la activación de varias de las quinasas oncogénicas río abajo, se ha reportado que en particular en células tumorales de tiroides o mamarias, el aumento de la actividad RET en las células tumorales estimula un patrón de expresión génica inflamatorio que conduce a la producción de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral TNF α y las interleuquinas pro-inflamatorias IL β 1 e IL6 (Grieco et al. 1990; Gattelli et al. 2013). Esta señalización, va acompañada generalmente por la activación de factores de transcripción relevantes en oncogénesis e inflamación como los factores de la familia STAT (del inglés *Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Grieco et al. 1990; Hwang et al. 2004; Borrello et al. 2005; Y. R. Kim et al. 2008).

Se han explorado diversas estrategias y terapias para tratar los cánceres impulsados por RET. Durante la última década, ha habido un gran desarrollado de inhibidores de la actividad quinasa de varios RTKs, incluyendo RET. Por ejemplo, cabozantinib, vandetanib, lenvatinib, sorafenib y sunitinib, inhiben la actividad de RET pero también de otros RTKs, y se han probado en cánceres con alteraciones en RET (Thein et al. 2021). Sin embargo, su eficacia ha sido limitada y, a menudo, acompañada de toxicidades significativas que impactaron negativamente en la calidad de vida de los pacientes, lo que llevó a la interrupción de su uso (Drilon, Hu, et al. 2018). Recientemente, la FDA de aprobó dos inhibidores selectivos de RET (pralsetinib y selpercatinib) para el tratamiento del cáncer de pulmón y de tiroides, lo cual ha revitalizado la investigación en cánceres asociados a alteraciones en RET (Thein et al. 2021).

En particular, pralsetinib (BLU-667) es un inhibidor que fue diseñado específicamente para bloquear de forma selectiva las alteraciones oncogénicas de RET, que se observan principalmente en cáncer de tiroides y de pulmón (Subbiah et al. 2018). Actualmente no hay reportes donde se lo utilice para inactivar la forma no mutada de RET, presente en cáncer de mama, pero se ha propuesto que podría ser eficiente (J. Wu and Subbiah 2023).

El cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de tumor más común en mujeres en todo el mundo, con una incidencia de 2,3 millones de casos diagnosticados sólo en 2022. La mortalidad por este tipo de cáncer también es la más alta en la población femenina mundial (Bray et al. 2024). En Argentina, es el tipo de tumor más común en mujeres, con una tasa estimada de incidencia de 71,2 casos por cada 100.000 mujeres, tal como lo indican los datos aportados por el Instituto Nacional del Cáncer (Instituto Nacional del Cáncer, 2022).

Simplificadamente, en base a la detección de proteínas específicas por ensayos inmunohistoquímicos (IHC), es posible clasificar a los tumores mamarios en 4 subtipos: luminal A, luminal B, basal y HER2 (Perou et al. 2000). Los tumores luminales son positivos tanto para la expresión del receptor de estrógenos (ER) como el receptor de progesterona (PR) y representan el 70% de los pacientes (ER+PR+). Por otro lado, el subtipo basal, conocido como triple-negativo, se caracteriza por ser negativo para la expresión de los tres receptores (ER $\bar{}$ PR $\bar{}$ HER2 $\bar{}$), y aunque es el más agresivo y metastásico, representa solo el 10-20% de los casos. Por último, el subtipo HER2 es menos abundante y se caracteriza por

poseer la amplificación y alta expresión del receptor HER2, otro RTK similar a RET, codificado por el gen ERBB2 (Sørli 2007).

Al desarrollarse en un órgano que no es vital para la supervivencia de la mujer afectada, la remoción quirúrgica del tumor primario es una operación de bajo riesgo y la intervención indicada para la paciente. Antes o después de la cirugía, dependiendo del subtipo tumoral que resulte del análisis de la biopsia, se indica la terapia a implementar. En muchos casos, existen limitaciones y resistencia a las terapias disponibles en la clínica, lo cual se refleja en la alta tasa de mortalidad de la enfermedad. Las pacientes con cáncer de mama que sufren resistencia terapéutica suelen tener recaídas y pueden desarrollar metástasis, lo cual empeora el cuadro clínico. Por lo tanto, encontrar claves moleculares que permitan comprender los mecanismos involucrados en la generación de lesiones pre-neoplásicas y la progresión de éstas, permitirá diseñar alternativas más efectivas de tratamiento contra nuevos receptores para combatir el cáncer de mama.

RET en cáncer de mama

Como se mencionó anteriormente, las mutaciones en el gen de *RET* no son frecuentes en cáncer de mama humano (Kan et al. 2010), sin embargo, los niveles de expresión de este receptor se encuentran elevados en aproximadamente el 40% de los tumores de mama con respecto al tejido mamario normal (Esseghir et al. 2007; Gattelli et al. 2013) (**Figura I2**). La expresión de RET se asocia mayormente a tumores del tipo ER+, lo cual es consistente con el hecho de que es considerado un gen regulado por la activación del ER (Boulay et al. 2008; I. Plaza-Menacho et al. 2010; Tozlu et al. 2006). Por otro lado, niveles altos de expresión de RET se correlacionan con un peor pronóstico del paciente independientemente del subtipo del tumor (Gattelli et al. 2013) y, tumores que han resultado resistentes a la terapia que bloquea la señalización de los estrógenos (terapia endócrina) comúnmente utilizada en la clínica, como el tamoxifeno (Fisher et al. 1998), poseen niveles más altos de RET (I. Plaza-Menacho et al. 2010) y presencia de mutaciones específicas en este receptor (**Figura I2**). Recientemente se ha demostrado que la señalización de RET tiene un rol central en las metástasis de cerebro de tumores ER+, favoreciendo la colonización y el crecimiento del tumor en ese nicho específico (Jagust et al. 2024; Varešlija et al. 2019).

En cuanto a las vías de señalización activadas por RET en cáncer de mama, además de los factores STATs, el ER es otro factor de transcripción relevante que se activa río abajo de la señalización de RET (I. Plaza-Menacho et al. 2010). En resumen, no solo la activación del ER promueve la actividad de RET, como se mencionó previamente, sino que la activación de RET promueve la actividad del ER. De este modo, la activación de RET habilita la estimulación de genes que responden a los estrógenos pero en ausencia de ellos, lo que contribuye a la resistencia endocrina (Pecar et al. 2023; Nigro, Rusmini, and Ceccherini 2019). Las interacciones entre RET y el ER es un campo de estudio sumamente complejo y aún en estudio.

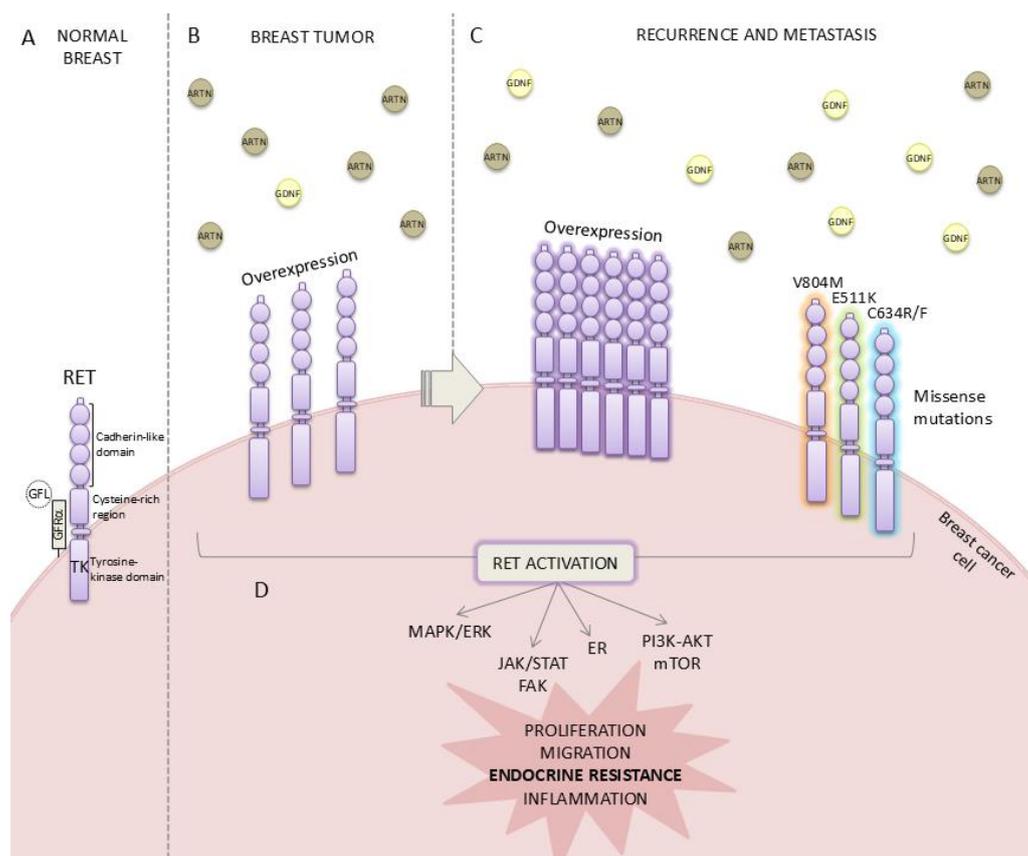


Figura I2. Alteraciones de RET en cáncer de mama y la contribución de sus vías de señalización a la tumorigénesis. (A-B) En el cáncer de mama, RET está sobre-expresado en comparación con el tejido mamario normal. La activación de RET requiere dimerización con co-receptores y ligandos de la familia GDNF, pero también puede ocurrir en ausencia de ligandos, debido a mutaciones que favorecen su activación constitutiva. (C) Además, en un pequeño porcentaje de tumores mamarios se han hallado mutaciones activadoras. (D) Tras la recurrencia a la enfermedad, debido a la resistencia a la terapia endocrina, los niveles de RET aumentan aún más y se han descrito mutaciones específicas (E511K, C634R/F o V804M). La señalización activada por RET incluye vías de quinasas oncogénicas canónicas (MAPK/ERK, PI3K-AKT/mTOR y FAK) y la activación de factores de transcripción relevantes en oncogénesis mamaria como las proteínas pro-inflamatorias STATs o el receptor de estrógeno (ER), que contribuyen a la proliferación y migración tumoral y a la resistencia endocrina. Adaptado de (Gattelli et al. 2020).

Respecto de los otros componentes de la vía de señalización de RET, los ligandos de la familia GDNF están presentes y desempeñan un papel clave en la progresión tumoral en cáncer de mama. Además de RET, varios reportes indican que el co-receptor GFR α 1 y el ligando GDNF se encuentran sobre-expresados en cáncer de mama (Esseghir et al. 2007). Mientras que PSPN es en general indetectable, NRTN y ARTN se expresan en los tumores mamarios (Gattelli et al. 2018; 2020). Por otro lado, ARTN se ha vinculado al cáncer de mama de subtipo luminal ER+ y su expresión se asocia a la resistencia a la terapia endócrina (Kang et al. 2010). Respecto de los otros ligandos, ambos, GDNF y ARTN están asociados con un mayor potencial de proliferación y migración celular, así como con la supervivencia de las células tumorales (Gattelli et al. 2013; I. Plaza-Menacho et al. 2010; Kang et al. 2010).

Modelo tumoral mamario de ratón transgénico Ret/MTB

Para investigar *in vivo* la función oncogénica de RET en la glándula mamaria, nuestro grupo ha desarrollado un modelo de ratón transgénico inducible denominado Ret/MTB (Gattelli et al. 2018) (**Figura I3**). En este sistema (Gunther et al. 2002) la forma no mutada del gen *Ret51* humano fue clonada e introducida río abajo del promotor mínimo inducible por el antibiótico tetraciclina (TetO-Ret). Además, contiene una secuencia IRES-luciferasa (Luc) que se utiliza como gen reportero de la inducción del transgén. Estos ratones que contienen la secuencia TetO-Ret (Ret^{-/-}) se cruzan con los ratones de la línea transgénica MMTV-rtTA (MTB^{-/-}), los cuales expresan el transactivador del promotor TetO dependiente de tetraciclina (rtTA) bajo el promotor del MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*), el cual otorga la especificidad de la expresión en el epitelio mamario. Ambos ratones son de *background* genético de la cepa FVB/N. De este modo, se genera la progenie bitransgénica Ret/MTB (**Figura I3**).

Este mismo sistema (Gunther et al. 2002) ha sido utilizado para estudiar el efecto de varias proteínas oncogénicas como MYC y HER2 en la glándula mamaria (Blakely et al. 2005; Moody et al. 2002). En nuestro caso, la expresión de RET es inducida mediante la ingesta del antibiótico análogo de tetraciclina, doxiciclina (DOX), contenida en el agua de bebida de los ratones: en presencia de DOX, el rtTA cambia de conformación y se une a su promotor, de modo que la expresión de RET y Luc es inducida en el epitelio de la glándula mamaria. Bajo administración de DOX, los niveles de RET en las glándulas pueden ser monitoreados *in vivo* usando bioluminiscencia, midiendo la actividad luciferasa luego de la inyección intraperitoneal de luciferina, o bien luego de las autopsias de los ratones correspondientes detectando la expresión de RET en muestras de tejido mamario mediante ensayos de *Western blot* (WB) con anticuerpos específicos (**Figura I3**).

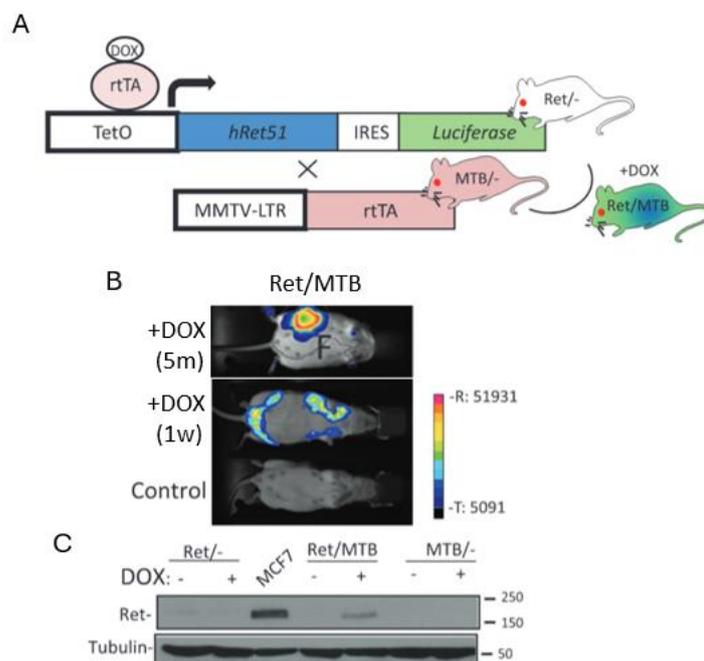


Figura I3. Modelo tumoral inducible de ratón transgénico Ret/MTB. (A) El gen de *RET51* humano (*hRet51*) fue clonado a partir de células tumorales humanas MCF7 e introducido río abajo del

operador mínimo de tetraciclina (TetO). Un sitio IRES-luciferasa (Luc) se introdujo como gen reportero de la expresión del transgén. Para generar los animales bitransgénicos (Ret/MTB), los ratones conteniendo la secuencia TetO-Ret (Ret/-) fueron cruzados con la línea transgénica MMTV-rtTA (MTB/-), la cual expresa constitutivamente la proteína transactivadora del promotor TetO (rtTA) en las células del epitelio mamario. Mediante el agregado de doxiciclina (DOX) al agua de bebida de los ratones Ret/MTB, el rtTA cambia de conformación y puede unirse a su promotor; así la expresión de RET y Luc es inducida en la glándula mamaria. (B) Imágenes representativas de bioluminiscencia que muestran el monitoreo de la expresión del transgén mediante la detección de la actividad de Luc en un tumor, producido por el tratamiento de DOX durante 5 meses (+DOX 5m), y en las glándulas mamarias de ratones Ret/MTB vírgenes bajo 1 semana de tratamiento con DOX (+DOX 1w). Ratones sin tratamiento de DOX fueron usados como control negativo. (C) La expresión de RET fue corroborada mediante ensayos de WB usando anticuerpos específicos sobre lisados proteicos de tejido mamario de los ratones hembra bitransgénicos Ret/MTB y los controles indicados, bajo tratamiento de DOX (+) o no (-). El lisado de células MCF7 fue usado como control positivo de la expresión de RET humano. Adaptado de (Gattelli et al. 2018).

Utilizando este modelo de ratones transgénicos Ret/MTB, nuestro grupo demostró por primera vez la función oncogénica de la forma no mutada de RET en el epitelio mamario (Gattelli et al. 2018). La expresión crónica (4-8 meses de inducción) de RET en la glándula mamaria genera tumores mamarios (**Figura I3**) (Gattelli et al. 2018). Los tumores Ret/MTB expresan RET en su forma activa (fosforilada) mostrando además expresión de algunos ligandos y co-receptores (Gattelli et al. 2018). La caracterización de estos tumores sumada al análisis de secuenciación masiva de RNA (RNAseq) del tejido tumoral mostró que estos tumores poseen características similares a los tumores luminales humanos (Sorlie et al. 2003): expresan niveles relativamente bajos de HER2 (sin amplificación), son positivos para ER y negativos para PR (ER+PR-), y son resistentes a la terapia endócrina (**Figura I4**).

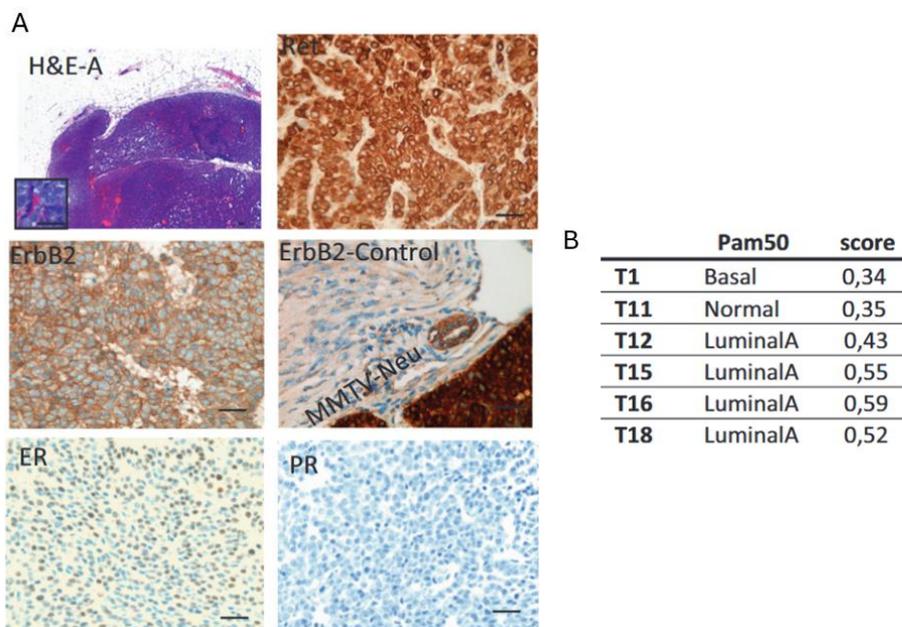


Figura I4. Características de los tumores inducidos por RET en el sistema transgénico Ret/MTB. (A) Se muestra la morfología por tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de un corte de tumor representativo y distintas inmunotinciones de receptores de interés sobre el tejido tumoral (Ret, Her2/ErbB2, ER y PR). Se utilizó un corte perteneciente a un tumor MMTV-Neu/ErbB2 como control positivo de ErbB2. (B) Resultados del análisis de la expresión génica global de tumores Ret/MTB

respecto de los subtipos de cáncer de mama. El RNA de fragmentos de 6 tumores primarios independientes se obtuvo utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen) y se sometió a secuenciación profunda utilizando Illumina HiSeq 2500 (GSE83897). Para predecir los subtipos intrínsecos de tumores, se realizó una agrupación jerárquica de los tumores Ret/MTB basada en perfiles globales de secuenciación de RNA utilizando el modelo de PAM50. Se indican las puntuaciones de cada correlación. Adaptado de (Gattelli et al. 2018).

En este sistema, previo al desarrollo de los tumores (2 meses de inducción), la expresión de RET en los ratones produce hiperplasias mamarias (Gattelli et al. 2018). Respecto a las hembras del grupo control (MTB/-), las hembras Ret/MTB muestran glándulas mamarias de mayor tamaño, observado por montaje de órgano completo o *Whole-Mount* (WM); con abundantes ramificaciones laterales, lo que resulta en un aumento significativo del área cubierta por conductos y grasa circundante (**Figura I5A**). Estas hiperplasias mamarias exhiben un aumento significativo de marcadores de proliferación en las células epiteliales, visualizada por ensayos de IHC con anticuerpos específicos para histona 3 fosforilada en serina 10 (pS10H3), lo que indica una mayor proliferación celular promovida por la expresión de RET, en comparación con las glándulas control (**Figura I5B**) (Gattelli et al. 2018)

Además del incremento en la proliferación celular, las hiperplasias y lesiones neoplásicas producidas por la sobre-expresión de RET exhiben en ciertas regiones un tejido adiposo estromal aberrante, compuesto por adipocitos de tamaño variable y abundante fibrosis, lo que puede observarse en cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) (**Figura I5C**). Estas primeras observaciones resultaron relevantes, ya que sugieren que el proceso tumorigénico dirigido por RET en la célula tumoral involucra modificaciones del tejido adiposo mamario circundante. En esta dirección, las investigaciones de la segunda y tercer parte (Parte II y III) de este trabajo de tesis implican una contribución novedosa (Vallone et al. manuscrito en preparación).

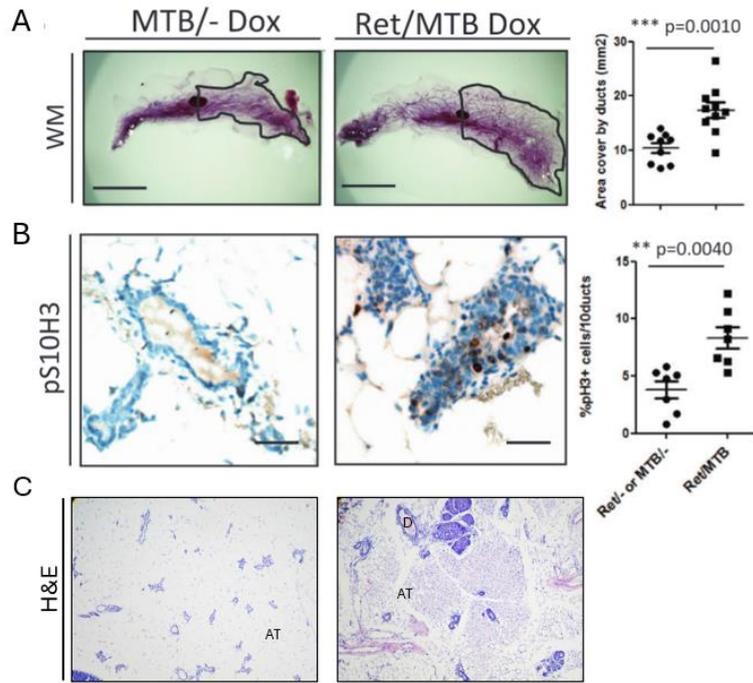


Figura 15. Características de las hiperplasias y lesiones mamarias inducidas por RET en el sistema transgénico Ret/MTB. (A) Hembras adultas tratadas durante 2 meses con doxiciclina (DOX) muestran hiperplasias mamarias. Se muestra el examen morfológico por WM. Se indica la cuantificación del área cubierta por ductos. (B) Se muestran cortes histológicos de IHC para el marcador de proliferación pS10H3. Se indica la cuantificación de la tinción. Adaptado de (Gattelli et al. 2018). (C) Se muestra la morfología observada en tinciones de H&E sobre las hiperplasias mamarias generadas por RET en el sistema Ret/MTB (AT: tejido adiposo, D: ducto mamario).

En la glándula mamaria, el tejido adiposo es el principal componente del microambiente estromal. Por lo tanto, en el contexto del cáncer de mama, las células tumorales se encuentran en estrecho contacto con el tejido adiposo, el cual sufre modificaciones. Los estudios en modelos animales y muestras humanas han demostrado que los adipocitos cercanos al tumor sufren cambios significativos en su estructura y función, afectando la progresión tumoral. Comprender en profundidad la comunicación entre la célula tumoral mamaria y el tejido adiposo es relevante a la hora de identificar nuevas moléculas de interacción que podrían resultar en nuevos blancos terapéuticos para combatir el cáncer de mama.

Hipótesis y Objetivos

El receptor RET ha sido identificado como un oncogén en el epitelio mamario. Considerando las características de la glándula mamaria, que implican una estrecha interacción entre las células epiteliales mamarias y los adipocitos circundantes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y a partir de las observaciones obtenidas en nuestro modelo transgénico, en el que las lesiones neoplasias inducidas por RET en la glándula mamaria exhiben un tejido adiposo aberrante, nuestra **Hipótesis** es que el proceso tumorigénico mediado por RET en las células tumorales involucra una modulación del estado de madurez del tejido adiposo en el microambiente mamario.

El **Objetivo general** de la tesis es comprender los mecanismos por los cuales RET, presente en la célula tumoral, regula la interacción del tumor con el tejido adiposo mamario y cómo esto puede impactar en la progresión tumoral.

En cada una de las partes del presente trabajo, nos propusimos abordar los siguientes **Objetivos específicos**:

Objetivo 1. Investigar la expresión de RET y las características de las lesiones neoplásicas inducidas por él durante el desarrollo de la glándula mamaria (Parte I).

Objetivo 2. Determinar el impacto de la señalización de RET en la célula tumoral sobre el estado de diferenciación del tejido adiposo mamario (Parte II).

Objetivo 3. Comprender el mecanismo de interacción entre la célula tumoral y el tejido adiposo en el contexto de RET (Parte III).

Metodología

Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares positivas para la expresión de RET (RET+): células humanas tumorales MCF7 y T47D (ER+PR+), células tumorales murinas EO771 (ER+PR-) y J110 (ER+PR+). Además se utilizaron las células HEK-293T para la producción de vectores lentivirales, y una línea de pre-adipocitos (PA), desarrollada en el laboratorio de nuestra colaboradora la Dra. Guadalupe Sabio (CNIO, España), producida a partir de la inmortalización del cultivo primario de células adiposas mamarias murinas (Matesanz et al. 2017). La línea PA puede diferenciarse a adipocito maduro (Matesanz et al. 2017), lo que se encuentra detallado más adelante.

Las MCF7, T47D e EO771 fueron cultivadas en DMEM alta glucosa (Gibco), 10% SFB (Internegocios), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco). La línea J110 fue cultivada en DMEM/F12 (Gibco), 5% SFB, 50ug/ml gentamicina (Gibco). Las células HEK-293T se cultivaron en DMEM/F12, 10% SFB, 1% penicilina/estreptomicina, y la línea de PA en DMEM/F12, 8% SFB, 1% penicilina/estreptomicina. Los medios de cultivo utilizados fueron suplementados con glutamina semanalmente (2mmol/L), y en todos los casos las células fueron controlada para la ausencia de micoplasma mediante PCR con primers específicos y cultivadas en placas de plástico convencionales (Next, Corning) en una estufa a 37°C y 5% de CO₂.

Generación de líneas celulares editadas para la expresión de RET (RET-KO)

Trabajamos en la generación de dos modelos murinos carentes de la expresión de RET o *knock out* (KO) mediante el sistema CRISPR/Cas9. Para ello, utilizamos las líneas EO771 y J110, ambas utilizadas anteriormente por el grupo (Bottos et al. 2016).

1. Generación del sistema CRISPR/Cas9 en células EO771 y J110

Como parte de un proyecto multidisciplinario con el Dr. Juan Pablo Fededa (IIB-CONICET, UNSAM) y el Dr. Manuel de La Mata (IFIBYNE-CONICET, UBA), y la participación del Dr. Marcos Palavecino (IFIBYNE-CONICET, UBA), se generaron los plásmidos necesarios para establecer las líneas EO771 y J110 con expresión constitutiva de la nucleasa Cas9 (EO771-Cas9 y J110-Cas9) acoplada a la proteína fluorescente GFP (GFP-Cas9) o Tomato (TOM-Cas9). Simplificadamente, el sistema utilizado constó de dos plásmidos: uno conteniendo la nucleasa Cas9 asociado a una proteína fluorescente, y otro, que contenía la secuencia de cada *single guide* RNA (sgRNA). Para ello, se utilizaron los plásmidos comerciales Ruc-GFP (Addgene) para la generación del plásmido que contiene la Cas9-GFP (o Cas9-Tom, con clonados adicionales), y RucTom (Addgene) y pCI Neo (Addgene) para la generación del vector Lentiguide Neor, en el cual se clonaron las distintas sgRNAs (**Figura M1**). De manera resumida, luego de los subclonados necesarios hasta obtener las construcciones deseadas, las mismas fueron introducidas en vectores lentivirales, como se describirá más adelante, y cultivos celulares fueron infectados y posteriormente seleccionados por fluorescencia, para verificar la incorporación del plásmido Cas9-GFP, o mediante el uso de antibióticos, para el Lentiguide Neor.

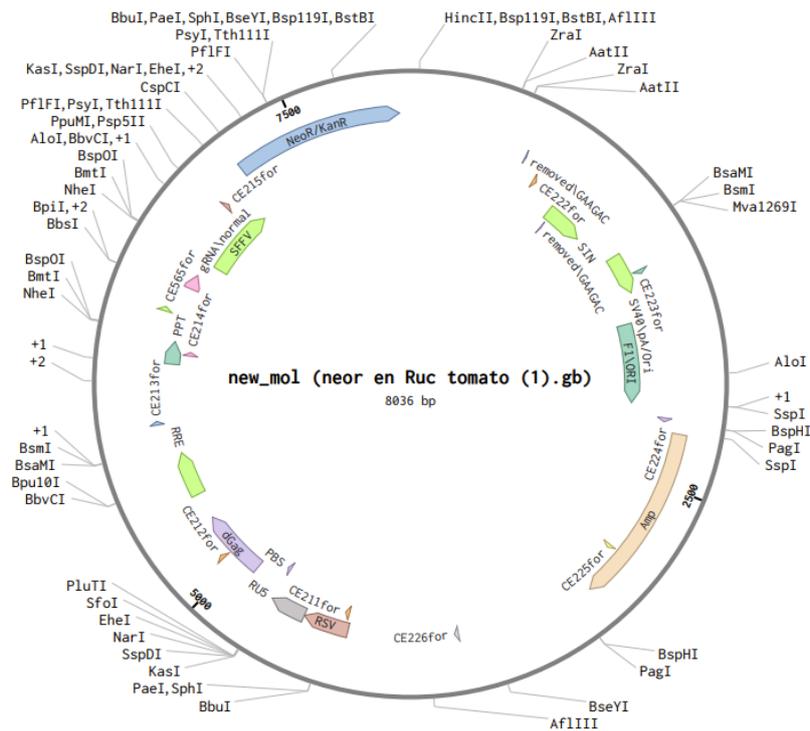


Figura M1. Esquema general del plásmido lentiviral utilizado para la generación de virus conteniendo las sgRNAs. Mapa del plásmido Lentiguide Neor utilizado para clonar las sgRNAs contra el gen de *Ret* y posterior producción de lentivirus en células HEK-293T.

Las células EO771 y J110 positivas para GFP-Cas9 o TOM-Cas9 se enriquecieron mediante clasificación celular de un solo evento activada por fluorescencia (FACS) utilizando un FACS Aria II (Becton Dickinson, San José, CA) con dos láseres, de 488 y 633 nm. Solo se utilizaron células con una media de 99% de verde, lo cual se logró después de 3 rondas de clasificación (*pools*); también se aislaron clones individuales mediante el método estándar de dilución límite. Las líneas clonales generadas (*clones*), Cas9-GFP y Cas9-Tom, se evaluaron *in vivo* mediante inyecciones subcutáneas en la almohadilla de grasa o *fat pad* de ratones hembra (C57BL/6 o FVB/N, para EO771 o J110, respectivamente) para confirmar que el crecimiento tumoral fuera similar al de la línea parental (**Figura M2**).

Observamos que mientras la línea EO771-Cas9 (TOM o GFP) se comporta de manera similar a su parental (WT) respecto del crecimiento tumoral (**Figura M2A**), la línea J110-Cas9 no genera tumores *in vivo*, independientemente del fluoróforo, como si lo hace la línea J110 parental (**Figura M2B**). Especulamos que este efecto puede deberse a que la proteína Cas9, o bien las proteínas fluorescentes (TOM y GFP), producen una reacción inmunológica por la cual las células tumorales son erradicadas, evitando el crecimiento del tumor, lo cual se ha descrito en algunas cepas de ratón (Grzelak et al. 2022). Resultados similares de rechazo *in vivo* se obtuvieron en el laboratorio durante la edición de células 4T1 (4T1-Cas9) al ser inyectadas en ratones hembra BALB/c (parte de otro proyecto). Por lo tanto, decidimos continuar con el uso de la línea EO771 en nuestras

investigaciones.

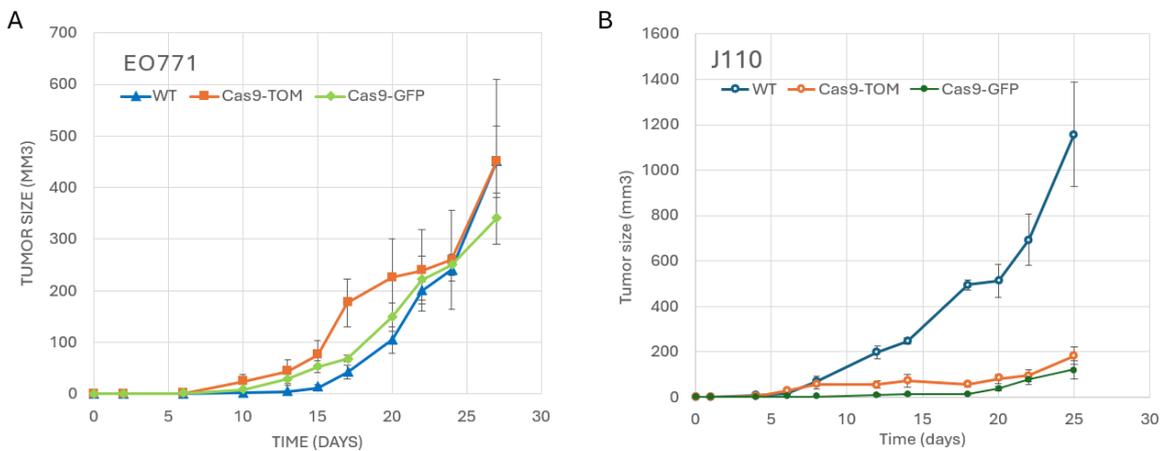


Figura M2. Ensayos de crecimiento tumoral *in vivo* de líneas celulares murinas como modelo de tumores ER+ endócrino resistentes. Se muestran las curvas de crecimiento tumoral en función del tiempo de tumores generados en ratones hembra (5-8 semanas de edad) C57BL/6 (A) o FVB/N (B) por inyección subcutánea de 1×10^6 células parentales (WT, n=6) o editadas (TOM-Cas9, n=8; GFP-Cas9, n=8) llevando las correspondientes proteínas fluorescentes (GFP o TOM) acopladas a Cas9.

2. Diseño de *single guides* RNA (sgRNAs) para el gen de RET

Se diseñaron dos sgRNAs alternativas complementarias (sg1RET y sg2RET, nombradas como Ret_gRNA162 y Ret_gRNA3) a la secuencia del exón 2 del gen de *Ret* murino (*Gene ID: 19713*) (**Figura M3**). Estas secuencias de 20 pares de bases aproximadamente guiarán a la nucleasa Cas9 a la región del gen donde se desea realizar el corte doble cadena (**Tabla M1**). Se diseñaron también *primers* complementarios (nombrados como Ret_CheckPCR_Fw y Ret_CheckPCR_Rv) a las regiones intrónicas flanqueantes al exón 2, para verificar luego la edición mediante el ensayo de T7 endonucleasa, que se describirá más adelante (**Figura M3**).

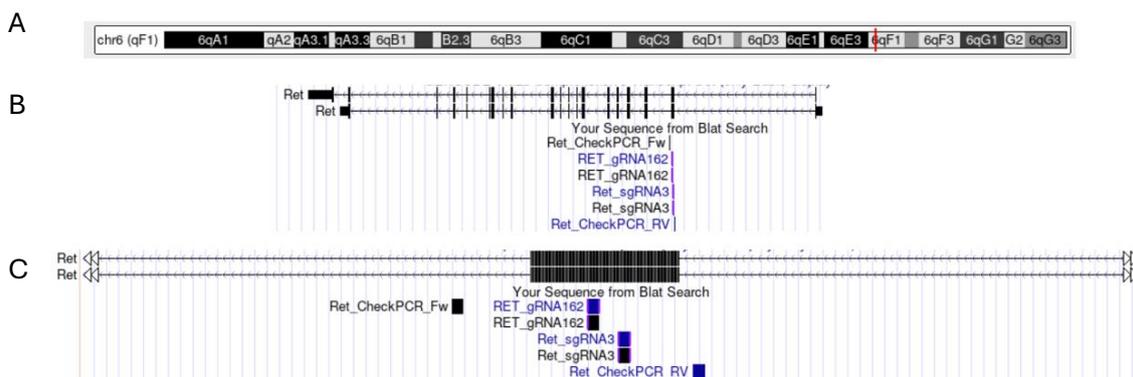


Figura M3. Esquema de ubicación de las sgRNAs y *primers* de verificación sobre el gen de *Ret*. (A) Se indica el esquema indica las distintas regiones del cromosoma 6 murino y la ubicación del gen de *Ret* (rojo). (B) Se muestra el esquema del gen de *Ret* a mayor aumento donde se indica la direccionalidad del gen y los distintos fragmentos exónicos e intrónicos. Se muestran dos de los transcritos producidos por el gen. (C) Esquema que muestra la ubicación de las sgRNAs con

respecto a la secuencia del exón 2 de *Ret* y la de los *primers* de chequeo, complementarios a las regiones intrónicas flanqueantes a dicho intrón.

Nombre sgRNA	Secuencia sgRNA	Oligo clonado (sgRNA+adaptadores)
RET_gRNA_162 Fw	TCTATGGCGTCTACCGTACA	CACCGT TCTATGGCGTCTACCGTACA
RET_gRNA_162 Rv	TGTACGGTAGACGCCATAGA	AAACTG TACGGTAGACGCCATAG AC
Ret_sgRNA3 Fw	CATGCCCTACGGGATGCCCC	CACCGC CATGCCCTACGGGATGCCCC
Ret_sgRNA3 Rv	GGGGCATCCCGTAGGGCATG	AAACGG GGGCATCCCGTAGGGCAT GC

Nombre <i>primer</i>	Secuencia
Ret_CheckPCR_Fw	AAGCAACTGCCTTTACCCTGT
Ret_CheckPCR_RV	TCGATGTTTTCCCATCCCCA

Tabla M1. Secuencias de las sgRNAs para editar el gen de RET y los primers utilizados para verificar la edición. En negrita se indican las secuencias adaptadoras que se utilizaron para ligar las sgRNA al plásmido.

3. Generación de los plásmidos conteniendo sgRNAs y producción de las partículas lentivirales

Para la generación de los plásmidos conteniendo las sgRNAs para RET se llevó a cabo el protocolo ampliamente utilizado y publicado por el laboratorio del Dr. Zhang (Shalem et al. 2014; Sanjana, Shalem, and Zhang 2014). Se llevó a cabo la digestión y desfosforilación del plásmido Lentiguide Neor, producido previamente, con las enzimas BbsI (Thermo Fisher) y FastAP (Thermo Fisher), respectivamente. Luego, purificamos el plásmido digerido y realizamos el apareamiento o *annealing* y la fosforilación de las secuencias sgRNAs complementarias. Por último, se ligaron las sgRNAs con el plásmido digerido y se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* de la cepa Stbl3 (producción IFIBYNE), apropiada para la producción de vectores lentivirales.

Las transformaciones se realizaron por electroporación. Para ello, se mezclaron 1-5 µl de la ligación/plásmido en un tubo de microcentrífuga con las bacterias y se incubaron en hielo por 10-30 minutos; luego se electroporaron, se agregó 950 µl de LB y se permitió su recuperación por 30-45 minutos. Finalmente, se sembraron las bacterias en una placa de LB Agar con ampicilina (Bagó). Las preparaciones de DNA plasmídico de pequeña escala (*miniprep*) se realizaron usando un *kit* de extracción siguiendo el protocolo del fabricante (GE HealthCare). Luego se cuantificaron las muestras a partir de la medición de su absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (Nanodrop) y se enviaron para su secuenciación (Macrogen) para confirmar su correcto clonado. Sólo se utilizaron los plásmidos en los cuales se haya confirmado la ausencia de mutaciones.

Las partículas lentivirales se produjeron en células HEK-293T con los vectores de empaquetamiento pMD2.G (Addgene #12259) y pCMVR8.74 (Addgene #22036). Para ello, $2,5 \times 10^6$ células se plaquearon en placas de 60 mm, al día siguiente se trataron con cloroquina y se transfectaron con polietilenimina (PEI) con los plásmidos que contenían las sgRNAs, junto con los plásmidos de empaquetamiento (**Tabla M2**). Entre 4 y 6 horas posteriores se cambió el medio celular para finalizar las transfecciones. Luego de 48 horas, se colectaron los sobrenadantes, se filtraron mediante filtros de 0,48 µm y se utilizaron en

títulos bajos (MOI<0.5) para infectar células EO771-Cas9.

<i>Incubación 30'-60' pre-transfección</i>	<i>Volumen por reacción</i>
<i>Cloroquina (µl)</i>	1
<i>DMEM/F12 10% SFB (ml)</i>	2

<i>Transfección</i>	<i>Volumen/cantidad por reacción</i>
<i>DMEM/F12 0% SFB (µl)</i>	400
<i>pMD2.G (µg)</i>	0,6
<i>pCMVR8.74 (µg)</i>	1,2
<i>PEI (µl)</i>	18
<i>sgRNA-LentiNeo (µg)</i>	2,5

Tabla M2. Condiciones utilizadas para la producción lentiviral. Se detallan en la tabla las condiciones y volúmenes utilizados para la transfección de HEK-293T y producción de lentivirus conteniendo las sgRNAs.

4. Infección de células EO771-Cas9 y establecimiento de las líneas RET-KO y RET-WT. Infectamos células EO771-Cas9 con las partículas lentivirales obtenidas como se describió previamente, las cuales contienen las sgRNAs diseñadas para editar el gen de *Ret*, o bien el vector vacío como control. De este modo se promueve la inserción de las sgRNAs y el gen de resistencia a G418 en el genoma de las células. Para ello se plaquearon 20.000 células en una placa de 24 pocillos y al día siguiente se infectaron con los virus agregando Polybrene, para aumentar la eficiencia de la trasducción viral. Las infecciones se realizaron por 5 horas y luego se seleccionaron las células con el agregado de G418 (Goldbio) al medio de cultivo (200 µg/ml). Expandimos las células seleccionadas (*pools*) y se congelaron viales para su almacenamiento y posterior uso. A partir de aquí, a estas células siempre se las cultivaron y mantuvieron bajo la presión de selección del antibiótico G418.

5. Verificación del *knock-out* mediante ensayo de T7 endonucleasa

Realizamos ensayos de T7 endonucleasa, para verificar el corte doble cadena donde se realizó la edición que genera las células RET-KO. Este ensayo es un método que se usa para evaluar la actividad de nucleasas de sitio específico, como el sistema CRISPR-Cas9 (Sentmanat et al. 2018). La T7 endonucleasa reconoce y escinde el DNA que no está emparejado correctamente. Para ello, se amplificó primero la secuencia del exón 2 del gen de RET, comprendida entre los *primers* de chequeo (**Tabla M1**), mediante ensayos de PCR. Luego, se desnaturalizaron y re-hibridaron los productos de PCR (95°C por 5', 95-85° - 2°C/segundo, 85-25°C -0.1°C/segundo), y se digirieron con la endonucleasa T7, incubando la muestra con 1 µl de la enzima (NEB #M0302) por 15 minutos a 37°C. Por último, se visualizaron los productos por electroforesis en gel de agarosa 1% en *buffer* TAE adicionándose a la preparación de agarosa bromuro de etidio (0,5 µg/ml). En una calle adicional se corrió un marcador de peso molecular (producción IFIBYNE). Adicionalmente, se utilizaron además ensayos de *Western Blot* (WB) sobre lisados proteicos con anticuerpos específicos para RET (CS#3223) para verificar la ausencia de la proteína de RET en las células.

6. Producción de líneas clonales por dilución límite.

Como se mencionó antes, los *pooles* celulares fueron enriquecidos por FACS. Además, para evitar la posterior selección o enriquecimiento celular durante los ensayos *in vivo*, se procedió con la generación de líneas clonales en cultivo. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de las células editadas y se plaquearon en placas de 96 pocillos, de modo que, en cada pocillo, idealmente, quede una célula. Se descartaron aquellos pocillos donde se reconocieron dos o más células, y se realizó la expansión de cada uno de los clones aislados, aumentando la superficie de cultivo progresivamente. Cada clon se congeló como una línea independiente y se extrajeron lisados celulares para corroborar la expresión o ausencia de RET por WB. A partir del análisis del WB, se eligieron los mejores clones: aquellos que tenían ausencia total (RET-KO) o presencia de RET (RET-WT).

Ensayos en roedores de laboratorio (*in vivo*)

Los animales utilizados en este trabajo fueron criados y mantenidos en el Bioterio Central (BC) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA). La cepa C57BL/6 es de producción del BC. La cepa FVB/N y la transgénica Ret/MTB (también con fondo FVB/N) son de producción del grupo. Los ratones fueron mantenidos en *racks* ventilados en cuartos acondicionados a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un esquema automático controlado de 12 horas luz/12 horas oscuridad, con comida y agua suministrada *ad libitum*, y cuidados siguiendo las reglas ARRIVE y las normas establecidas por el NIH (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011).

Todos los procedimientos experimentales utilizados en este trabajo están aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y buen Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCEN (protocolo#53, aprobado 2016, enmienda aprobada en 2018; y protocolo#116, aprobado 2021; investigador responsable Dra. Gattelli). Además, las personas a cargo de la concepción, diseño y realización de este proyecto, poseen aprobado el curso obligatorio de capacitación para el uso de animales de laboratorio dictado por la CICUAL.

- **Obtención de muestras de tejidos mamario en animales WT en distintos estadios del desarrollo de la glándula mamaria**

Para poder investigar los niveles de expresión de RET en distintos estadios de la glándula, se utilizaron hembras no transgénicas (WT) de la cepa FVB/N en diferentes etapas de desarrollo. Se permitió a las hembras amamantar camadas (normalizadas de 7-10 crías) durante 8-12 días, y luego se separaron las crías de las madres para iniciar la involución mamaria (involución forzada). Se esciendieron las glándulas de hembras vírgenes (V), hembras preñadas (P), hembras en lactancia durante 5 días (L5), 10 días (L10) o 15 días (L15), o de hembras en involución 12 horas (I12), 48 horas (I48) o 72 horas (I72) después del retiro de las crías. Todas las hembras utilizadas tenían entre 3 y 4 meses de edad. El tejido mamario se conservó tanto para procesamiento histológico (incubado en PFA 4% en PBS por 24 horas y luego almacenado en 70% EtOH a 4°C), como para técnicas de biología molecular (conservado a -80°C); se utilizaron al menos tres ratones por grupo para cada etapa del desarrollo.

- **Ensayo de bloqueo de pezón en hembras lactantes**

Realizamos experimentos *in vivo* de inducción local de involución mamaria (Schere-Levy et al. 2003). Ratones hembra FVB/N WT de entre 3 y 4 meses de edad lactantes de 10 días, fueron sometidas al sellado unilateral del pezón, mediante el uso de pegamento instantáneo (La Gotita), de una de las glándulas mamarias inguinales para impedir, de este modo, el estímulo de succión de las crías e inducir la involución local de la glándula sellada (M. Li et al. 1997; Schere-Levy et al. 2003). Las otras glándulas mamarias permanecen intactas, permitiendo la lactancia normal por parte de las crías. Luego del sellado, los ratones continuaron amamantando a sus crías durante 48 horas adicionales (L12) y posteriormente, se escindió tanto la glándula sellada como una de las glándulas control que permanecieron intactas, de cada animal.

- **Modelo tumoral mamario de alotrasplante EO771 RET-KO**

Luego de la tripzinización de los cultivos celulares, las células tumorales mamarias EO771 fueron contadas y re-suspendidas en PBS y posteriormente inyectadas subcutáneamente (s.c.) en la #4 almohadilla de grasa o *fat pad* de la glándula mamaria inguinal izquierda de ratones hembra C57BL/6 (1×10^6 células/100 μ l) de entre 3 y 4 meses de edad. Para experimentos específicos, se realizaron co-inyecciones de células EO771 (EO771 RET-KO o RET-WT) junto con pre-adipocitos, PA. En esos casos, las líneas celulares se crecieron independientemente y el día de la inyección se prepararon las suspensiones de modo de inyectar cada ratón con 1×10^6 de células tumorales + 1×10^6 de PA. Suspensiones de 1×10^6 de PA también fueron inyectados solos como control. El tamaño tumoral se midió cada 2-3 días con un calibre (*Caliper Vernier*) y se calculó el volumen tumoral como $V = \text{diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2 \times \pi/6$ (Gattelli et al. 2013). Las curvas de crecimiento fueron generadas graficando V en función del tiempo, en donde cada punto corresponde al promedio de V en cada grupo experimental y control. Los experimentos transcurrieron resguardando la salud de los animales y respetando que el volumen no supere los límites permitidos (1800 mm^3). En algunos casos, previo a la realización de las autopsias, específicamente 18 horas antes, los ratones se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) con una solución de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, Sigma) en PBS estéril, lo que permite cuantificar la cantidad de células en proliferación.

Al realizar las autopsias, además de coleccionar el tejido tumoral (T), se escindió el tejido adiposo adyacente al tumor (TAAT) correspondiente a la almohadilla de grasa adyacente, y también fue extraído el tejido adiposo de la glándula mamaria contralateral no inyectada (AT), como control (**Figura M4**). Se extrajo material tanto para procesamiento histológico (incubado en PFA 4% en PBS por 24 horas y luego almacenado en 70% EtOH a 4°C), como para técnicas de biología molecular (conservado a -80°C). En todos los casos se evaluó la presencia de metástasis en los pulmones, sin encontrar diferencias evidentes.

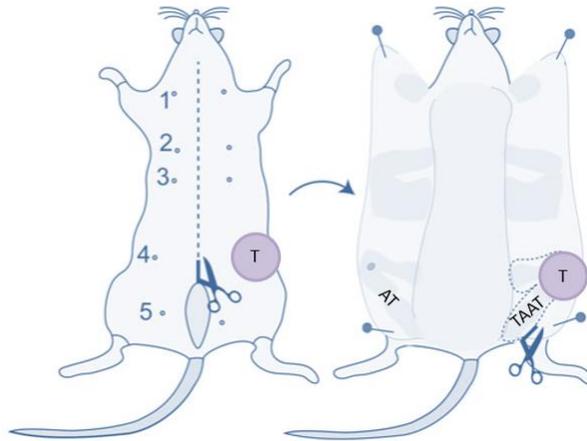


Figura M4. Esquema de autopsias y extracción de tejidos para posterior análisis. Se muestra un esquema de un ratón hembra en posición ventral. Las células tumorales se inyectaron subcutáneamente en la almohadilla de grasa de la glándula mamaria inguinal (#4) izquierda. Se muestran las incisiones realizadas en los animales para ingresar a la cavidad abdominal. Se extrajeron material tumoral (T), tejido adiposo adyacente al tumor (TAAT) y tejido adiposo de la glándula mamaria contralateral como control (AT).

- **Modelo tumoral mamario de ratones transgénicos Ret/MTB**

El modelo transgénico Ret/MTB descrito en la Introducción (Gattelli et al. 2018) se ha generado en el laboratorio de la Dra. Nancy Hynes (FMI, Suiza) e incorporado y establecido en el BC de la FCEN de la UBA por la Dra. Gattelli.

1. Mantenimiento de la línea transgénica

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

2. Genotipado de los animales

A partir de los 21 días de vida, se les extrajo a los animales una pequeña porción de tejido de las orejas (*ear punching*) para extraer DNA genómico. A los fragmentos extraídos se les agregó 75 µl de una solución de lisis alcalina (NaOH 25mM y *buffer* EDTA a pH 12) y se los calentó a 95°C por 30 minutos. Pasado este tiempo, se agregó a cada tubo 75 µl de una solución de Neutralización (*buffer* Tris-HCl 40 mM a pH 5). Luego de este procedimiento, se espera que el DNA genómico quede libre en solución.

La genotipificación de la línea transgénica se efectuó a través de reacciones de PCR, donde se utilizaron dos juegos de *primers* específicos (Gattelli et al. 2018). Un juego de *primers* se utilizó para amplificar una región genómica codificante para la proteína Ret 51 humana (Ret) y parte del vector, el cual corresponde a un producto de 200 pb. El otro par de *primers*

se utilizó para reconocer la presencia del promotor MMTV-rtTA (MTB), con un producto de amplificación de 354 pb (**Tabla M4**). En cada muestra se analizó la presencia de ambos genes, lo cual implica 2 reacciones de PCR, una por cada par de *primers*. La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, donde 2 µl corresponden al DNA genómico y 23 µl a la mezcla de reactivos para PCR, compuesta por: 2,5 µl de *buffer* 10X, 1,5 µl MgCl₂, 0,2 µl de taq (PB-L Productos Bio-lógicos), 0,5 µl dNTPs (Lobov Científica), 0,1 µl de *primer forward*, 0,1 µl de *primer reverse* y 18,1 µl de H₂O destilada.

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

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

Fragmento génico	Secuencia	Longitud (pb)
<i>Ret</i>	Forward: 5'-ATCCACGCTGTTTTGACCTC-3' Reverse: 5'-CGAGAAGTAGAGGCCCAATG-3'	200
<i>MTB</i>	Forward: 5'-ATCCGCACCCTTGATGACTCCG-3' Reverse: 5'-GGCTATCAACCAACACACTGCCAC-3'	354

Tabla M4. Secuencias de los *primers* utilizados para el genotipado de la línea transgénica Ret/MTB.

3. Inducción *in vivo* de la expresión de RET durante distintos estadios del desarrollo de la glándula mamaria.

Para los animales transgénicos, las etapas de desarrollo, vírgenes (V), lactancia (L) e involución (I), se consideraron como se describe para los ratones WT y en todos los casos se utilizaron hembras de 3 a 4 meses de edad. Específicamente, la etapa de post-involución (Post-I) se definió como una glándula que ha regresionado 2 meses después de la lactancia, tras la extracción de las crías.

Se generaron hembras bitransgénica Ret/MTB, monotransgénicas Ret/- o MTB/- y hembras no transgénicas -/- y se pusieron a preñar. Se retiraron los machos cuando la preñez estuvo confirmada por presencia de tapón mucoso o por evidencia observacional de preñez. Una vez nacidas las crías, se normalizó el número de las mismas (8-10 crías por hembra). Para la activación del transgén, se utilizó el antibiótico doxiciclina (DOX, Jenner Lafarvet)

administrándolo a través del agua de bebida (2g/l) de todos los animales experimentales y controles. La DOX fue renovada cada 2-3 días de los bebederos, los cuales se mantuvieron protegidos de la luz mediante papel aluminio. El tratamiento se mantuvo durante distintos tiempos, según se indica (**Figura M5**). A continuación, se detallan los experimentos realizados mediante el sistema transgénico:

- Sobreexpresión de RET durante la lactancia (**Figura M5A**): Dos días posteriores al parto de las crías se comenzó con el tratamiento de DOX y se mantuvo hasta el día 10 de lactancia, momento en el cual los ratones fueron autopsiados y se extrajeron y almacenaron para análisis las glándulas.
- Sobreexpresión de RET durante la involución (**Figura M5B**): En el día 8 de lactancia se inició el tratamiento con DOX. Luego de dos días, en el día 10 de la lactancia, se retiraron las crías (considerando este como el primer día de involución) y se continuó con la DOX durante 3 días más (I72), momento en el cual los ratones fueron autopsiados y se extrajeron y almacenaron para análisis las glándulas. Como control, se utilizaron hembras lactando Ret/MTB sin administración de DOX, y hembras Ret/- y MTB/- con DOX con la misma administración que el grupo experimental.
- Sobreexpresión de RET durante la post-lactancia (**Figura M5C**): En el día 10 de lactancia, se retiraron las crías (considerando este como el primer día de involución), se inició el tratamiento con DOX y, 2 meses después (Post-I), los ratones fueron autopsiados, se extrajeron y almacenaron para análisis las glándulas. Hembras vírgenes Ret/MTB se sometieron al tratamiento con DOX durante 2 meses como control.
- Sobreexpresión de RET en hembras vírgenes: Hembras vírgenes Ret/MTB se sometieron al tratamiento con DOX durante 7 meses para promover la producción de tumores. En aquellos animales donde los tumores se detectaron por palpación, se monitoreó el crecimiento tumoral. Transcurridos los 7 meses de inducción, a un grupo de animales portadores de tumores se le retiró el tratamiento con DOX por 48 horas (DOX-OUT) para promover la regresión del crecimiento de los mismos como se halla reportado (Gattelli et al. 2018).

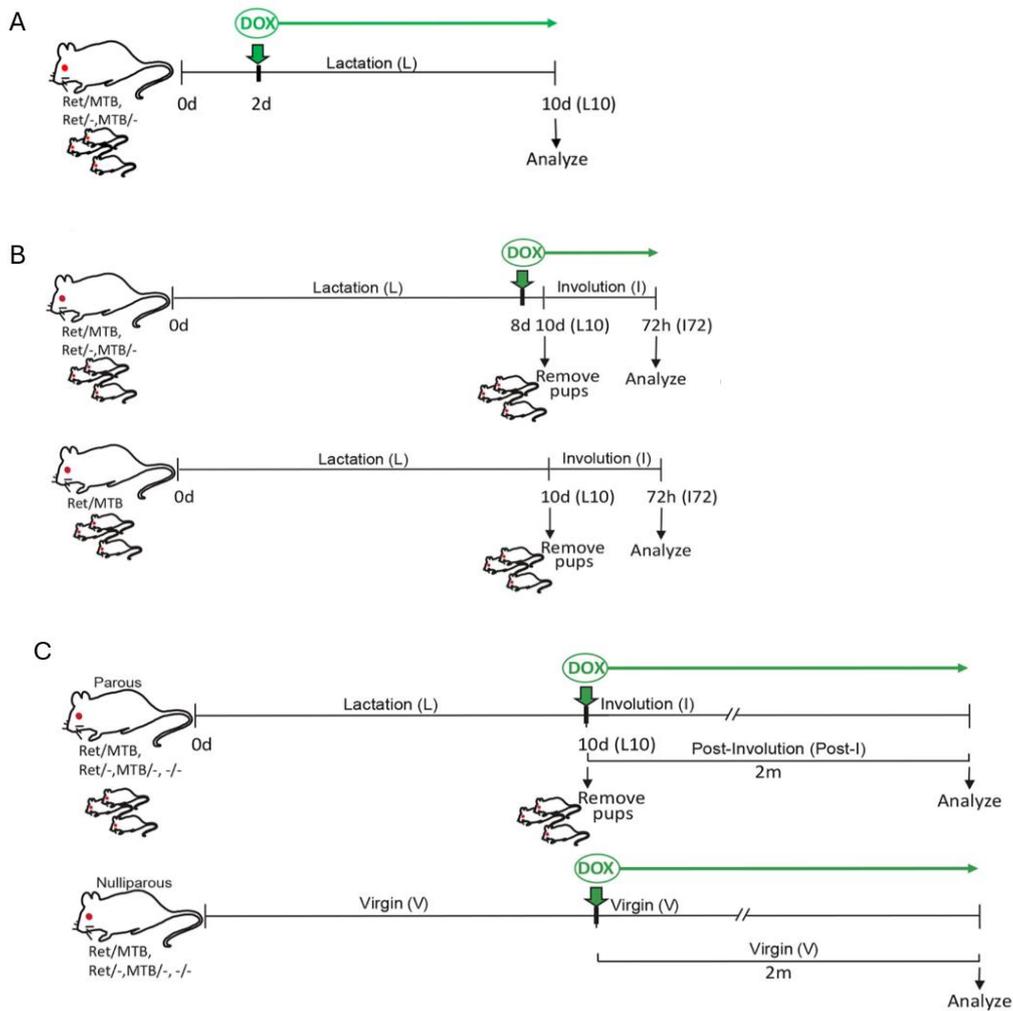


Figura M5. Esquemas de experimentos de inducción de RET en los ratones Ret/MTB. (A) Esquema del experimento de sobreexpresión de RET durante la lactancia (N=2). Hembras Ret^{-/-} o MTB^{-/-} (n=6) y Ret/MTB (n=7) lactantes se pusieron en tratamiento con DOX (2 g/l) durante 8 días, a partir del día 2 de lactancia. Los animales se mantuvieron con sus crías para que la lactancia continúe. A los 10 días de lactancia (L10) se finalizó el tratamiento con DOX y se extrajeron y analizaron las glándulas mamarias. (B) Esquema del experimento de sobreexpresión de RET durante la involución (N=2). Hembras Ret^{-/-} o MTB^{-/-} (n=6), como grupo control, y Ret/MTB (n=12) se dejaron lactar normalmente por 8 días. En el día 8 de lactancia, los animales Ret^{-/-} o MTB^{-/-} (n=6) y un grupo Ret/MTB (n=6) se pusieron en tratamiento con DOX (2 g/l). Otro grupo de hembras Ret/MTB se mantuvo sin tratamiento de DOX, como otro grupo control. Luego de dos días (L10), se removieron las crías para forzar la involución mamaria en todos los grupos y se mantuvo el tratamiento de DOX en aquellos que ya se venían tratando. Después de 72 horas de involución (I72), se extrajeron y analizaron las glándulas mamarias. (C) Esquema del experimento de sobreexpresión de RET para la generación de hiperplasias durante la transición lactancia-involución (N=3). Se utilizaron hembras transgénicas adultas de los genotipos indicados que atravesaron un solo parto (arriba, *Parous*) y se encontraban durante la lactancia, o vírgenes, sin ningún parto (abajo, *Nulliparous*). La inducción de DOX se inició en el momento que lo indican las flechas verdes para cada grupo de hembras control (Ret^{-/-}, MTB^{-/-} o -/-, *parous* n=4, *nulliparous* n=4) o experimentales (Ret/MTB, *parous* n=4, *nulliparous* n=5). Para el caso de las hembras lactantes, en L10 se retiraron las crías para inducir la involución mamaria y ese mismo día se comenzó con el tratamiento con DOX. Las hembras vírgenes comenzaron con el tratamiento de DOX el mismo día que el grupo lactante, de modo de tratar ambos grupos en paralelo y realizar las autopsias conjuntamente al final del experimento. Los animales se

mantuvieron bajo tratamiento con DOX (2 g/l) durante 2 meses (2m) y posteriormente se extrajeron y analizaron las glándulas mamarias de todos los animales.

De los experimentos realizados en estadios del desarrollo mamario, de cada animal, se conservaron al menos 3 de glándulas: las glándulas inguinales de ambos lados (#4) y las axilares (#2) en caso de que presentaran algún tipo de anomalía, como excesiva irrigación sanguínea o diferentes densidades en el tejido. En el caso de los experimentos de producción de tumores, se conservó tanto el tejido tumoral (T) como el tejido adiposo adyacente (TAAT), como se describió para los experimentos del modelo de tumores de alotrasplantes EO771 (**Figura M4**). Del mismo modo, se conservó material en -80°C para análisis de biología molecular y en PFA 4% en para el posterior procesamiento histológico. En forma de rutina, también se observaron los pulmones para evaluar la presencia de metástasis, sin hallar diferencias significativas.

Análisis histológico

El tejido extraído y conservado en EtOH 70% (previamente fijado en PFA 4% en PBS por 24 horas) se envió para su procesamiento y obtención de tacos de parafina y sus respectivos cortes histológicos en blanco (montados en portaobjetos silanizados) al servicio técnico de la Universidad Maimónides. Las tinciones de hematoxilina & eosina (H&E) sobre los cortes fueron realizados en este laboratorio.

Todas las imágenes histológicas fueron obtenidas mediante microscopio óptico (Microscopio Olympus CX31) con objetivos de 4x, 10x, 20x y 40x, resultando magnificaciones de X40, X100, X200 y X400, respectivamente. Todas las imágenes histológicas se informan con la magnificación correspondiente indicadas en las leyendas de las figuras.

Para los ensayos de determinación de la incidencia tumoral en el experimento realizado en el modelo transgénico Ret/MTB, el cual compara los animales Ret/MTB vírgenes (n=5) con el grupo Ret/MTB post-lactancia (n=4) y los grupos controles (Ret/-, MTB/- o -/-), se utilizaron 4 cortes seriados teñidos con H&E (separados por 15 µm) de las glándulas mamarias inguinales #4 de cada uno de los animales de cada grupo. Mediante la observación al microscopio óptico se contabilizó la presencia o no de lesiones neoplásicas (denominadas MINs) para cada uno de los cortes por animal.

Inmunohistoquímica (IHC)

Se utilizaron cortes de entre 5 y 6 µm de espesor del material montado en portaobjetos sin teñir (blancos). Para desparafinar las muestras, los vidrios se incubaron a 60°C por 45 minutos y luego se colocaron en xilol durante 10 minutos. Posteriormente se hidrataron los cortes con pasajes de 3 minutos en alcohol de concentración decreciente (100%, 95% y 70%). A continuación, se realizó la recuperación antigénica colocando los vidrios en *buffer* citrato (Citrato de sodio 1 mM, pH 6) e incubándolos en microondas durante 10 minutos a una temperatura de sub-ebullición. En particular, para las IHC de detección de Stat3 fosforilado, la recuperación antigénica se realizó en *buffer* EDTA 1 mM calentando los vidrios durante 2 minutos a potencia máxima y 5 minutos a potencia baja. Posteriormente, para inactivar la enzima peroxidasa endógena se incubaron las muestras por 10 minutos

en H₂O₂ al 3% en PBS y luego se realizaron tres lavados en PBS de 3 minutos cada uno. Este paso es crucial ya que se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, por lo que la actividad de la peroxidasa endógena deber ser agotada. Seguido a eso, se realizó el bloqueo del pegado inespecífico de los anticuerpos con una solución de albúmina sérica bovina (BSA, Promega) al 2,5% en PBS en cámara húmeda por 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron preparados en BSA al 2,5% en PBS (**Tabla M5**) e incubados en cámara húmeda toda la noche (ON) a 4°C. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS y se incubaron los vidrios con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente para cada caso preparado en BSA al 2,5% en PBS en cámara húmeda a temperatura ambiente por 1 hora. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Con el objetivo de amplificar la señal resultante se incubaron las muestras con una solución de un complejo biotina-avidina unidas a (VECTASTAIN® ABC kit, Vector) en una dilución 1:1 en PBS, la cual se incubó por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego se llevaron a cabo 3 lavados de 5 minutos con PBS y se agregó el reactivo DAB (Vector) durante aproximadamente 1 minuto, el cual es procesado por la peroxidasa unida al complejo, dando un precipitado marrón en el lugar donde se encuentra la proteína de interés. Luego de visualizar la marcación deseada bajo microscopio óptico se frenó la reacción con agua destilada y finalmente se realizó una contra-tinción con hematoxilina (Biopack) para teñir y visualizar los núcleos celulares. Se procedió con la deshidratación de las muestras con pasajes sucesivos en alcohol con concentración creciente. Finalmente se embebieron los vidrios en xilol y se montaron con bálsamo sintético (Biopack).

<i>Anticuerpo</i>	<i>Concentración</i>	<i>Proveedor</i>	<i>N° de catálogo</i>
pY705 Stat3	1:50	Cell Signaling	9145
pS10 Histone3 (pS10H3)	1:200	Cell Signaling	9701
RET	1:50	Santa cruz	sc-167
Claved-caspase3 (CC3)	1:100	Cell Signaling	9661
Perilipin1	1:200	Cell Signaling	3470
Ucp1	1:200	Abcam	AB10983
PDGFR α	1:100	R&D systems	AF1062
ER	1:1000	Santa cruz	sc-542
PR	1:200	Thermo Scientific	RM-9102
BrdU	1:100	Abcam	AB6326
Rabbit	1:400	Vector Labs	PK-6101
Mouse	1:400	Vector Labs	BA-2000
Goat	1:400	Vector Labs	BA-9500

Tabla M5. Anticuerpos utilizados para los ensayos de IHC.

Se realizaron distintas cuantificaciones dependiendo del tipo de marca producida por las distintas tinciones. Para la cuantificación de marcaciones nucleares en cortes de tejido mamario, como pY705Stat3, BrdU y pS10H3, se contaron los núcleos de células epiteliales positivos (marrones) y negativos (azules) en 6-8 campos seleccionados al azar a un aumento de X400 y los datos se expresaron como % de núcleos positivos para pY705Stat3 respecto del total de núcleos contabilizados. Para el caso de la cuantificación de este tipo de marcaciones en tumores, solo se contaron los núcleos positivos y se lo expresó como # de células positivas por campo. El resultado obtenido para otras inmunomarcaciones

como la de Perilipin1, PDGFR α y CC3, se las cuantificó midiendo el área teñida. Para ello, se tomaron fotos de los cortes (X400) y mediante ImageJ se cuantificó el área teñida (marrón) y el área total del corte visualizado en la foto. Los datos se expresaron como el % del área teñida respecto del área total. En todos los casos, se excluyeron las zonas de necrosis, zonas en donde los tejidos están plegados o dañados y los bordes (*edge*) del espécimen, regiones en donde en ocasiones la acumulación de anticuerpos puede resultar en falsos positivos.

En colaboración con la Dra. Gladys Hermida (DBBE, FCEN), se realizaron tinciones de tricrómico de Masson sobre cortes de tejido mamario y tejido tumoral para favorecer la visualización de fibras de colágeno.

Análisis de proteínas mediante *Western Blot* (WB)

1. Extracción de proteínas

A partir del tejido mamario y/o tejido tumoral conservado a -80°C, se obtuvieron extractos de proteínas totales. Se utilizó la solución de lisis y extracción de proteínas RIPA (Tris-HCl 20 mM, pH=7,4; EDTA 2 mM; NaCl 137 mM; Glicerol 10%; SDS 0,1%; Deoxicolato de Sodio 0,5%; Tritón X100 1%) suplementada con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem, San Diego, CA) y de fosfatasas (NaF 1mM, glicerolfosfato de sodio 40 mM y Na₃VO₄ 1 mM). De cada muestra se tomó un trozo de tejido de aproximadamente medio centímetro de diámetro y se lo homogeneizó en 600 μ l de la solución de lisis. Las muestras se homogeneizaron utilizando Ultraturrax T25 (Ika Labortechnik Staufen, Alemania) hasta lograr la completa disociación del tejido. Los extractos se centrifugaron por 30 minutos a 4°C a 12000 g y se separó el sobrenadante, el cual se conservó a -80°C. Para las proteínas de células en cultivo, las mismas se lisaron directamente con *cracking buffer* sobre los pocillos de las placas.

2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante el método *Bradford* realizando una dilución 1:20 en PBS a cada muestra y una curva de calibración con concentraciones crecientes (1-12 μ g/ μ l) de BSA. Se tomaron 20 μ l de cada muestra o punto de la curva y se sembraron en placas de 96 pocillos (BD) con 200 μ l de reactivo de *Bradford* (*Coomassie Blue* G250 4%; Etanol 5%; ácido fosfórico 8,5%). Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro y se construyó la curva de calibración correspondiente graficando absorbancia en función de la concentración de BSA. Luego, se tomó la función de la curva, que responde a la Ley de Lambert-Beer y se utilizó la misma para calcular la concentración de las muestras incógnita. Esto es posible si la absorbancia de las muestras coincide con la zona de linealidad de la curva de calibración. Para este trabajo se utilizaron curvas con un R² mayor a 0,9. Se prepararon las muestras para su posterior análisis conteniendo aproximadamente 30-100 μ g de proteína.

3. Ensayo de WB

Se agregó *cracking buffer* (Tris-HCl 50mM, pH 6,8; SDS 2%; Glicerol 10%; Azul de Bromofenol 0,006%) y β -mercaptoetanol 1% a los extractos proteicos y se incubaron durante 10 minutos a 95°C para completar el proceso de desnaturalización de las

proteínas. Se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Dependiendo del grado de resolución deseado entre las proteínas, se realizaron geles de poliacrilamida (Bio-Rad) de diferente concentración (10%, 12,5% o 15%). Se sembraron las muestras junto con un marcador de peso molecular conocido (*Page Ruler Plus prestained marker*, Pierce; Rainbow marker, GE) y se realizaron las electroforesis a voltaje constante (100 V durante aprox. 10 minutos, seguido de 160 V por 1 hora y 20 minutos), en el *buffer* de corrida (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; Glicina 192 mM; SDS 0,1 %).

Finalizada la corrida, las muestras se transfirieron a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, GE HealthCare) o de nitrocelulosa (Amersham), según la disponibilidad en el laboratorio mediante transferencia húmeda. La transferencia se realizó a 250 amperes durante dos horas o a 30 V ON, para favorecer la transferencia de proteínas de peso molecular alto. Se tiñeron las membranas con una solución de rojo Ponceau-S (Rojo Ponceau 0,1%; Ácido Acético 5%) para corroborar la correcta electrotransferencia y se cortaron de acuerdo a las proteínas de interés y los pesos moleculares de las mismas. A continuación, se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución 5% de leche en polvo en TBS-T (Tween 0,1% en buffer TBS 1X). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación con la dilución deseada de los anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés (**Tabla M6**), preparados previamente en leche 5% en TBS-T.

Al día siguiente se realizaron 2 lavados de 15 minutos cada uno en TBS-T. Luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con diluciones de los respectivos anticuerpos secundarios preparados en leche 5% en TBS-T. En estos estudios, se utilizaron tanto el método de revelado en placa, para el cual se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a HRP, como el de revelado por fluorescencia en un equipo *Odissey* (LI-COR) utilizando anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos. Una vez transcurrida esta incubación, se realizaron 2 lavados de 15 minutos con TBS-T. Por último, se realizó el revelado del ensayo mediante una reacción quimioluminiscente utilizando el reactivo ECL+PlusSystem (GE HealthCare) y exposición a placas radiográficas (Thermo Scientific) a diferentes tiempos (10 o 30 segundos y 1, 5, 15 o 30 minutos); o bien, el revelado se realizó mediante excitación de las membranas con láseres específicos y medición el equipo *Odissey*.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Nº de catálogo</i>
Ret	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	#3223
pY1062Ret	1:1000	<i>Santa Cruz</i>	sc-2052
Erk	1:5000	<i>Cell Signaling</i>	#9102
pT202/Y204 Erk 1/2	1:5000	<i>Cell Signaling</i>	#9101
Stat3	1:5000	<i>Transduction Lab</i>	#610190
pY705Stat3	1:5000	<i>Cell Signaling</i>	#9131
Stat5	1:5000	<i>Cell Signaling</i>	#9363
pY694Stat5	1:5000	<i>Cell Signaling</i>	#4322
DLK1	1:1000	<i>Proteintech</i>	#10636-1-AP
SOX9	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	AB5535
PDGF-B	1:1000	<i>Santa Cruz</i>	sc-365805
PDGF-A	1:1000	<i>Santa Cruz</i>	sc-9974

PDGFR α	1:1000	R&D systems	AF1062
pY742PDGFR α	1:1000	R&D systems	AF2114
Vinculina	1:2000	Santa Cruz	sc-73614
α Tubulina	1:2000	Neomarkers	MS-581-P1
Goat-HRP	1:10000	Santa Cruz	sc-2020
Rabbit-HRP	1:10000	Amersham	NA934
Mouse-HRP	1:10000	Amersham	NA931
Goat 800 RD	1:15000	IRDye	926-32214
Rabbit 800 CW	1:15000	IRDye	926-32213
Mouse 680 RD	1:15000	IRDye	926-68072

Tabla M6. Anticuerpos utilizados para ensayos de WB.

Cuando se indica, se llevó a cabo la cuantificación de las bandas de WB utilizando el procesador de imágenes ImageJ. Se expresó el resultado como unidades relativas de intensidad de la banda obtenida para la proteína de interés respecto de la banda obtenida para el control de carga (α Tubulina o Vinculina, depende el caso).

Ensayos en cultivo celular (*in vitro*)

Se describe a continuación el detalle metodológico de los distintos ensayos realizados en cultivo celular *in vitro*.

- **Análisis de activación de vías de señalización intracelulares (*signaling*)**

A lo largo de esta tesis se realizaron distintos ensayos para estudiar la activación de distintas vías de señalización intracelulares, tanto en células tumorales como en la línea de pre-adipocitos. Para ello, se sembraron entre 20.000 y 50.000 células (depende la línea) en placas de 6 o 12 pocillos. Al día siguiente, se hambreadon las células (1% SFB), las tumorales durante 24 horas y los pre-adipocitos durante 6 horas. Además, para algunos experimentos realizados en pre-adipocitos, quisimos inhibir la vía de PDGFR α , por lo que se agregó al medio de cultivo el inhibidor de este receptor, Imatinib (1 μ M, Sigma-Aldrich #SML1027), durante la última hora de las 6 que duró el hambreo. Luego, las células se estimularon con GDNF (10 ng/ml, Peprotech #450-10) durante 30 minutos para evaluar la activación de RET o con PDGF-BB (0,1 mg/ml, Peprotech #315-18) durante 20 minutos para activar la vía de PDGFR α . Una vez transcurridos los minutos de estimulación, se lisaron las células con *cracking buffer* y se levantaron con la ayuda de *scrappers*. Se congelaron las muestras fraccionadas a -20°C para posterior análisis por WB.

Se realizaron también experimentos para evaluar la producción de moléculas de señalización por parte de las células tumorales, para lo cual se realizaron estimulaciones más prolongadas. Para ello, se plaquearon las células y al día siguiente se hambreadon (1% SFB). Simultáneamente al hambreo, se agregó al medio de cultivo el inhibidor de RET, BLU-667 (2000nM, MCE #HY-112301), o el vehículo como control (DMSO). Al día siguiente, se estimularon las células con el ligando de RET, GDNF (25 ng/ml), en el caso de las MCF7, o con GDNF (25 ng/ml) y GFR α 1 (100 ng/ml, Peprotech), en el caso de las T47D. Luego de 48 horas, se lisaron las células con *cracking buffer*. En estos experimentos, donde se bloqueó la actividad de RET mediante un inhibidor específico, luego se probó la efectividad del bloqueo agregando GDNF en una concentración mayor a la que normalmente se usa, es

decir 25 ng/ml en vez de 10 ng/ml.

- **Preparación de medios condicionados (CM)**

Para la recolección de medios condicionados (CM), se plaquearon las células en placas de 100mm. Este procedimiento se realizó de la misma manera para las distintas líneas utilizadas, EO771, MCF7 y PA. Luego de 24 horas, las monocapas de células fueron lavadas con PBS y el medio de cultivo fue remplazado por uno libre de SFB (DMEM/F12 0% SFB 1% penicilina/estreptomicina), y fueron incubadas durante 18 horas. Los CM fueron recolectados y filtrados en filtros de 0,2 μm para asegurarnos que no haya células en ellos. Luego, los mismos se filtraron en columnas específicas para aumentar su concentración y se utilizaron para estimular otras células o bien, los incubamos con acetona a -20°C durante toda la noche para favorecer la precipitación de proteínas. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C . Se descartó la acetona y los precipitados fueron re-suspendidos en *cracking buffer* para realizar ensayos de WB.

- **Ensayos de diferenciación de adipocitos y efecto de los medios condicionados provenientes de células tumorales**

Se llevaron a cabo experimentos de diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos. Los mismos se realizaron en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC, Madrid, España), como parte de la colaboración que nuestro grupo tiene con la Dra. Guadalupe Sabio, realizando dos estancias de pasantía en su laboratorio en 2022 y 2023.

En estos experimentos, se plaquearon 20.000 células en placas de 12 pocillos y se crecieron en medio completo (DMEM/F12 8% SFB 1% penicilina/estreptomicina). Cada dos días el medio de cultivo fue reemplazado y suplementado secuencialmente con distintos compuestos que promueven la adipogénesis (Matesanz et al. 2017). A los dos días de plaquear las células, se reemplazó el medio por uno que contenía troglitazona (1 μM , Tocris Bioscience #3114/10), IBMX (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma #I5879), dexametasona (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma #D1756) e insulina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma #I9278) (D1). Dos días después el cambio de medio se hizo con uno que contenía troglitazona e insulina (D3). Los siguientes dos cambios de medio se suplementaron solamente con insulina (D5 y D7). Aproximadamente en el día 9 de haber comenzado la diferenciación (D9), los adipocitos se encontraban totalmente maduros y podían observarse fácilmente al microscopio las vacuolas lipídicas dentro de los mismos.

En este estudio, estudiamos el efecto de los medios condicionados provenientes de las células tumorales sobre el proceso de diferenciación y sobre adipocitos ya maduros. En el primer caso, lo que hicimos fue preparar los medios correspondientes a los distintos días de diferenciación (D1, D3, D5 y D7) en los medios condicionados provenientes de las células RET-KO o RET-WT (adicionados previamente con 8% SFB) o en el medio de cultivo de las células (DMEM/F12 8% SFB, 1% penicilina/estreptomicina), como control (MA). En el segundo caso, una vez obtenidos los adipocitos maduros, a partir del D9, se trataron con los medios condicionados (adicionados con 8% SFB), renovándolos cada 24 horas. El grupo control (MA) se mantuvo durante 72 horas en el medio habitual de los adipocitos. Estos tratamientos se realizaron por 72 horas y luego se cosecharon las células para las

distintas técnicas. En ambos casos, siempre se intentó que los medios tumorales utilizados sean frescos, es decir cosechados en ese mismo momento, o bien cosechados en los días anteriores y congelados a -20°C . De estos experimentos, se extrajo RNA para realizar RT-qPCR y también se fijaron las células para realizar tinciones de *Oil-red*. Si bien el porcentaje de células diferenciadas en cada uno de estos experimentos siempre fue mayor al 80%, los niveles de expresión de los genes relacionados con la adipogénesis variaron entre los distintos experimentos. Para poder juntar las mediciones, llevamos a cabo una normalización, relativizando los valores de los grupos experimentales al grupo control (MA) en cada caso. Se muestran los resultados de dos o tres experimentos juntos o *pooled*.

- **Ensayos de co-cultivo con insertos *transwell***

Se realizaron ensayos de co-cultivo indirecto entre las células tumorales EO771 y los pre-adipocitos y adipocitos mediante insertos *transwells* de tamaño de poro pequeño ($0,4\ \mu\text{m}$, Corning #3460). Para ello, se plaquearon 20.000 pre-adipocitos en una placa de 12 pocillos y se realizó el proceso de diferenciación. Dos días antes de que la diferenciación se complete, es decir en D7, otra placa de 12 pocillos se plaqueó con 7500 pre-adipocitos y, en paralelo, se plaquearon 10.000 células tumorales RET-WT y RET-KO en los insertos y se mantuvieron en una placa aislada. Dos días después, es decir en D9, se dio comienzo a los co-cultivos, colocando los insertos con las células tumorales sobre los adipocitos diferenciados y sobre la placa de pre-adipocitos sin diferenciar. El co-cultivo se realizó en el medio de los pre-adipocitos durante 48 horas, tiempo en el cual no se cambió el medio de cultivo. Transcurrido ese tiempo, los pre-adipocitos y adipocitos se lisaron para extracción de RNA y posterior medición de marcadores, y las células tumorales se tripsinizaron y contaron para, por un lado evaluar la proliferación celular, y por otro para plaquearlas en placas de Seahorse para realizar ensayos de *Mitostress* y *Glycostress*.

- **Caracterización celular de la función mitocondrial y la glucólisis en analizador de flujo Seahorse**

Células EO771 RET-WT y RET-KO creciendo en condiciones normales y las células provenientes del experimento de co-cultivo se tripsinizaron y plaquearon en dos microplacas *Agilent Seahorse XF96*. Se plaqueó también una tercer placa de 96 pocillos, para utilizarla de control de carga de los experimentos mediante el ensayo de Bradford. Al día siguiente, se realizaron los ensayos de *MitoStress* y *Glycostress* utilizando un analizador Seahorse XF96 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

El ensayo de *MitoStress* se realizó según el protocolo del fabricante. Brevemente, las células se incubaron con medio suplementado con 25 mM de glucosa, 2 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato de sodio, y se colocaron durante 1 hora en una estufa sin CO_2 a 37°C . Luego, las células se expusieron a una serie de compuestos que inhiben la fosforilación oxidativa mitocondrial: el inhibidor de ATPasa oligomicina, el desacoplador de protones FCCP y el inhibidor de los complejos I y III rotenona/antimicina A, añadidos en ese orden. Los valores de OCR obtenidos en respuesta a los diferentes inhibidores se analizaron mediante el programa *Seahorse Wave* (Agilent) y se utilizaron para calcular la respiración basal, máxima, no mitocondrial, producción de ATP, eficiencia de

acoplamiento, fuga de protones y capacidad respiratoria de reserva. Los valores se normalizaron según la cantidad de proteína presente en cada pocillo mediante Bradford.

Para el ensayo de GlycoStress, las células se incubaron durante 1 hora con medio suplementado con 1 mM de glutamina pH 7,4, en una estufa sin CO₂. Luego, las células se expusieron a compuestos que afectan la glucólisis: glucosa (10 mM), oligomicina (1 μM) y 2-deoxiglucosa (50 mM), añadidos en ese orden. Se evaluó la glucólisis, la capacidad glicolítica, la reserva glicolítica y la acidificación no glicolítica mediante mediciones de la tasa de acidificación extracelular (ECAR), según el protocolo del fabricante. Los valores se normalizaron según la cantidad de proteína presente en cada pocillo mediante Bradford.

- **Tinción de lípidos con *Oil-red***

Los cultivos de adipocitos (D9) se tiñeron mediante la tinción de *Oil-red*, de modo de colorear los lípidos contenidos en las vacuolas celulares. Para ello, las células en placas de 6 pocillos se lavaron con PBS 1X y a continuación se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizó un lavado con PBS y dos con agua destilada y se incubaron las células con 500 μl de propilen-glicol durante 5 minutos en agitación. Se añadió 1 ml de una solución de *Oil-red* 5% en PBS (Sigma #O0625) y se mantuvieron las placas durante dos horas en agitación. Por último, se retiró el *Oil-red*, se lavaron tres veces las células con agua destilada y se dejaron secar para fotografiar en el microscopio óptico. Luego de tomar las fotografías, se llevó a cabo la disolución del colorante para su cuantificación por absorbancia. Para ello, se agregó 1 ml de isopropanol en cada pocillo y se mantuvieron las placas en agitación hasta que el colorante se encontrara completamente disuelto. Las soluciones obtenidas se sembraron por triplicado a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 520 nm.

- **Ensayos de viabilidad celular por incorporación de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS)]**

Este método colorimétrico permite determinar el número de células viables utilizando el compuesto [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, o MTS]. El MTS es reducido por la actividad enzimática de NADH o NADPH en células metabólicamente activas, formando un producto coloreado (Formazán) que es soluble en el medio de cultivo y detectable mediante la lectura de su absorbancia a 490 nm.

Para optimizar el ensayo, se realizaron curvas de calibración para distintas cantidades de células para las distintas líneas utilizadas, con el fin de determinar una densidad de siembra óptima que permitiera detectar tanto aumentos como disminuciones en la actividad metabólica en respuesta a distintos estímulos. El protocolo seleccionado fue el siguiente: comenzando con células en una placa con una confluencia máxima del 70%, las células fueron tripsinizadas, centrifugadas y contadas en cámara de Neubauer antes de ser sembradas en medio completo en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas, se hambreadon las células (1% SFB). Algunos pocillos se mantuvieron con medio completo como controles, mientras que otros, que contenían solo medio (no células), se utilizaron como blancos. Se realizaron observaciones al microscopio a las 24, 48 y 72 horas después

del cambio de medio. A las 72 horas, se evaluó el estado metabólico de las células agregando 20 μ L de reactivo MTS por pocillo en oscuridad, seguido de la incubación de la placa a 37°C. Se tomaron lecturas de absorbancia a 490 nm a los 20, 40, 60 y 80 minutos. Luego, se graficó la absorbancia en función de la cantidad de células, obteniéndose una curva lineal cuya ecuación fue empleada para calcular el número de células viables en experimentos posteriores. Este proceso de optimización llevó a la selección de una densidad inicial de 10.000/15.000 células MCF7 o T47D por pocillo en placas de 96 pocillos para los ensayos (**Figura M6**).

A continuación, se llevó a cabo la determinación del IC₅₀ del inhibidor de RET, BLU-667, en células MCF7 y T47D. Para ello, se realizaron ensayos de MTS en curvas de concentración entre 10 y 2000 nM del inhibidor y fueron acompañadas por curvas de concentración de DMSO como control. Al día siguiente de plaquear las células en la concentración adecuada, las mismas se hambreadaron y trataron con las distintas concentraciones de inhibidor. Luego de 24 horas, las células se trataron con el ligando de RET, GDNF (25 ng/ml), para evaluar el efecto de la viabilidad celular en respuesta al inhibidor, en combinación con el ligando. El cálculo de IC₅₀ para cada línea celular se realizó teniendo en cuenta la lectura de MTS y las observaciones realizadas al microscopio, siendo el IC₅₀ la concentración en la que la viabilidad de las células disminuye a la mitad. El IC₅₀ para este inhibidor resultó ser 2000nM para ambas líneas celulares (se muestra para MCF7) (**Figura M6**).

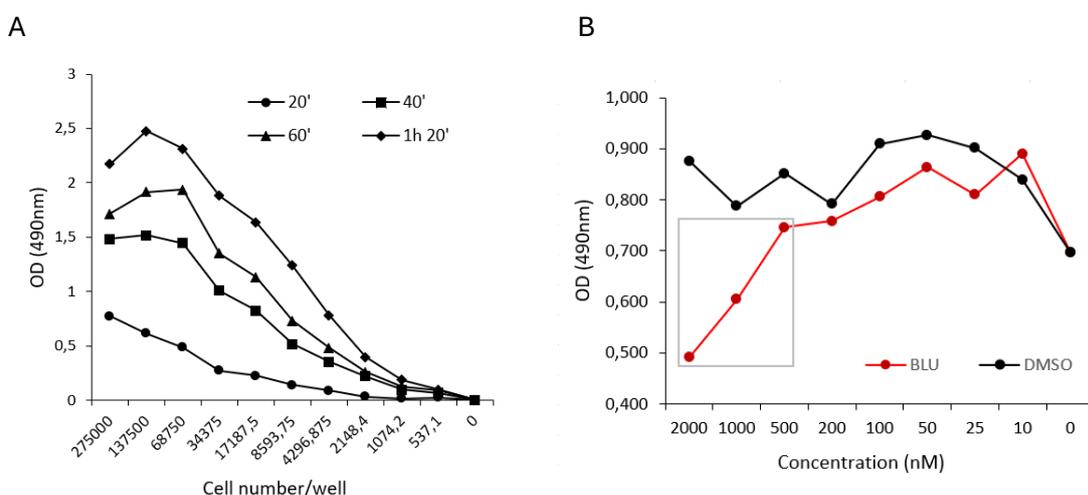


Figura M6. Optimización del ensayo de MTS. (A) Curva de calibración de la densidad celular mediante ensayo de MTS (se muestra para MCF7). Se plaquearon las distintas cantidades de células y 72h después se agregó el reactivo de MTS y se midió la absorbancia a 490 nm. (B) Células MCF7 se trataron con cantidades crecientes de BLU-667 (BLU) o de DMSO (DMSO) como control. Se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo de MTS luego de 72 horas de tratamiento y se determinó el IC₅₀ del compuesto.

Ensayos de PCR en tiempo real (RT-qPCR)

1. Extracción de RNA total

Se extrajo RNA de distintos experimentos para medir expresión de RNA mensajeros de interés. Para ello, se lisaron las células con Trizol Reagent (Molecular Research Center) y se congelaron las placas a -20°C para posterior extracción de ARN.

Se extrajo ARN de células lisadas y congeladas a -20°C contenidas en la placa. Con la ayuda de *scrappers*, el lisado fue colectado en tubos *ependorf* y se siguieron las indicaciones y los protocolos estipulados por el fabricante (Trizol Reagent). Brevemente, por cada 1 ml de Trizol, se agregaron 200 μl de cloroformo y se agitó manualmente vigorosamente con el fin de lograr separar 2 fases: una fase orgánica inferior conteniendo las membranas y otros componentes celulares, y una fase acuosa superior donde se solubiliza el ARN. Se incubó la mezcla 3 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de las fases, luego de lo cual se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 12000 rpm. La fase acuosa fue transferida y colectada en otro tubo. Seguidamente, se agregaron 500 μl de isopropanol con el fin de precipitar el ARN. Se centrifugó nuevamente a 4°C durante 10 minutos a 12000 rpm, tras lo cual se observó la presencia de un *pellet* blanquecino en la pared del tubo. Luego de extraer cuidadosamente el sobrenadante, el *pellet* fue lavado dos veces con 1 ml de etanol 75%. Finalmente se descartó el etanol 75% y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente por 5 min. Luego se resuspendió el precipitado en 20 μl de agua miliQ autoclavada libre de RNasas y se conservó a -80°C .

Se determinó la concentración del RNA extraído midiendo la absorbancia de cada muestra a 260 nm (longitud de onda a la que absorbe el RNA) utilizando un espectrofotómetro (*Nanodrop*). También se midió la absorbancia a 280 nm (longitud de onda en la que absorben los aminoácidos aromáticos). Como criterio de pureza, sólo se utilizaron las preparaciones de RNA cuya relación entre las absorbancias medidas a 260 y 280 nm fuera aproximadamente 2. Una relación de absorbancias 260/280 menor a 1,8 implicaría que la muestra se encuentra contaminada con remanentes del proceso de purificación, como el fenol. La integridad del RNA fue analizada mediante la corrida de las muestras en electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE teñido con bromuro de etidio: la observación de bandas correspondientes al RNA ribosomal mayoritario 18S y 21S se tomaron como indicativo de buena calidad de RNA. Una vez corroborada la pureza e integridad del RNA extraído y cuantificada su concentración, éste se conservó a -80°C .

2. Retrotranscripción del RNA al DNAc

Para evaluar el nivel de transcripción de determinados genes es preciso enriquecer la muestra en ARNm, por lo cual se utilizó un Oligo-dT que hibride con la cola de polyA de los mensajeros y pueda ser utilizado como *primer* en una reacción de PCR. En una primera etapa, a 1-2 μg de ARN de cada muestra se le agregó 1 μl de Oligo-dT (Biodynamics SRL, Buenos Aires, Argentina) y se completó un volumen final de 10 μl con agua libre de RNasas. Posteriormente, los tubos se incubaron a 72°C durante 5 minutos con el fin de permitir la hibridización entre el ARN y el Oligo-dT. Luego, a cada tubo de reacción se le agregó una *mix* preparada previamente compuesta por 1 μl de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen), 2 μl de DTT 0,1M y 2 μl de dNTPs 10mM (Promega, Madison, WI), llevándose a un volumen final de 10 μl con agua destilada libre de RNasas (volumen final= 25 μl). Una vez agregada la mezcla a cada tubo, se colocaron los mismos en un termociclador BIO-RAD T100 programado de la siguiente manera: 60 minutos a 37°C , luego 10 minutos a 72°C y, finalmente, 5 minutos a 95° . El ADNc resultante se guardó a -20°C .

3. Reacción de PCR y cuantificación en tiempo real (RT)

Para cuantificar los niveles de expresión de los genes de interés se llevaron a cabo ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). En el análisis y cuantificación de los datos se utilizó el método de curva estándar. Para ello, se realizaron curvas de diluciones seriadas con el DNAC. De este modo, para cada dilución conocida (en el eje x) se obtiene un valor de ciclo (*Ct value*, en el eje y) definido en el cual el producto de amplificación se detecta y se construye la curva estándar en donde la pendiente de la recta obtenida debió encontrarse entre -3.2 y -3.5 para garantizar la eficiencia de cada par de *primers*. Cada par de *primers* debió cumplir el requisito de que sus curvas de calibración tuvieran una pendiente cercana a -2 y que su R² fuera mayor a 0,97, de manera de ajustar correctamente a una función lineal correspondiente a la realización de diluciones al décimo.

Las reacciones de RT-qPCR en tiempo real se llevaron a cabo a partir del DNAC, en un volumen final de 25 µl en los cuales 3 µl corresponden al volumen de DNAC y 22 µl a una solución formada por: 1 o 4 mM MgCl₂ (según cada par de *primers*) (Life Technologies), 0,25 µl dNTPs (Promega), 1,25 U de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen o Inbio Highway), SYBR Green (Roche) diluido 1:30.000 en DMSO y 2 ng/ml de cada *primer* específico para la secuencia a amplificar (**Tabla M7**). Las reacciones se realizaron por duplicado utilizando el termociclador *StepOnePlus™ System* (ThermoFisher). El programa de ciclado utilizado fue: 5 minutos a 94°C; 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a la correspondiente temperatura de hibridación de los *primers* y 30 segundos a 72°C, efectuándose en este último paso las lecturas de la fluorescencia producida en cada ciclo. Para cada uno de los DNAC se analizó la obtención de un solo producto de amplificación mediante la observación de la curva de *melting* obtenida.

<i>Gen (mouse)</i>	<i>Secuencia de los primers</i>
<i>Gdnf</i>	Forward: 5'- AGGAGGAACTGATCTTTTCGATAT -3' Reverse: 5'- TGGCCTACTTTGTCACTTGTT -3'
<i>Nrtn</i>	Forward: 5'- GGGCTACACGTCGGATGAG -3' Reverse: 5'- CCAGGTCGTAGATGCGGATG -3'
<i>Gfra1</i>	Forward: 5'- CTGTGTGCTCCTATGAAGAACGA -3' Reverse: 5'- TTGCTGCAATCGCACCCACGGC -3'
<i>β-actin</i>	Forward: 5'- GGCTGTATCCCCCTCCATCG -3' Reverse: 5'- CCAGTTGGTAACAATGCCATGT -3'
<i>Leptin</i>	Forward: 5'- GAGACCCCTGTGTCGGTTC -3' Reverse: 5'- CTGCGTGTGTGAAATGTCATT -3'
<i>Adiponectin</i>	Forward: 5'- TGTTCTCTTATCCTGCCCA -3' Reverse: 5'- CCAACCTGCACAAGTTCCCTT -3'
<i>Cebpa</i>	Forward: 5'- CTGCTCTCCTTTCTCAGGGGT -3' Reverse: 5'- GTGTGCAGTGCTATCATCA -3'
<i>Pparg</i>	Forward: 5'- TCGCTGATGCACTGCCTATG -3' Reverse: 5'- GAGAGGTCCACAGAGCTGATT -3'
<i>Wisp1</i>	Forward: 5'- CAGCACCCTAGAGGAAACGA -3' Reverse: 5'- CTGGGCACATATCTTACAGCATT -3'
<i>Ucp1</i>	Forward: 5'- GTGAACCCGACAACCTCCGAA -3' Reverse: 5'- TGAACCTCCGGCTGAGAAGAT -3'
<i>Prdm16</i>	Forward: 5'- CCACCAGCGAGGACTTCAC -3' Reverse: 5'- GGAGGACTCTCGTAGCTCGAA -3'
<i>Pgc1a</i>	Forward: 5'- TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT -3'

<i>Pdgfra</i>	Reverse: 5'- CCACTTCAATCCACCCAGA -3' Forward: 5'- CTGTTGGAGCTTGAGGGAGAG -3'
<i>Dlk1</i>	Reverse: 5'- CCCATAGCTCCTGAGACCTTCT -3' Forward: 5'- GCGTGATCAATGGTTCTCCCT -3'
<i>Icam1</i>	Reverse: 5'- ACTGGCGCAGTTGCTCAC -3' Forward: 5'- GTGATGCTCAGGTATCCATCCA -3'
<i>Dpp4</i>	Reverse: 5'- CACAGTTCTCAAAGCACAGCG -3' Forward: 5'- ACCTTGACCATTACAGGAACTCA -3'
<i>Cd24</i>	Reverse: 5'- CTAGCGATCCCGTGGTCTTC -3' Forward: 5'- ACTCAGGCCAGGAAACGTCTCT -3'
<i>Artn</i>	Reverse: 5'- AACAGCCAATTTCGAGGTGGAC -3' Forward: 5'- CCCTAGCTGTTCTAGCCCTG -3'
<i>Gapdh</i>	Reverse: 5'- AGGGTTCTTTCGCTGCACAA -3' Forward: 5'- TGAAGCAGGCATCTGAGGG -3'
	Reverse: 5'- CGAAGGTGGAAGAGTGGGA -3'

Tabla M7. Secuencias de los primers utilizados para RT-qPCR.

La normalización de los datos obtenidos fue realizada por medición de la cantidad de ARNm de *Gapdh* o *Actina* utilizando la misma técnica de RT-qPCR.

Análisis de RNAseq

En colaboración con el Dr. Martín García Solá (IFIBYNE-CONICET, UBA), se llevó a cabo el análisis del RNA-seq realizado previamente en nuestro grupo en glándulas control (MTB/-Dox, n=4) o con sobreexpresión de RET (Ret/MTB Dox, n=4) (Gattelli et al. 2018).

El RNA total fue obtenido utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen). Tras el control de calidad, se prepararon bibliotecas de secuenciación a partir de 200 ng de RNA total empleando el kit TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina). Las bibliotecas fueron agrupadas y secuenciadas en un sistema Illumina HiSeq2500. Para el anotado de bases, se utilizó HCS 2.2.58 con parámetros predeterminados, y para la de-multiplexación y generación de archivos fastq, se empleó bcl2fastq 1.8.4 (Illumina). Las lecturas crudas fueron preprocesadas utilizando el paquete QuasR (v1.12.0) de R (v3.3.0)/Bioconductor. Se eliminaron las lecturas con más de dos nucleótidos no identificados. Las lecturas restantes fueron alineadas contra el genoma de referencia *Mus musculus* (mm10) utilizando la función qAlign con la opción splicedAlignments=TRUE y parámetros por defecto. Posteriormente, se empleó la función qCount de QuasR para generar una tabla con los conteos brutos de lecturas por gen para todos los genes de Entrez en cada muestra.

El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando el paquete DESeq2 de Bioconductor. Los conteos brutos de cada gen se normalizaron mediante la transformación de tamaño de biblioteca (*size factor normalization*) para corregir diferencias en la profundidad de secuenciación entre muestras. Se aplicó el modelo lineal generalizado de DESeq2 para detectar genes diferencialmente expresados (DEGs), empleando una distribución binomial negativa para modelar la variabilidad de los datos. Los valores de significancia estadística fueron ajustados mediante el método de Benjamini-Hochberg para controlar la tasa de descubrimiento falso (FDR), considerando como significativamente expresados aquellos genes con $p < 0,01$ y $\log_2\text{FoldChange} \geq \pm 1$.

Finalmente, los resultados fueron visualizados mediante un gráfico de Volcano plot generado con las librerías ggplot2 en R. Los datos se encuentran depositados en el NCBI bajo el identificador GSE83897.

Análisis de bases de datos de pacientes

En colaboración con la Dra. Angela Lara (IFIBYNE-CONICET, UBA), se realizó un análisis sobre una cohorte de pacientes de acceso público de la base de datos del repositorio TCGA TARGET GTEx (<https://xenabrowser.net/datapages/?cohort=TCGA%20TARGET%20GTEx>). El análisis incluyó estudios de RNAseq realizados en 1391 pacientes, comparando el perfil de expresión de tumores de cáncer de mama y tejidos mamarios adyacentes al tumor. El conjunto de datos clínicos contenía información sobre el tipo de muestra y el sitio primario (descargado el 09/07/2023). Las muestras con datos indeterminados fueron excluidas de sus respectivos análisis. Con este conjunto de datos, se estudió el nivel de expresión de *RET* en los distintos subtipos de cáncer de mama y se realizaron análisis de correlación de la expresión de *RET* con distintos marcadores de interés.

Análisis estadístico

Los gráficos se realizaron con GraphPad, Excel (para las curvas de crecimiento) o bien con R (especialmente para el análisis del RNAseq). En el caso de los gráficos de barras, los puntos correspondientes a cada n. El análisis estadístico de los resultados se utilizó GraphPad. Los resultados se expresan como la media \pm desvío estándar de la media (sd). Se consideraron significativas las diferencias de $P < 0,05$. La identificación de valores atípicos en los datos fue realizada mediante el test ROUT (*Robust Regression and Outlier Removal*), aplicando un umbral de FDR del 1% para detectar y excluir *outliers* de manera estadísticamente rigurosa. La distribución gaussiana (normal) se determinó utilizando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, analizando los Q-Q *plots* y la distribución de la población. Para los datos que siguieron una distribución normal, se examinaron las diferencias entre los grupos para determinar la significancia estadística mediante la prueba t de *Student* (para dos grupos) y *One Way ANOVA* seguida del test de Tukey (para tres o más grupos). Para los datos que no pasaron la prueba de normalidad, se analizaron mediante la prueba Mann-Whitney (para dos grupos) o la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (para tres grupos). Las correlaciones se evaluaron mediante test de Spearman. Las curvas de crecimiento tumoral se evaluaron estadísticamente comparando solamente el último punto de la curva, mediante t de *Student* o *One Way ANOVA*, según corresponda. Las curvas de respiración de OCR y ECAR se evaluaron estadísticamente en cada punto temporal de la curva, mediante t de *Student* o *One Way ANOVA*, según corresponda.

PARTE I

La expresión aberrante del receptor RET durante el desarrollo de la glándula mamaria afecta la transición normal de lactancia a involución promoviendo la tumorigénesis

Introducción – Parte I

La glándula mamaria

La glándula mamaria es un órgano exocrino, cuya función principal es la producción y secreción de leche para la alimentación de las crías. Esta glándula está compuesta por células epiteliales mamarias que forman una estructura básica que incluye lóbulos, lobulillos y conductos. Los lóbulos son subdivisiones de la glándula y están formados por varios lobulillos, cada uno de los cuales contiene alvéolos, las unidades secretoras donde se produce la leche. Desde los alvéolos se expulsa la leche hacia los conductos, y estos conductos convergen en el pezón. Todas estas estructuras se encuentran inmersas en abundante tejido adiposo. El tejido adiposo está conformado principalmente por adipocitos, las células especializadas en el almacenamiento de lípidos y el mayor componente celular del microambiente mamario (Hovey and Aimo 2010).

En respuesta a estímulos hormonales, la glándula mamaria sufre modificaciones significativas durante cada etapa del desarrollo. Debido a que la diferenciación terminal de la glándula mamaria se alcanza recién en la lactancia, que tiene lugar luego del nacimiento (posnatal), este órgano es de particular interés en el estudio de la biología del desarrollo. El estudio de la fisiología normal de la glándula mamaria aporta a la comprensión de situaciones patológicas como el cáncer de mama, ya que sus células son susceptibles a modificaciones que conducen eventualmente al desarrollo de tumores malignos.

Desarrollo postnatal de la glándula mamaria en el ratón

Durante la vida de las hembras de los mamíferos, el epitelio de la glándula mamaria prolifera en pubertad y luego atraviesa ciclos de proliferación, diferenciación y muerte celular, los cuales corresponden a los estadios fisiológicos de preñez, lactancia e involución, respectivamente (Hennighausen and Robinson 1998) (**Figura I6**). Cada una de estas etapas se repite cíclicamente con cada preñez (Reggiani et al. 2017; Richert et al. 2000). Si bien existen diferencias entre la glándula mamaria humana y la del ratón, el modelo murino es ampliamente aceptado como modelo de estudio tanto en la investigación en la biología normal como tumoral (McNally and Stein 2017).

El desarrollo postnatal de la glándula mamaria difiere entre el ratón y el humano en cuanto a los tiempos en los que ocurren las distintas etapas. En ratones, la fase de desarrollo más activa ocurre principalmente durante la pubertad, que tiene lugar entre las 4 y 6 semanas de vida. En este período, los conductos mamarios crecen rápidamente en el tejido adiposo para formar una red ductal ramificada. En cambio, en los humanos, el desarrollo mamario comienza alrededor de los 8-13 años, con un proceso mucho más lento que se extiende a lo largo de varios años hasta la adultez temprana, siguiendo una secuencia más gradual y compleja. La diferenciación terminal que ocurre durante el embarazo y la lactancia es similar en ambos, pero el ciclo reproductivo y el tiempo de gestación difieren considerablemente, siendo más breve en ratones (alrededor de 3 semanas) y más prolongado en humanos (aproximadamente 9 meses), lo que influye en la velocidad y duración de cada una de las etapas de desarrollo glandular (McNally and Stein 2017).

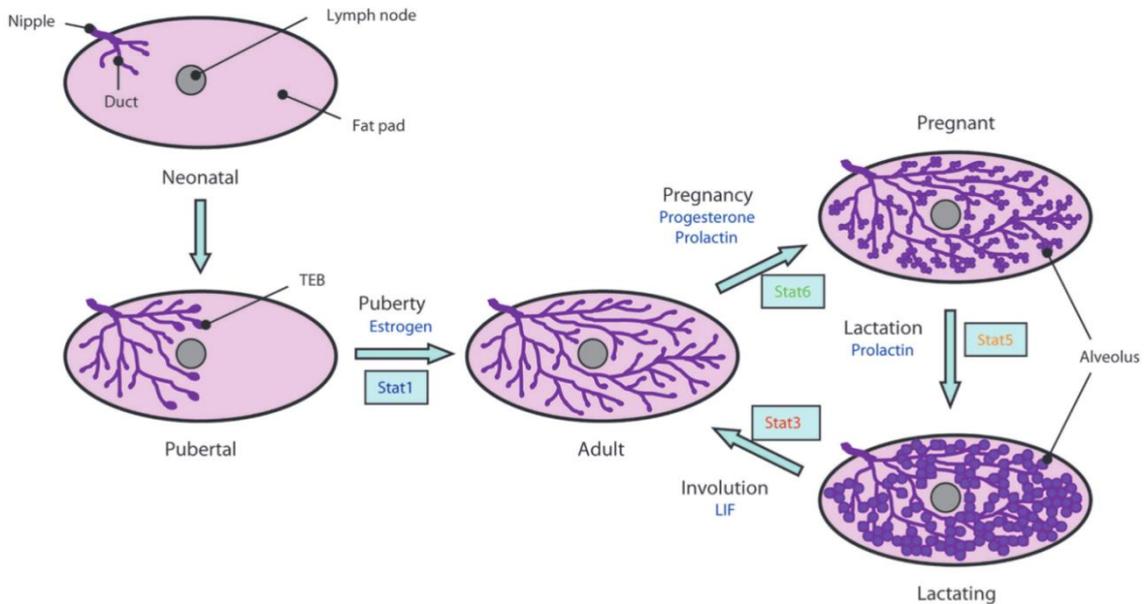


Figura I6. Desarrollo de la glándula mamaria del ratón. Esquema que ilustra cada una de las etapas del desarrollo de la glándula mamaria del ratón luego del nacimiento: pubertad, adultez (virgen), preñez, lactancia e involución, siendo esta última similar al estadio virgen. Se indican los brotes terminales de los conductos (TEB), estructuras que se forman como consecuencia del desarrollo temprano. También se indican las estructuras más importantes de la glándula mamaria: el epitelio alveolar, que son las estructuras secretoras de la glándula, y los ductos, que conforman los canales a través de los cuales la secreción mamaria es recolectada y confluyen en el pezón. Ambas estructuras están formadas por una capa de células luminales, que miran a la luz de los alvéolos y los ductos y tienen función secretoria, y una capa de células basales, que forman una capa externa a las células luminales y tienen función contráctil. Cada una de las etapas del desarrollo posnatal de la glándula se encuentra finamente regulada por hormonas (Estrógeno, Progesterona y Prolactina) y citoquinas (LIF) y por la acción de distintos factores de transcripción STATs en forma específica. Modificada de (Hughes and Watson 2012).

Durante la preñez, las células epiteliales proliferan, los conductos se extienden, se ramifican y se establecen las estructuras lóbulo-alveolares (**Figura I6**). Aquí también ocurre la diferenciación de los alveolos. Éstos poseen dos capas de células: las luminales (secretoras), y las basales (mioepiteliales), que forman los elementos contráctiles de los alveolos para la expulsión de la leche. Niveles elevados de las hormonas estrógeno y progesterona participan en este proceso (Silberstein and Daniel 1987). Al término de la preñez, que en el ratón dura aproximadamente 20 días, las estructuras alveolares han finalizado su crecimiento, reemplazando por completo el tejido estromal (principalmente el tejido adiposo) de la glándula mamaria. Estas estructuras persisten hasta el final de la lactancia y son las unidades funcionales para la producción y secreción de la leche (**Figura I6**).

Luego del parto, se produce una caída abrupta de los niveles circulantes de estrógeno y progesterona sistémicos y, a partir de ese momento, la arquitectura funcional de la glándula se mantiene principalmente gracias a la prolactina, una hormona liberada desde la glándula pituitaria en respuesta al estímulo de succión por parte de las crías (Reichardt et al. 2001; Topper and Freeman 1980). El período de lactancia es el estadio de máxima diferenciación de la glándula mamaria y, en el ratón, tiene una duración de 21 días. Luego, como consecuencia de la falta prolongada de succión debido a que las crías ya ingieren

alimento (Reggiani et al. 2017), se induce el siguiente período conocido como la involución mamaria (**Figura 16**).

La involución mamaria es un proceso coordinado de muerte celular y remodelación de la glándula, que dura aproximadamente 5 días en el ratón. Durante el mismo, el 90% del epitelio muere y el tejido adiposo recupera nuevamente casi la totalidad del área de la glándula, retornando a la glándula mamaria a su estado quiescente. En la involución se observa el colapso de las estructuras secretoras (Watson and Khaled 2020), el aumento significativo del componente inflamatorio (Stein et al. 2004) y la recuperación paulatina del espacio por parte del componente adiposo de la glándula (Colleluori et al. 2021). Cada una de estas etapas puede distinguirse histológicamente mediante la observación de la morfología en cortes de tejido teñidos con H&E (**Figura 17**).

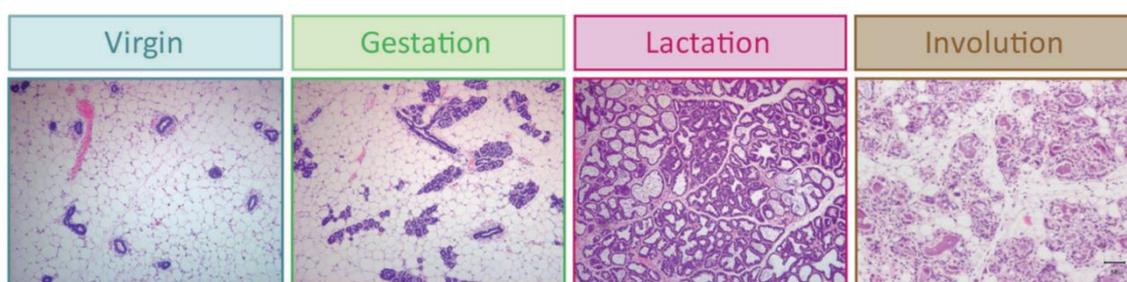


Figura 17. Histología de la glándula mamaria del ratón en distintas etapas del desarrollo. Se muestran imágenes de secciones de tejido de glándula mamaria de ratón teñidas con H&E de los distintos estadios del desarrollo de la glándula mamaria postnatal. La glándula adulta virgen se constituye principalmente por tejido adiposo (*fat pad*) donde se pueden encontrar algunas estructuras ductales y alveolares. Durante la preñez estas estructuras proliferan significativamente para en la lactancia alcanzar el máximo nivel de diferenciación del epitelio secretor mamario. En este estadio se puede observar que el tejido adiposo de la glándula se reduce casi por completo. Modificada de (Hughes and Watson 2012).

La involución mamaria puede dividirse en dos fases. La primera está caracterizada inicialmente por la muerte celular de las células epiteliales diferenciadas mediada por catepsinas a través de la vía lisosomal (Kreuzaler et al. 2011; Girnius, Edwards, and Davis 2018) y luego por la actividad de las caspasas, como la caspasa 3 clivada (CC3) que llevan a cabo los procesos apoptóticos (P. Li et al. 1997; Lund et al. 1996). En el ratón, esta fase es considerada reversible y transcurre en las primeras 48 horas luego del destete. Esta etapa es seguida de una segunda fase, irreversible, en la que a la muerte del epitelio por apoptosis se suma la expresión temporal de proteasas extracelulares que participan en la remodelación tisular (Lund et al. 1996). Transcurridas las 120 horas (5 días) se considera finalizado el proceso de involución.

La familia de factores de transcripción STAT como reguladores específicos del desarrollo de la glándula mamaria

Cada una de las etapas del desarrollo de la glándula mamaria está estrictamente regulada por la familia de proteínas STAT, proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción. Luego de su activación por fosforilación (p) los STATs pueden migrar al

núcleo de la célula para ejercer su función como factores de transcripción activando la expresión de sus genes blanco (Hughes and Watson 2012).

La señalización por prolactina es esencial para la proliferación y la diferenciación de las estructuras lóbulo-alveolares de la glándula mamaria durante la preñez (Topper and Freeman 1980). Esta hormona opera a través de la vía de transducción de señales mediada por STAT5 (Liu et al. 1997). La activación de STAT5 induce la transcripción de genes que codifican para las proteínas mayoritarias de la leche como β -caseína (S. Li and Rosen 1995; Happ and Groner 1993). En la glándula mamaria de hembras vírgenes y durante la etapa temprana de la preñez, los niveles de activación de STAT5 se encuentran muy bajos. Existe un máximo de activación de dichos factores durante la lactancia, observándose altos niveles de las formas fosforiladas, visualizada en general por su fosforilación en tirosina 694 o bien en serina 779 (pY694Stat5 o pS779Stat5), las cuales vuelven a resultar prácticamente indetectables al comenzar la involución mamaria (Liu et al. 1997).

El inicio de la involución mamaria se caracteriza por una disminución en los niveles tanto de STAT5 fosforilado como de su forma sin fosforilar, y un marcado aumento de la forma activa o fosforilada de otra proteína de la familia de los STATs, STAT3, visualizada por fosforilación en tirosina 705 (pY705Stat3) (P. Li et al. 1997; Liu et al. 1997). En particular, se ha demostrado que STAT3 cumple un rol fundamental en la inducción de la muerte celular desencadenada durante dicha etapa. Los genes blanco de la señalización desencadenada por la activación de STAT3 incluyen vías de muerte celular mediada por lisosomas a través de catepsinas (Kreuzaler et al. 2011) y vías apoptóticas mediadas por miembros de la familia BCL2 y CC3 (Chapman et al. 1999). Paradójicamente, así como la activación de STAT3 durante la involución de la glándula mamaria induce la muerte de las células epiteliales (Chapman et al. 1999), este factor de transcripción es considerado un oncogén (Resemann, Watson, and Lloyd-Lewis 2014) debido a que su activación constitutiva promueve la proliferación y supervivencia de ciertos tipos de tumores de mama (Levy and Inghirami 2006). De hecho, la actividad de STAT3 se encuentra elevada de manera aberrante en múltiples tipos tumorales y ello se corresponde con un mal pronóstico de la enfermedad (Yu and Jove 2004).

La activación de STAT3 promueve además la expresión de citoquinas, siendo responsable de la generación de un ambiente pro-inflamatorio tanto en el tumor como durante la etapa de involución mamaria (Pensa, Watson, and Poli 2009). A su vez, STAT3 es activado en respuesta a distintos factores solubles, incluidos algunos factores de crecimiento, interferones (Schindler, Levy, and Decker 2007) y un gran número de citoquinas claves en el desarrollo como el factor inhibidor de la leucemia (LIF) o IL6 (Schere-Levy et al. 2003; Kritikou 2003). Es interesante el hecho de que la producción de estas citoquinas vinculadas con la activación de Stat3 se induce durante las primeras horas luego del destete como consecuencia de la acumulación local de leche. Esto último se ha demostrado mediante experimentos del bloqueo artificial o *sealing* del acceso a la succión de leche por parte de las crías en hembras lactantes (Schere-Levy et al. 2003).

Modificaciones del estroma adiposo durante el desarrollo de la glándula mamaria

Los adipocitos de la glándula mamaria se consideran de tipo blanco y conforman el tejido adiposo blanco o *White Adipose Tissue* (WAT), se caracterizan por ser células de gran tamaño que contienen una sola gota lipídica (uniloculares) y su principal función es el almacenamiento de energía. Anatómicamente, el tejido adiposo mamario es de localización subcutánea y constituye lo que se denomina la almohadilla de grasa o *fat pad*. Los adipocitos maduros expresan la proteína Perilipina 1 (Plin1), la cual se encuentra presente en la membrana de las vacuolas lipídicas, siendo esta un marcador específico de tejido adiposo (Greenberg et al. 1993). Interesantemente, durante procesos normales del desarrollo de la glándula mamaria, que implican remodelación del tejido adiposo, como la pubertad o bien la involución, se ha observado presencia de regiones de tejido adiposo con características modificadas (Colleluori et al. 2021; Gouon-Evans and Pollard 2002).

En los últimos años, se han estudiado con mayor profundidad los mecanismos por los cuales los adipocitos repueblan la glándula mamaria una vez finalizada la lactancia (período post-lactancia) para, luego de transcurrida la involución mamaria (período post-involución, Post-I), volver al estadio morfológica y fisiológicamente similar al de hembras vírgenes. Estudios de rastreo de linaje (*lineage tracing*) proponen que las modificaciones en el cambio de tamaño en los adipocitos están dadas por procesos que promueven la delipidación de los mismos, en el cual los adipocitos transfieren lípidos a las células epiteliales durante la lactancia y, en consecuencia, disminuyen su tamaño, y luego lo recuperan por hipertrofia durante la involución (Zwick et al. 2018). Sin embargo, también se ha reportado que durante la preñez ocurre un proceso de trans-diferenciación reversible de los adipocitos a células epiteliales mamarias, formando parte del *pool* de células secretoras de leche durante la lactancia (Morrone et al. 2004). En línea con estos trabajos y evidenciando la plasticidad celular de las células adiposas, otros reportes han demostrado que los adipocitos maduros atraviesan un proceso de de-diferenciación a adipocitos inmaduros, de características similares a sus precursores, los pre-adipocitos (PA), durante la lactancia, y que éstas mismas células se re-diferencian nuevamente a adipocitos maduros durante la involución (Corsa and Macdougald 2018; Q. A. Wang et al. 2018). Los PA son de apariencia fibroblástica, son negativos para Plin1, y expresan marcadores específicos, como DLK1 (*Delta-like 1 homolog*) y PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*), que se describirán más adelante.

Resultados – Parte I

Análisis de la expresión de RET durante el desarrollo de la glándula mamaria

Muchos de los efectores de la vía de RET, como STAT3 (Lyons et al. 2011; Reggiani et al. 2017), y las consecuencias fisiológicas de su activación tienen roles esenciales durante el desarrollo de la glándula mamaria (Watson 2006). De este modo, investigar la función de las proteínas oncogénicas, como RET, en la glándula mamaria normal ayudaría a comprender en profundidad su rol en cáncer de mama (N. E. Hynes and Watson 2010). Debido a que muchos de los receptores tirosina quinasa oncogénicos descritos en tumores de mama, como HER2 (Nancy E Hynes and Lane 2005), cumplen una función durante el desarrollo normal, especulamos que el receptor RET podría poseer también un rol específico no estudiado aún.

Para comenzar con la investigación, se obtuvieron glándulas mamarias de ratones hembra de cepa FVB/N salvaje o *Wild-Type* (WT) en diferentes etapas de desarrollo. El correspondiente tejido glandular fue recolectado y almacenado para posterior análisis. Primero, las muestras de tejido mamario se analizaron mediante IHC y/o WB utilizando un anticuerpo específico contra RET (**Figura R1**). Los ensayos de IHC revelaron que RET está presente en el epitelio mamario lactante de 10 días (L10), momento en el cual la lactancia se encuentra establecida. Por el contrario, no se evidenció la presencia de RET en el epitelio de las glándulas luego de 48 horas del inicio de la involución forzada inducida por el retiro de las crías (I48) (**Figura R1A**). Estos hallazgos son consistentes con los datos publicados de RNA-seq que indican que el gen *Ret* se expresa en muestras de glándulas mamarias de ratones hembra lactantes (Bambhroliya et al. 2018; Clarkson et al. 2004; Grinman et al. 2019; Stein et al. 2004). El análisis a nivel de proteína mediante WB de los lisados de tejido mamario reveló que las glándulas de hembras lactantes exhiben altos niveles de RET en su estado activo, es decir fosforilado, visualizado como su forma fosforilada en la tirosina 1062 (pY1062RET). Estos niveles disminuyen abruptamente en el tejido glandular de hembras post-lactantes que han atravesado el proceso de involución (**Figura R1B**).

El período post-lactancia representa una ventana temporal del desarrollo mamario que ha sido demostrado que contribuye al riesgo de cáncer de mama (Fornetti et al. 2014). Para examinar esta fase más en detalle, realizamos un análisis cinético de la expresión de la proteína RET centrándonos en la lactancia y la involución (**Figura R1C**). Si bien los niveles de RET fueron variables en tejido glandular de hembras que se mantuvieron vírgenes (V) y durante la preñez (P), encontramos que la expresión de RET permanece alta y estable desde el día 5 hasta el día 15 de lactancia (L5, L10 y L15). A las 12 horas de involución (I12), los niveles de expresión de RET disminuyen y permanecen significativamente más bajos a 48 y 72 horas (I48 e I72, respectivamente) después del destete (**Figura R1C**). De esta manera, estos resultados indican que la expresión de RET en la glándula mamaria se establece durante la preñez, permanece alta durante la lactancia y disminuye abruptamente en involución, lo que sugiere un estricto control de su expresión en este período de transición.

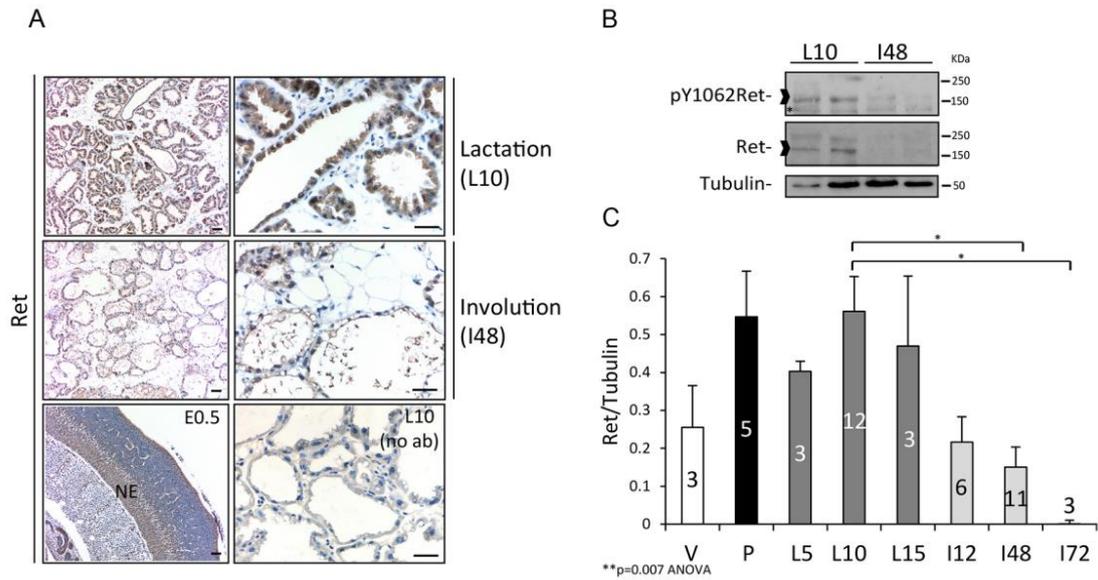


Figura R1. Expresión de RET durante las distintas etapas del desarrollo mamario de ratón: RET se expresa en altos niveles en lactancia y disminuye en involución. (A) Se muestran imágenes representativas de inmunomarcaciones utilizando un anticuerpo específico de RET en secciones de tejido mamario de hembras FVB/N en día 10 de lactancia (L10) o 48h de involución inducida por el destete forzado (I48). Se utilizó una sección de un embrión de ratón de día embrionario 0,5 (E0.5) como control positivo para la expresión de RET en el neuroepitelio (NE). Se utilizó como control negativo una glándula lactante de 10 días (L10) sin anticuerpo primario (no ab). Barras de escala: 50 μ m. (B) Análisis de WB de RET total y su forma fosforilada en tirosina 1062 (pY1062RET). Se analizaron lisados de tejido mamario de hembras adultas FVB/N en las etapas de desarrollo indicadas. Se utilizó tubulina como control de carga. Las flechas indican la banda específica de RET utilizada para la cuantificación. (C) Los niveles de proteína de RET en las distintas etapas de desarrollo indicadas normalizada a tubulina se determinaron mediante cuantificación de las bandas visualizadas en WB utilizando ImageJ. Los resultados se muestran como la media \pm sem. Los p valores se calcularon mediante ANOVA unidireccional (**P=0,007) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (*P<0,05). El número de animales utilizados para cada etapa de desarrollo se indica sobre las barras (n=3-12). V, virgen: hembra virgen adulta de 2 meses; P, embarazo: el día 15 o 18 después de la concepción; L, lactancia: L5 a L15, lactancia en el día 5, día 10 o día 15 del primer período de lactancia; I, involución: I12 a I72, período de involución 12, 48 o 72 h después de la retirada de las crías.

Adicionalmente, encontramos que el tejido mamario expresa al menos dos de los ligandos más abundantes de RET (*Gdnf* y *Nrtn*) y dos co-receptores (*Gfra1* y *Gfra2*) (Figura R2), lo que indica que la red de señalización de RET es funcional y se encuentra activa.

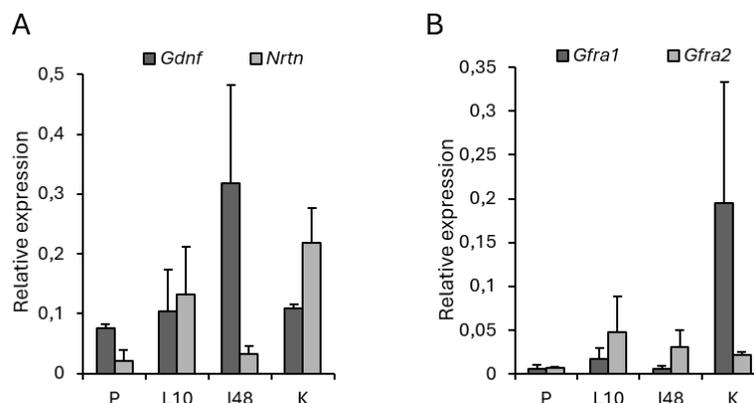


Figura R2. Los ligandos y co-receptores de RET se expresan en la glándula mamaria murina. Se realizaron mediciones de RT-qPCR para los genes indicados de ligandos (A) y co-receptores (B) de RET a partir de muestras de RNA de tejido mamario de hembras en lactancia día 10 (L10, n=3) e involución 48 horas (I48, n=3). Muestras de riñón se utilizaron como control positivo de la expresión de componentes de la vía de RET (K). Se muestran los niveles de expresión relativizados a actina. Se realizó ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples DGC.

Es interesante destacar que en 2022 se publicó el primer estudio de RNA-seq de célula única (*scRNA-seq*) realizado en biopsias humanas conteniendo muestras provenientes de mastectomías de tejido mamario (NMC) y de leche materna (LMC) (Twigger et al. 2022). Los resultados de este trabajo se encuentran disponibles junto con una herramienta de análisis bioinformático desarrollada por los autores. Para completar nuestro análisis, utilizando esta herramienta, encontramos que *RET* se expresa en las células presentes en la leche materna, confirmando que RET puede expresarse durante la lactancia en humanos. Según el análisis de componentes principales (UMAP) obtenido, *RET* se expresa principalmente en la población de células epiteliales presentes durante la lactancia, las LMC, y en menores niveles en la población de células presentes en la glándula en estado de reposo (NMC) (**Figura R3**), estado que sería equivalente a la glándula virgen del ratón. Estos resultados confirman que la expresión de RET es elevada durante la lactancia en ambos sistemas, ratón y humano.

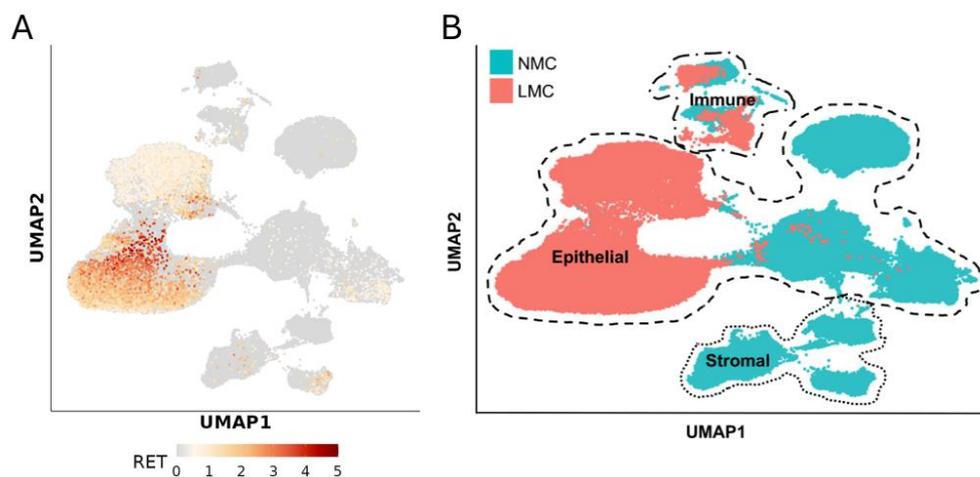


Figura R3. El gen de RET se expresa en altos niveles en células epiteliales mamarias de mujeres lactantes. Gráficos UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) de la expresión de RET generado a partir de datos de *scRNA-seq* publicados (Twigger et al. 2022) obtenidos a partir del análisis de células mamarias humanas provenientes de mamoplastia (NMC, 54.714 células, n=7) y células presentes en la leche (LMC, 56.030 células, n=9). (A) Las regiones grises corresponden a distintas poblaciones de células y los puntos de color beige-rojo indican células a las cuales se les detectó la expresión del mensajero de RET. Rojo indica mayores niveles de expresión, beige menores niveles de expresión. (B) A su vez, las poblaciones de células están agrupadas en epiteliales, estromales e inmunes.

Luego, decidimos explorar más en profundidad la regulación de RET en la post-lactancia. Para ello, realizamos experimentos *in vivo* de inducción local de involución mamaria (Schere-Levy et al. 2003). Ratones hembra FVB/N WT lactantes de 10 días, fueron sometidas al sellado unilateral del pezón de una de las glándulas mamarias inguinales

para impedir, de este modo, el estímulo de succión de las crías e inducir la involución local de la glándula sellada (M. Li et al. 1997; Schere-Levy et al. 2003). En estos experimentos, las otras glándulas mamarias permanecen intactas, permitiendo la lactancia normal por parte de las crías. Con esta técnica, las hormonas lactogénicas permanecen en sus niveles sistémicos normales, mientras que en la glándula sellada se activan factores locales asociados a la involución. Luego del sellado, los ratones continuaron amamantando a sus crías durante 48 horas adicionales (L12) y posteriormente, se escindió tanto la glándula sellada (*Sealed*) como una de las glándulas control que permanecieron intactas (*Intact*), de cada animal. Nuestros resultados muestran claramente que el bloqueo del pezón, con el consecuente detenimiento de la succión, conduce a una disminución de los niveles de RET en la glándula (**Figura R4**).

Examinamos la activación de los factores de transcripción STATs, como lectura del seguimiento del desarrollo mamario normal. Las glándulas intactas muestran niveles altos de pY694Stat5 y ausentes de pY705Stat3, indicando una lactancia activa. Como control, se utilizó el lisado de una glándula mamaria en involución (I48), la cual presenta niveles altos de pY705Stat3 y ausencia de pY694Stat5. Se ha reportado que la estasis de la leche causa la activación de STAT3 (M. Li et al. 1997; Schere-Levy et al. 2003), como observamos en las glándulas selladas (**Figura R4**). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran una correlación negativa entre la expresión de RET y la transición a la involución. A nivel del mecanismo, pudimos concluir que la reducción inicial de RET al inicio de la involución no se debe a disminuciones sistémicas en las hormonas lactogénicas circulantes, como prolactina e hidrocortisona (Nguyen and Pollard 2000), sino que responde a señales locales inducidas por el cese de la lactancia.

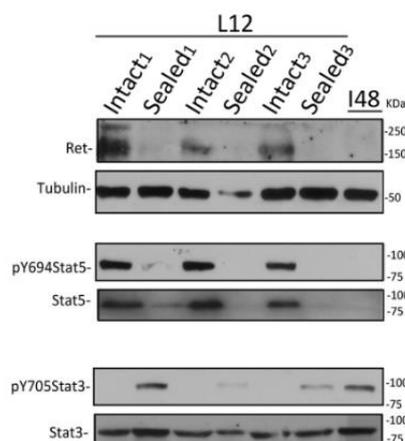


Figura R4. La regulación de los niveles de RET en post-lactancia responde a factores locales. Se muestran los niveles de expresión de RET determinados por WB usando lisados de glándulas mamarias #4 de tres hembras lactantes independientes (denominadas del 1 al 3) en las cuales, a los 10 días de lactancia, las glándulas derechas se dejaron intactas (*Intact*, n=3) o bien el flujo de leche de las glándulas contralaterales fue bloqueado por sellado del pezón (*Sealed*, n=3)(N=1). Las hembras continuaron amamantando a sus crías durante 48 horas más (L12). Como control, se analizaron los niveles de expresión de RET en lisados de una glándula en involución de 48 horas inducida por el destete forzado (I48). Se muestra el análisis de WB para la activación de Stat3 y Stat5 utilizando los anticuerpos indicados. La detección de tubulina se utilizó como control de carga.

Análisis de las alteraciones producidas por la sobre-expresión de RET en el epitelio mamario durante la lactancia

En mujeres jóvenes (<25 años) se ha reportado que la lactancia tiene un efecto protector respecto del cáncer de mama (Borges et al. 2020; Schedin 2006). Para investigar las consecuencias de activar la expresión de RET durante este período de protección, utilizamos el modelo transgénico Ret/MTB establecido en el laboratorio, mediante el cual previamente demostramos que la sobre-expresión crónica del RET WT en el epitelio mamario induce hiperplasias y tumores mamarios (Gattelli et al. 2018). En este sistema, la expresión del transgén *Ret* es inducible por la administración doxiciclina (DOX), lo que permite su expresión condicional durante etapas discretas del desarrollo mamario. Por lo tanto, indujimos la sobre-expresión del gen de RET durante la lactancia mediante el agregado de DOX al agua de hembras lactantes Ret/MTB entre los días 2 y 10 de lactancia, día en el cual se realizaron las autopsias y se recolectó el material a analizar (**Figura R5A**). La observación morfológica en la tinción con H&E reveló la presencia de células desprendidas en los alvéolos solo de las glándulas mamarias lactantes de hembras Ret/MTB (**Figura R5B**, insertos), lo que sugiere que sufren una muerte celular prematura. Apoyando esta observación, el ensayo de IHC mostró un aumento significativo de CC3 en las glándulas de animales Ret/MTB lactantes de 10 días, respecto de las glándulas control (**Figura R5B**, columna derecha de imágenes). También detectamos un aumento significativo en los niveles de pY705Stat3 en estos tejidos, en comparación a las glándulas control (**Figura R5B**, fila inferior). La tinción de pY705Stat3 mostró un agrupamiento de células positivas para este marcador en ciertas áreas de las glándulas lactantes que sobre-expresan RET (**Figura R5B**, fila inferior), lo que sugiere que la activación de STAT3 podría ser también una consecuencia indirecta de factores locales desencadenados por RET. Por WB se confirmó la sobre-expresión de RET en las glándulas bitransgénicas Ret/MTB bajo tratamiento con DOX (**Figura R5C**), acompañada de un aumento en pY705Stat3 (y no de pY694Stat5). Estos resultados indican que la sobre-expresión aberrante de RET induce marcadores de involución prematura.

Analizamos adicionalmente la expresión de pS10H3 como marcador de proliferación y observamos que la sobre-expresión sostenida de RET durante la lactancia lleva también a un aumento en la proliferación de células epiteliales (**Figura R5D**), lo cual confirma el efecto oncogénico de RET.

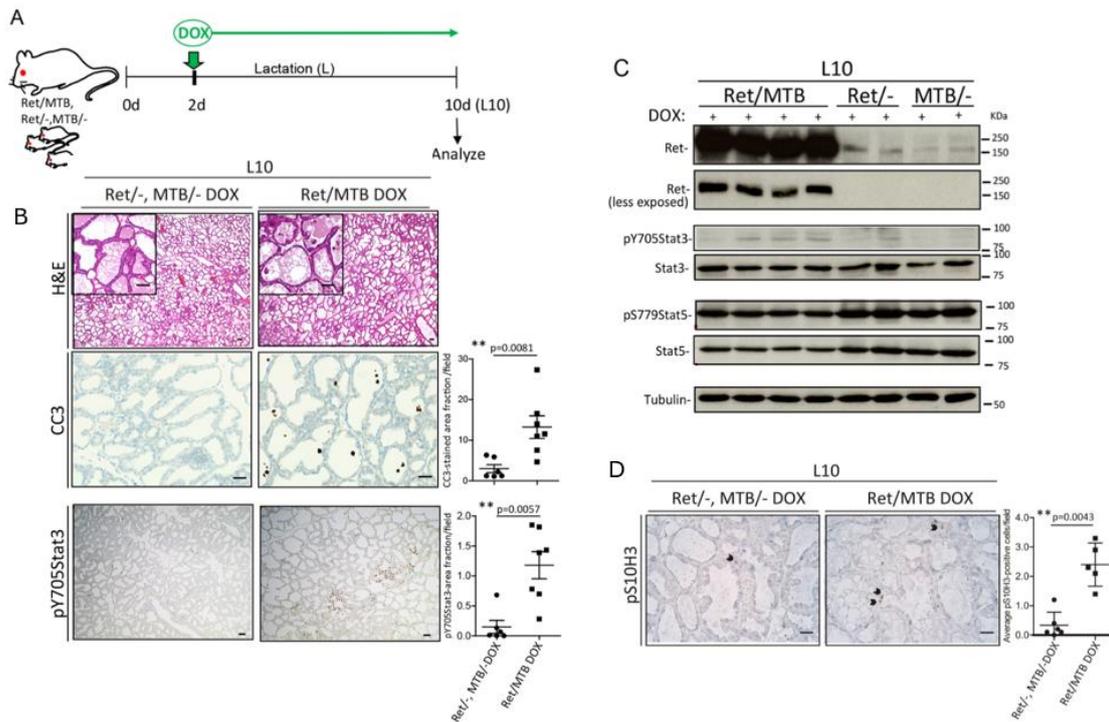


Figura R5. La sobre-expresión de RET en lactancia induce marcadores prematuros de involución y signos de proliferación (A) Descripción esquemática del diseño experimental de la inducción de RET por DOX en el modelo de ratón Ret/MTB (N=2). (B) Secciones de glándula mamaria de hembras Ret/- o MTB/- (n=6) y Ret/MTB (n=7) a los 10 días de lactancia (L10) después del tratamiento con DOX (2 g/l) durante 8 días fueron analizados por H&E e IHC para CC3, pY705Stat3 (imágenes representativas). Los datos se presentan como media \pm sem. Barras de escala: 50 μ m. Se muestran las cuantificaciones correspondientes a dos experimentos independientes de la tinción indicada. p valores mediante la prueba de Mann-Whitney. (C) WB que muestra los niveles de RET en dos tiempos de exposición diferentes y activación de pY705Stat y pY779Stat5 para lisados de tejido de glándula mamaria de los experimentos mostrados en B. Se usó tubulina como control de carga. (D) Se muestran imágenes representativas de la IHC para pS10H3. Las puntas de flecha indican las células positivas. Los datos se presentan como media \pm sem. Barras de escala: 50 μ m. Se muestran las cuantificaciones correspondientes a dos experimentos independientes de la tinción indicada. p valores mediante la prueba de Mann-Whitney.

Análisis de los efectos de la expresión de RET en el epitelio mamario durante el proceso de involución

En los siguientes experimentos, indujimos condicionalmente la expresión de RET durante la involución temprana, una etapa del desarrollo en la que los niveles endógenos de este receptor disminuyen después de la lactancia (**Figura R6A**). Después de 8 días de lactancia, se indujo la expresión de RET en hembras bitransgénicas Ret/MTB mediante la administración de DOX y, luego de 2 días se removieron las crías para forzar la involución mamaria. Se utilizaron como grupos control hembras MTB/- o Ret/- bajo el tratamiento de DOX (DOX) (**Figura R6A**, arriba) o hembras Ret/MTB a las cuales no se les administró DOX (CON) (**Figura R6A**, abajo). Después de 72 horas de involución (I72), se extrajeron y analizaron las glándulas mamarias. Por WB se confirmó el funcionamiento del sistema observando que los lisados de ratones tratados con DOX, pero no de control, mostraron altos niveles de RET (**Figura R6B**). La tinción con H&E de secciones de glándulas I72 reveló

un aumento en el área de tejido adiposo en las glándulas que expresan RET en comparación con los controles (**Figura R6C**, fila superior), lo que indica un proceso de involución más avanzado. La cuantificación de los niveles de Plin1, el marcador específico de adipocitos maduros (Hume et al. 2018), indica que aumenta significativamente en las glándulas que expresan RET (**Figura R6C**, fila inferior), mostrando un incremento en el área cubierta por tejido adiposo. Estas glándulas también se examinaron en busca de otros marcadores de involución, como CC3 y pY705Stat3 (**Figura R6D**). A pesar de las diferencias histológicas observadas, los niveles de pY705Stat3 fueron similares en las glándulas I72 de los controles y de los ratones hembra que expresaban RET. Curiosamente, la tinción para CC3 reveló una reducción significativa en la cantidad de cuerpos apoptóticos en las glándulas que expresan RET (**Figura R6D**), como se encuentra reportado en etapas de involución más avanzada. Estos resultados indican que los cambios en la remodelación del tejido inducidos por la expresión continua de RET durante las primeras fases de la transición post-lactancia alteran la cinética normal de la involución, representado por la disminución de CC3 y el aumento en el área adiposa, provocando así un fenotipo de involución acelerada.

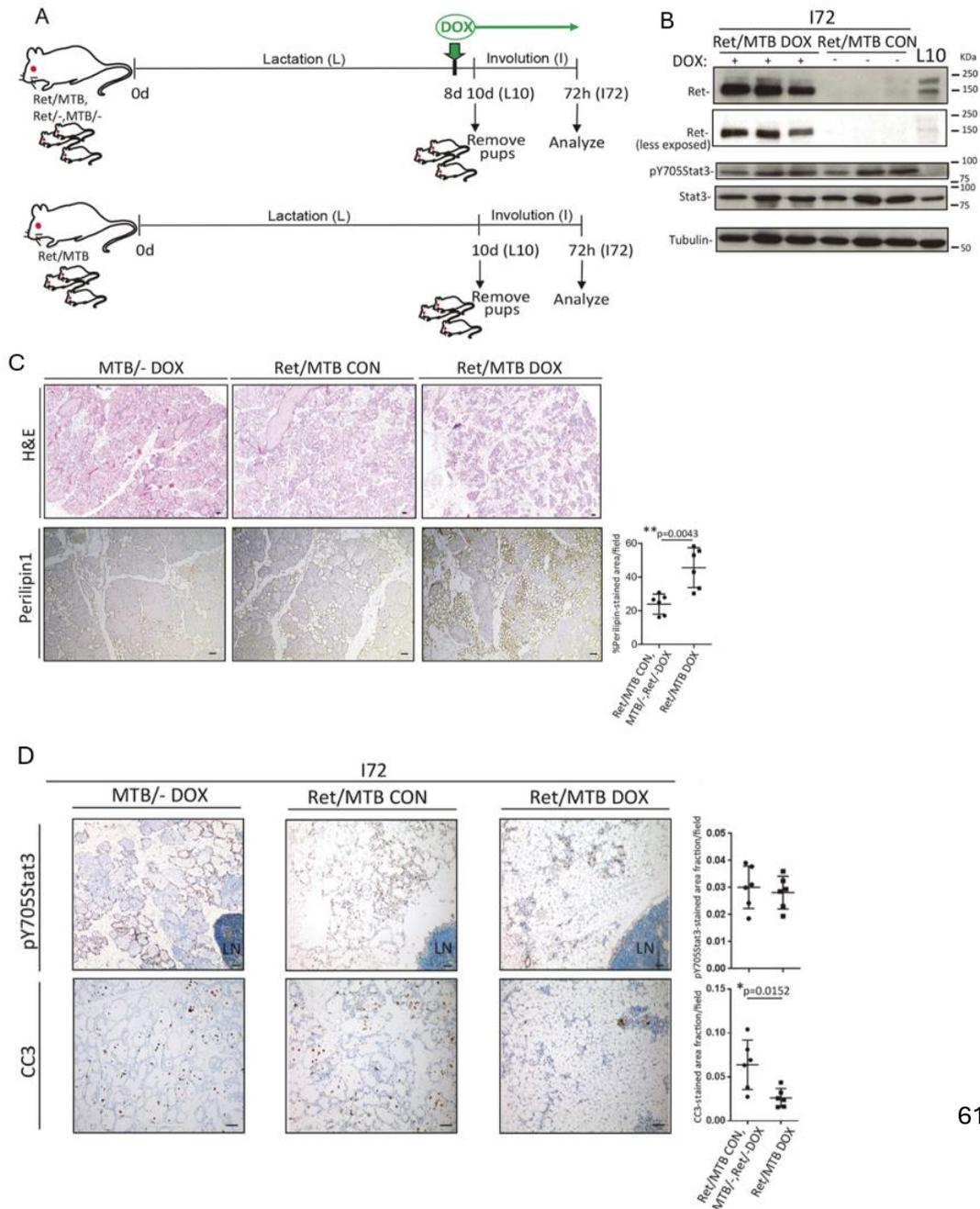
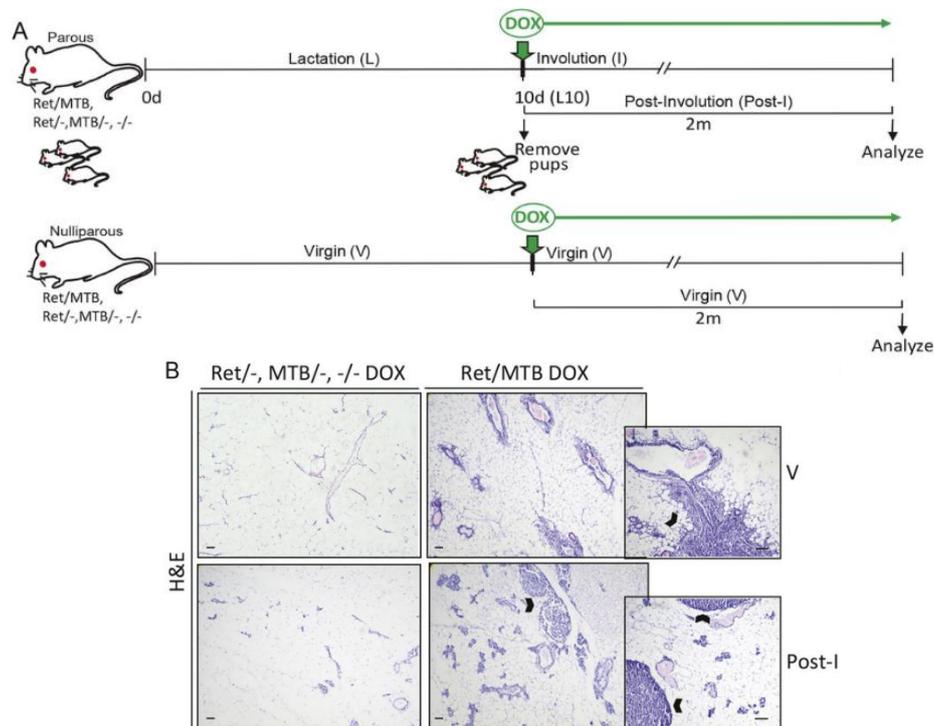


Figura R6. La expresión de RET en post-lactancia acelera la involución mamaria. (A) Descripción esquemática del diseño experimental de la inducción de RET por doxiciclina (DOX) o control en cepas Ret/MTB, Ret/-, MTB/- o ratones Ret/MTB no tratados con DOX (N=2). (B) El análisis de WB muestra los niveles de RET y pY705Stat3 utilizando lisados de tejido de glándula mamaria de 72 horas de involución obtenido de las hembras transgénicas indicadas. Se incluyó lisado de tejido mamario de una hembra lactante de 10 días (L10) para controlar los niveles normales de expresión de RET endógeno. Se utilizó tubulina como control de carga. (C) Se muestran fotos representativas de las secciones indicadas, sobre las cuales se realizó tinción H&E e IHC específica para Perilipina1. Los datos se presentan como media \pm sem. (n=6 en cada grupo). Se muestra la cuantificación correspondiente a dos experimentos independientes de la tinción indicada. p valores mediante la prueba de Mann-Whitney. (D) Se realizó IHC en las secciones indicadas para la tinción específica para pY705Stat3 o CC3. Los datos se presentan como media \pm sem. (n=6 en cada grupo), y se muestran las cuantificaciones correspondientes para dos experimentos independientes de la tinción indicada. p valores mediante la prueba de Mann-Whitney. LN: ganglio linfático inguinal. Barras de escala: 50 μ m.

La expresión sostenida de RET durante la post-lactancia promueve defectos del desarrollo y aumenta la malignidad

Para analizar cuál es el impacto a largo plazo de la expresión sostenida de RET durante la transición de la lactancia a la involución, extendimos el tiempo de inducción del sistema por DOX hasta 2 meses (**Figura R7A**) transcurrida la involución (Post-I), otorgando un tiempo suficiente para el desarrollo de hiperplasias (Gattelli et al. 2018). En secciones teñidas con H&E, las glándulas control Post-I (Ret/- o MTB/- Post-I) muestran una morfología normal con algunos alvéolos residuales (**Figura R7B**). Relevante resulta el hecho de que se observa un aumento significativo en el número de lesiones neoplasias, definidas como neoplasias mamarias intraepiteliales (MINs, puntas de flecha), presentes en las glándulas Ret/MTB que expresan RET y que experimentan el proceso post-involutivo (Ret/MTB Post-I), en comparación con las glándulas vírgenes Ret/MTB que expresan RET y no atravesaron dicho período (Ret/MTB V) (**Figure R7C**). Estos resultados indican que la expresión sostenida de RET en hembras que atraviesan el período post-lactancia aumenta la tumorigénesis, resaltando su potencial valor pronóstico como marcador de riesgo de cáncer en este período.



C

	V		Post-I	
Number of MIN/gland	Ret ^{-/-} , MTB ^{-/-} ^a (four glands, n=4) 0.25±0.25	Ret/MTB ^b (15 glands, n=8) 2.60±1.39	Ret ^{-/-} , MTB ^{-/-} , -/- ^c (five glands, n=4) 0.20±0.20	Ret/MTB ^d (17 glands, n=9) 5.94±1.52

Data are presented for two independent experiments as the mean±s.e.m. *P*-values by Mann-Whitney test. ***P*=0.0013^{ad}, ***P*=0.0057^{bd}, ****P*=0.0003^{cd}.

Figura R7. La expresión sostenida de RET en post-lactancia aumenta las lesiones neoplásicas. (A) Representación esquemática de la inducción crónica de RET por DOX durante 2 meses en el modelo de ratón Ret/MTB (N=2). Se utilizaron hembras transgénicas adultas de los genotipos indicados que atravesaron un solo parto (arriba, *Parous*) o vírgenes, sin ningún parto (abajo, *Nulliparous*). La inducción de DOX se inició en el momento que lo indican las flechas verdes para cada grupo de hembras control (Ret^{-/-}, MTB^{-/-} o -/-) o experimentales (Ret/MTB). Los animales se mantuvieron bajo tratamiento con DOX (2 g/l) durante 2 meses (2m). Se analizaron las glándulas mamarias de los grupos control y experimental en condiciones tanto de nulíparas (V) como una vez finalizado el período de involución (Post-I). (B) Se analizó la morfología en secciones teñidas con H&E de los ratones indicados revelando un mayor número de neoplasias intraepiteliales mamarias (MINs), indicadas con puntas de flecha, en las glándulas que sobre-expresan RET después de transcurrida la involución en comparación con las glándulas vírgenes. Barras de escala: 50 μm. (C) Tabla indicando la cuantificación del número de MINs en los distintos grupos analizados. Las comparaciones de interés se evaluaron mediante Mann-Whitney test.

Mediante observaciones más detalladas de las glándulas Ret/MTB Post-I encontramos que éstas exhiben una morfología aberrante pronunciada, que consiste en un agrandamiento de los conductos mamarios con presencia de secreción, fenómeno denominado como ectasia ductal (Rahal et al. 2011), rodeados por alvéolos persistentes, así como un estroma aberrante con mayores áreas de tejido adiposo modificado (**Figura R8**), compuesto por adipocitos de menor tamaño. Simultáneamente, el tejido estromal adyacente a las lesiones muestra abundante fibrosis y fibras de colágeno revelado como áreas azules por

tinción de tricrómico de Masson (TdM) (**Figura R8**).

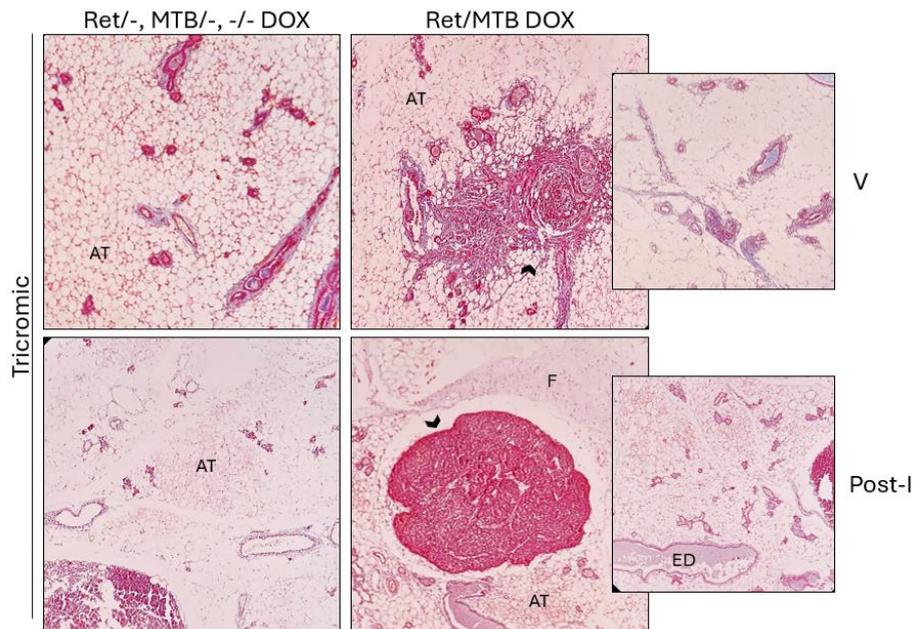


Figura R8. Las lesiones inducidas por RET en el epitelio mamario son acompañadas de aberraciones en el tejido adiposo adyacente. Se muestran fotos representativas de secciones teñidas con TdM (aumento: X100). Se utilizaron hembras transgénicas adultas en las condiciones indicadas descritas en la figura previa. Como se describió previamente, los animales se mantuvieron bajo tratamiento con DOX (2 g/l) durante 2 meses (2m). Se analizaron las glándulas mamarias de los grupos control y experimental en condiciones tanto de nulíparas (V) como una vez finalizado el período de involución (Post-I). Las neoplasias intraepitealiales mamarias (MINs) se indican con puntas de flecha. AT: tejido adiposo; ED: ectasia ductal; F: fibrosis.

Estos últimos resultados proporcionan evidencia de que la expresión aberrante de RET afecta el proceso de remodelación del tejido, promoviendo la formación de lesiones neoplásicas principalmente durante la post-lactancia, pero también afectando el estado del tejido adiposo circundante.

En su conjunto, en esta parte del trabajo de tesis (PARTE I), revelamos la expresión diferencial del receptor RET durante el desarrollo normal de la glándula mamaria. Demostramos que la expresión aberrante de RET promueve defectos en el desarrollo y la tumorigénesis particularmente en post-lactancia, postulando así su potencial como marcador pronóstico de riesgo de cáncer en este período.

PARTE II

El receptor RET en la célula tumoral regula características del tejido adiposo mamario adyacente promoviendo un estado inmaduro en las células adiposas

Introducción – Parte II

El cáncer de mama y el estroma adiposo

El papel del tejido adiposo en el microambiente tumoral ha recibido mucha atención por ser un factor crítico en la asociación entre la obesidad y el cáncer. La incidencia de cáncer correlaciona positivamente con la obesidad, una condición médica en la que se acumula un exceso de tejido adiposo que puede afectar negativamente la salud (Kim and Scherer 2021). Las estimaciones actuales indican que 650 millones de adultos padecen obesidad, lo cual incrementa su riesgo de contraer cáncer, incluido el cáncer de mama (Engin 2017). Las causas del aumento de la incidencia del cáncer de mama con la obesidad son complejas y siguen siendo estudiadas (Devericks et al. 2022).

El tejido adiposo está conformado mayormente por adipocitos, las células especializadas en el almacenamiento de lípidos (Sethi and Vidal-Puig 2007). El tejido adiposo se encuentra distribuido en diferentes órganos, por lo que los adipocitos están en estrecho contacto con las células cancerosas en muchos tumores sólidos, siendo el ejemplo más evidente el tumor de mama, debido a que el principal componente del estroma mamario es el tejido adiposo (Bernard and Wellberg 2021). Fuera del microambiente mamario, los adipocitos influyen en el estado metabólico del organismo y producen numerosos factores de señalización, los cuales pueden afectar el desarrollo y la progresión del cáncer de mama. Se destacan entre estos factores producidos por los adipocitos maduros, tanto normales como asociados al cáncer, hormonas, factores de crecimiento, metabolitos y citoquinas, denominadas adipocitoquinas (Bernard and Wellberg 2021).

Las caracterizaciones realizadas en muestras humanas de tejido adyacente de tumores mamarios muestran modificaciones morfológicas, fenotípicas y funcionales (**Figura I8**) (Zhu et al. 2022). Asimismo, en modelos animales murinos, muchos trabajos han demostrado que los adipocitos cercanos al tumor en crecimiento muestran alteraciones similares (**Figura I8**). Las imágenes histológicas de tumores exhiben una disminución tanto en el número como en el tamaño de las células de los adipocitos ubicados en el frente invasivo en comparación con los adipocitos distantes del tumor (Nieman et al. 2011; Dirat et al. 2011; Zhu et al. 2022). Similarmente a lo que sucede durante la transición de la lactancia a la involución en el desarrollo normal de la glándula mamaria, estos cambios fenotípicos se han asociado por un lado a procesos de de-diferenciación de los adipocitos (**Figura I8**) (Zhu et al. 2022; Dirat et al. 2011), y por el otro, a la inducción de la lipólisis en los adipocitos por parte de las células tumorales (Wang et al. 2017). Para estudiar dichos cambios fenotípicos se han implementado sistemas de co-cultivo *in vitro* en donde las dos poblaciones, células tumorales y células adiposas, están cultivadas juntas o separadas por una membrana o *transwell* que permite el intercambio de señales entre ambos tipos celulares mediante factores solubles. Mediante el uso de estos sistemas, se ha reportado la de-lipidación de los adipocitos y una disminución de la expresión de marcadores de madurez de los mismos (Dirat et al. 2011). Además, los adipocitos co-cultivados con células tumorales muestran modificaciones en su secretoma, por ejemplo aumentan la producción de adipocitoquinas inflamatorias como TNF α , IL1 β e IL6 (Dirat et al. 2011; Ribeiro et al. 2012).

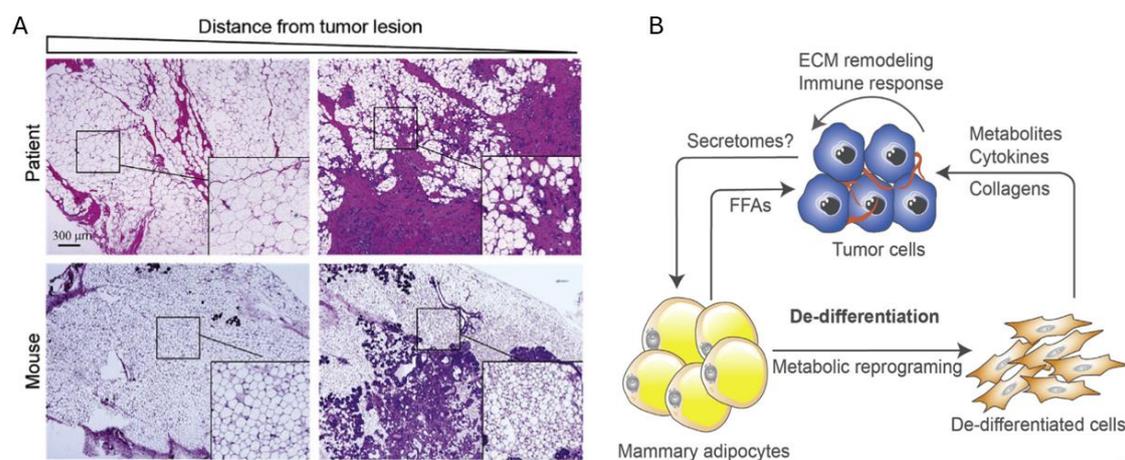


Figura 18. Características del tejido adiposo mamario adyacente a un tumor mamario, humano y murino. (A) Imágenes provenientes de cortes histológicos teñidos con H&E del tejido adyacente a un tumor mamario humano (arriba) y de un tumor mamario murino (abajo). (B) Esquema que representa el efecto de las células tumorales sobre los adipocitos circundantes. Los frentes invasivos de los tumores de mama que remodelan la matriz extracelular (ECM) están rodeados de adipocitos modificados de menor tamaño cuanto más próximos se encuentran a las células cancerosas. Además, tanto los adipocitos como las células tumorales pueden modular la respuesta inmune, facilitando la progresión del tumor. Adaptado de (Zhu et al. 2022).

En conjunto, los reportes de experimentación *in vitro* e *in vivo* indican que las células cancerosas modifican los adipocitos promoviendo que adquieran características diferentes a las de los adipocitos en estado normal y se los suele denominar adipocitos asociados al cáncer (Dirat et al. 2011). Estos adipocitos conforman entonces lo que denominaremos tejido adiposo asociado al tumor (TAAT). En cáncer de mama en particular, mediante el análisis de la expresión de marcadores del estado de diferenciación, se considera que los adipocitos del TAAT sufren un proceso de de-diferenciación por el cual adquieren características inmaduras, similares a la de sus precursores, los pre-adipocitos (PA)(Zhu et al. 2022). Se ha visto que, si se aíslan las células adiposas modificadas del frente tumoral y se las cultiva con los factores necesarios para la diferenciación, estas células son capaces de re-diferenciarse *in vitro* a adipocitos maduros (Zhu et al. 2022), demostrando así su capacidad adipogénica, similarmente a la de los PA.

Como se mencionó anteriormente, tras una exposición prolongada a las células tumorales, los adipocitos maduros pierden parte de su contenido de lípidos con lo cual adquieren una morfología fibroblástica, la cual coincide también con la morfología de los PA (Bochet et al. 2013). Otros estudios han mostrado, sin embargo, que como parte de las modificaciones que puede sufrir el tejido adiposo peritumoral ocurre un proceso conocido como pardeamiento de los adipocitos (discutido más adelante) (Gantov et al. 2021; Pagnotta et al. 2023). Este proceso ocurre tanto en tumores mamarios en humanos como en ratones, pero no están claras las evidencias de su implicancia en la progresión de la enfermedad. El origen de estas alteraciones fenotípicas y funcionales en los adipocitos circundantes al tumor mamario está sólo parcialmente caracterizado y los mecanismos precisos subyacentes se desconocen.

Poblaciones de adipocitos y sus precursores

En los últimos años, con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de RNA-seq y más aún de scRNA-seq, se ha determinado que las poblaciones de adipocitos y sus precursores son en realidad heterogéneas y dinámicas, tanto en tejido adiposo humano como murino (Emont et al. 2022). Es importante mencionar que debido a la naturaleza de los adipocitos y su incompatibilidad con las características intrínsecas de la microfluídica implementada en scRNA-seq se puede utilizar solo la secuenciación del RNA nuclear (snRNA-seq) para analizar las células adiposas maduras. De este modo se han establecido, y en algunos casos re-definido, marcadores específicos de las distintas subpoblaciones.

Simplificadamente, por definición, se reconoce que existen dos tipos distintos de adipocitos maduros: los blancos, denominados así por componer el WAT; y los marrones, que conforman el *Brown Adipose Tissue* (BAT). Los adipocitos blancos, que son descritos como células de gran tamaño que contienen una sola gota lipídica (uniloculares), son las principales células de almacenamiento de energía; mientras que los adipocitos marrones (multiloculares), tienen la función de proveer de energía al organismo produciendo calor (Sethi and Vidal-Puig 2007). Estas diferencias se reflejan en la expresión específica de proteínas de señalización en el tejido adiposo y también en los perfiles de expresión génica. De este modo, se pueden utilizar la medición de marcadores específicos para definir el tipo de tejido adiposo presente en un tejido dado, como por ejemplo: la adipocitoquina Adiponectina (Adipoq), que es producida específicamente por el WAT (Lee and Shao 2014) es marcador de adipocito maduro blanco; y la proteína desacoplante 1 (UCP1), presente en las mitocondrias de los adipocitos del BAT es el marcador de adipocitos maduros marrones (Ikeda and Yamada 2020). Por otro lado, ambos tipos de adipocitos expresan la proteína Plin1, siendo este un marcador de tejido adiposo general (Greenberg et al. 1993). Adicionalmente, se ha visto que otro tipo de adipocito con capacidad termogénica similar a la de los adipocitos marrones, pueden aparecer en los depósitos de tejido adiposo blanco. Dado que los adipocitos blancos y marrones derivan de diferentes células precursoras, y que estas no se encuentran presentes en el tejido adiposo blanco, este tipo específico de adipocitos se denomina adipocitos *beige*, los cuales son positivos para UCP1, y el proceso de conversión de blanco a *beige* en el WAT se denomina pardeamiento o *browning* (Ikeda and Yamada 2020; Pagnotta et al. 2023).

El WAT mamario, como todo tejido adiposo blanco, está compuesto de tejido conectivo y adipocitos maduros blancos como su unidad fundamental. El tejido conectivo que rodea a los adipocitos maduros contiene la fracción estromal que alberga células madre y progenitoras adiposas (ASPCs), que son las células que dan origen a los adipocitos, junto con las células inmunes y endoteliales, que aseguran la homeostasis general del tejido (Cristancho and Lazar 2011; Gregoire, Smas, and Sul 1998). Considerando los análisis realizados por técnicas de sc/snRNAseq (Ferrero, Rainer, and Deplancke 2020; Merrick et al. 2019), se considera que las ASPCs se caracterizan por la expresión del receptor de ligandos PDGF (PDGFR) (otro receptor tirosina quinasa), particularmente PDGFR α , y se conforman por tres subpoblaciones: células madre adiposas (ASCs), células reguladoras de la adipogénesis, recientemente definidas (denominadas Aregs) (Schwalie et al. 2018), y

los pre-adipocitos (PA). Los marcadores de PA y sus vías de señalización serán descritas en detalle en la última parte de la tesis.

Por lo tanto, los PA, los precursores inmaduros de los adipocitos blancos, están normalmente presentes en el tejido adiposo mamario, pero en bajas proporciones (Qian et al. 2024). Los PA son negativos para Plin1, pero positivos para ciertos marcadores como PDGFR α , o el denominado ligando Delta 1 no canónico de Notch (DLK1) (también conocido como Pref-1). Ambos, PDGFR α y DLK1, no se expresan en adipocitos maduros; por otro lado, mientras que PDGFR α es compartido con los fibroblastos, DLK1 es considerado un marcador específico de PA (Hudak and Sul 2013) (**Tabla I1**).

Célula	ASC	Pre-adipocito (PA)	Adipocito en proceso de diferenciación	Adipocito blanco	Adipocito marrón	Adipocito beige
Marcadores	<i>Dpp4</i>	<i>Dlk1</i>	<i>Pparg</i>	<i>Leptin</i>	<i>Ucp1</i>	<i>Ucp1</i>
	<i>Cd24</i>	<i>Icam1</i>	<i>Cebpa</i>	<i>Adipoq</i>	<i>Prdm16</i>	<i>Prdm16</i>
	<i>Pdgfra</i>	<i>Pdgfra</i>		<i>Plin1</i>	<i>Pgc1a</i>	<i>Pgc1a</i>
				<i>Pparg</i>	<i>Plin1</i>	<i>Cidea</i>
				<i>Cebpa</i>	<i>Pparg</i>	<i>Pparg</i>
					<i>Cebpa</i>	<i>Cebpa</i>

Tabla I1. Marcadores principales de las células adiposas en distintos estadios de diferenciación. Células madre adiposas (ASC): *Dipeptidyl peptidase-4 (Dpp4)*, *Cd24*, *Platelet-derived growth factor Alpha (Pdgfra)*. Pre-adipocitos (PA): *Delta-like 1 homolog (Dlk1)*, *Intracellular adhesion molecular 1 (Icam1)*, *Pdgfra*. Adipocito en diferenciación: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg)*, *CCAAT/enhancer-binding protein Alpha (Cebpa)*. Adipocito blanco: *Leptin*, *Adiponectin (Adipoq)*, *Perilipin1 (Plin1)*, *Pparg*, *Cebpa*. Adipocito marrón/beige: *Uncoupling protein 1 (Ucp1)*, *Positive Regulatory Domain Zinc Finger Region Protein 16 (Prdm16)*, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (Pgc1a)*, *Plin1*, *Pparg*, *Cebpa*, *Cell Death Inducing DFFA Like Effector A (Cidea)*.

Es importante mencionar en este punto que las categorizaciones realizadas sobre estas poblaciones celulares nos permiten facilitar el estudio de las mismas y el hablar un lenguaje común para referirnos a ellas, pero como mencionamos anteriormente hay que considerar que estas poblaciones no son entidades discretas sino más bien un continuo que puede caracterizarse por la expresión de distintos marcadores que las células van adquiriendo o perdiendo durante el proceso de diferenciación.

El proceso de diferenciación en los adipocitos

Durante la diferenciación de los adipocitos, la adquisición del fenotipo adiposo se refleja en la aparición de marcadores tempranos, intermedios y tardíos y en la acumulación de triglicéridos (**Figura I9**). El proceso de diferenciación se caracteriza por cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes, es decir, cambios que tienen lugar a nivel transcripcional. Además de la activación de genes, se reprimen aquellos genes que inhiben la adipogénesis o que simplemente son innecesarios para la función de las células adiposas (Cristancho and Lazar 2011; Gregoire, Smas, and Sul 1998; Ghaben and Scherer 2019).

Para estudiar el proceso de diferenciación a adipocitos en cultivo se pueden utilizar líneas celulares de PA aislados de cultivos primarios de tejido adiposo murino (Matesanz et al. 2017) o bien de líneas celulares establecidas de PA, como la línea comercial ampliamente utilizada 3T3-L1 (Zebisch et al. 2012). El proceso de diferenciación de PA puede diferir según los modelos de cultivo celular y los protocolos de diferenciación empleados. De manera general, la diferenciación *in vitro* de estas células consiste en la estimulación de los cultivos con un cóctel adipogénico, el cual incluye: tiazolidinedionas (TZD) (como rosiglitazona o troglitazona), que son compuestos agonistas del factor de transcripción maestro adipogénico PPAR γ , dexametasona (DEX), que reduce la expresión de *Dlk1* (Smas et al. 1999) e induce la expresión de *Cebpd*, otro factor clave de la adipogénesis (Cao, Umek, and McKnight 1991), isobutilmetilxantina (IBMX), que aumenta la expresión de *Cebpd*, e insulina, que permite el ingreso de glucosa en las células (Klemm et al. 2001).

El arresto en la proliferación celular de los PA es el primer paso para que la diferenciación de los adipocitos se lleve a cabo. Se ha demostrado que PPAR γ y otro de los factores de transcripción de la familia CEBP, CEBP α , actúan cooperativamente para provocar la detención del crecimiento necesaria (Timchenko et al. 1996; Umek, Friedman, and McKnight 1991). Luego del frenado en la proliferación celular, los PA deben recibir una combinación adecuada de señales mitogénicas y adipogénicas para continuar con los pasos de diferenciación posteriores.

Durante la diferenciación de los adipocitos, las células precursoras pasan de una forma fibroblástica a una esférica y se producen cambios dramáticos en la morfología celular. Durante la fase terminal de diferenciación, los adipocitos en cultivo aumentan notablemente la lipogénesis *de novo* y los niveles de actividad de las enzimas asociadas, adquieren sensibilidad a la insulina (Paulauskis and Sul 1988; Spiegelman, Frank, and Green 1983), y expresan, además, los productos específicos de los adipocitos maduros, como Plin1 y Adipoq en el caso de adipocitos blancos. La acumulación de lípidos dentro de las vacuolas lipídicas de los adipocitos puede identificarse fácilmente mediante la tinción de *Oil-red*, un colorante que se une específicamente a moléculas lipídicas y es ampliamente utilizado (Ramírez-Zacarías, Castro-Muñozledo, and Kuri-Harcuch 1992).

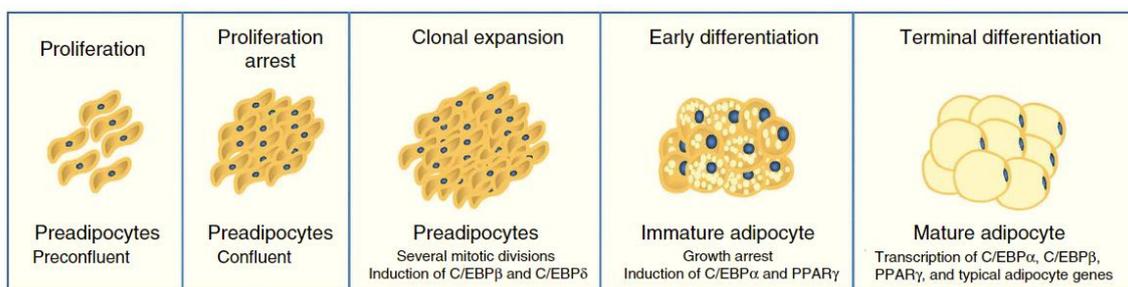


Figura I9. Esquema del proceso de diferenciación de adipocitos. Se esquematiza el proceso de diferenciación de pre-adipocitos (PA) a adipocitos maduros de tipo blanco. Se indican las diferentes etapas de proliferación, expansión clonal y diferenciación. Los PA proliferan hasta tener una confluencia total en la superficie de cultivo, momento en el cual la proliferación se detiene y ocurre un proceso de expansión clonal. En esta fase se induce la expresión de factores inductores de la diferenciación como C/EBP β y C/EBP δ . La diferenciación ocurre como consecuencia del arresto en

la proliferación y la activación de los factores C/EBP α y PPAR γ . La diferenciación terminal consta de la incorporación de lípidos y la expresión de factores típicos de adipocito. Modificado de (Esteve Ràfols 2014).

Como se mencionó anteriormente, dos familias de factores de transcripción, CEBP y PPAR, se inducen durante la diferenciación de los adipocitos (Rosen and Spiegelman 2001; Brun et al. 1996; Chawla and Lazar 1994). Más recientemente, se ha identificado la proteína 1 de la vía de señalización inducible por Wnt1 (Wisp1), como una nueva molécula que reprime la actividad de PPAR γ , y que en consecuencia podría ser importante como reguladora del estado de diferenciación de adipocitos (Ferrand et al. 2017).

El metabolismo energético en el contexto de la interacción de la célula tumoral con el tejido adiposo

Las células tumorales necesitan proliferar rápidamente y utilizan una serie de procesos que consumen gran cantidad de energía para impulsar una mayor síntesis de proteínas y material genético (Menendez and Lupu 2007). Además, deben mantener un suministro constante de lípidos y precursores de lípidos para impulsar la producción de membranas en las células tumorales. Se ha reportado que las células epiteliales de la glándula mamaria del ratón pueden utilizar ácidos grasos provenientes de los adipocitos del *fat pad* mamario (Hovey and Aimo 2010). En este caso, las células epiteliales inducen la lipólisis en los adipocitos adyacentes durante la lactancia, los cuales pueden utilizarse para la síntesis *de novo* de ácidos grasos en las células epiteliales mamarias lactantes. Esta interacción entre ambos tipos celulares se encuentra claramente alterada con la presencia de células tumorales mamarias (Balaban et al. 2017).

El consumo de energía de la célula depende principalmente de la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), que es altamente eficiente y genera más ATP que la glucólisis. En 1924, el fisiólogo Otto Warburg observó que las células tumorales pueden obtener energía de forma inusual: en condiciones aeróbicas, en lugar de usar el oxígeno para producir energía a través de la respiración mitocondrial, como lo hacen las células normales, optan por utilizar glucólisis, un fenómeno conocido como efecto *Warburg*. Así, en condiciones aeróbicas, los tumores muestran altas tasas de glucólisis en comparación con el tejido circundante (Liberti and Locasale 2016). Más recientemente, una gran cantidad de evidencia indica que las células tumorales llevan a cabo una reprogramación metabólica, lo que supone un uso extensivo (y dependiente) de la glucosa y/o la glutamina para su crecimiento y supervivencia (Faubert, Solmonson, and DeBerardinis 2020). Se ha demostrado que esta reprogramación metabólica puede ocurrir en respuesta a señales ambientales, así como a la activación de oncogenes y/o la pérdida de función de supresores de tumores (Tarrado-Castellarnau, de Atauri, and Cascante 2016).

Existen dos parámetros principales que se utilizan para estudiar el metabolismo energético que están directamente relacionados con el metabolismo celular y el uso de nutrientes: la tasa de consumo de oxígeno o *Oxygen Consumption Rate* (OCR) y la tasa de acidificación extracelular o *ExtraCellular Acidification Rate* (ECAR). El OCR mide la cantidad de oxígeno que las células consumen, lo cual está ligado a la oxidación de sustratos como la glucosa o ácidos grasos dentro de la mitocondria. Cuando se agrega un sustrato

(nutriente) a las células en cultivo y el OCR aumenta, indica que las células están utilizando ese sustrato para generar energía a través de la fosforilación oxidativa. Un incremento en el OCR refleja una mayor actividad mitocondrial. El ECAR, por otro lado, mide la acidificación del medio circundante a las células, que es principalmente el resultado de la producción de ácido láctico durante la glucólisis, un proceso que ocurre en el citoplasma de la célula cuando se metaboliza la glucosa en ausencia de oxígeno o cuando la respiración mitocondrial no es suficiente (Schmidt, Fisher-Wellman, and Neuffer 2021). Cuando se agrega glucosa al medio y aumenta el ECAR, esto indica un aumento del flujo glucolítico, es decir, las células están utilizando más glucosa y produciendo más ácido láctico.

Sin embargo, la proporción de contribución de la glucólisis frente a OXPHOS para el rendimiento total de ATP varía en diferentes tipos celulares y, como se describió anteriormente, está alterada en las células tumorales. Para investigar estos parámetros, el OCR y el ECAR, se pueden medir mediante un analizador de flujo extracelular *Seahorse*, un equipo que evalúa el metabolismo energético celular en tiempo real (**Figura I10**). Al estudiar ambos parámetros, es posible determinar qué vía metabólica predomina en las células (la fosforilación oxidativa o la glucólisis) y cómo responden a la adición de diferentes nutrientes o tratamientos (Pike Winer and Wu 2014).

Inicialmente, en ausencia de glucosa, el ECAR es bajo debido a la mínima actividad glucolítica. Al agregar glucosa, se observa un aumento significativo en ECAR, lo que indica un incremento en el flujo glucolítico, reflejando la capacidad basal de las células para metabolizar glucosa y producir ácido láctico. Posteriormente, la adición de oligomicina, que inhibe la ATP sintasa mitocondrial, provoca un mayor aumento en ECAR, ya que las células dependen más de la glucólisis para obtener energía, revelando la capacidad glucolítica máxima. Finalmente, la adición de 2-DG, un inhibidor de la glucólisis, causa una caída brusca en ECAR, confirmando que la acidificación medida proviene principalmente de la glucólisis (**Figura I10**).

Por otro lado, la curva de OCR refleja la actividad mitocondrial y capacidad respiratoria celular. Inicialmente, se mide el consumo de oxígeno basal, correspondiente a la respiración mitocondrial en condiciones normales. La adición de oligomicina reduce el OCR, indicando la respiración mitocondrial acoplada a la producción de ATP. Posteriormente, al agregar un desacoplador de la mitocondria como FCCP, el OCR aumenta al máximo, revelando la capacidad respiratoria máxima de las mitocondrias. Finalmente, la adición de inhibidores como rotenona y antimicina A provoca una caída brusca del OCR, mostrando el consumo de oxígeno no mitocondrial (**Figura I10**).

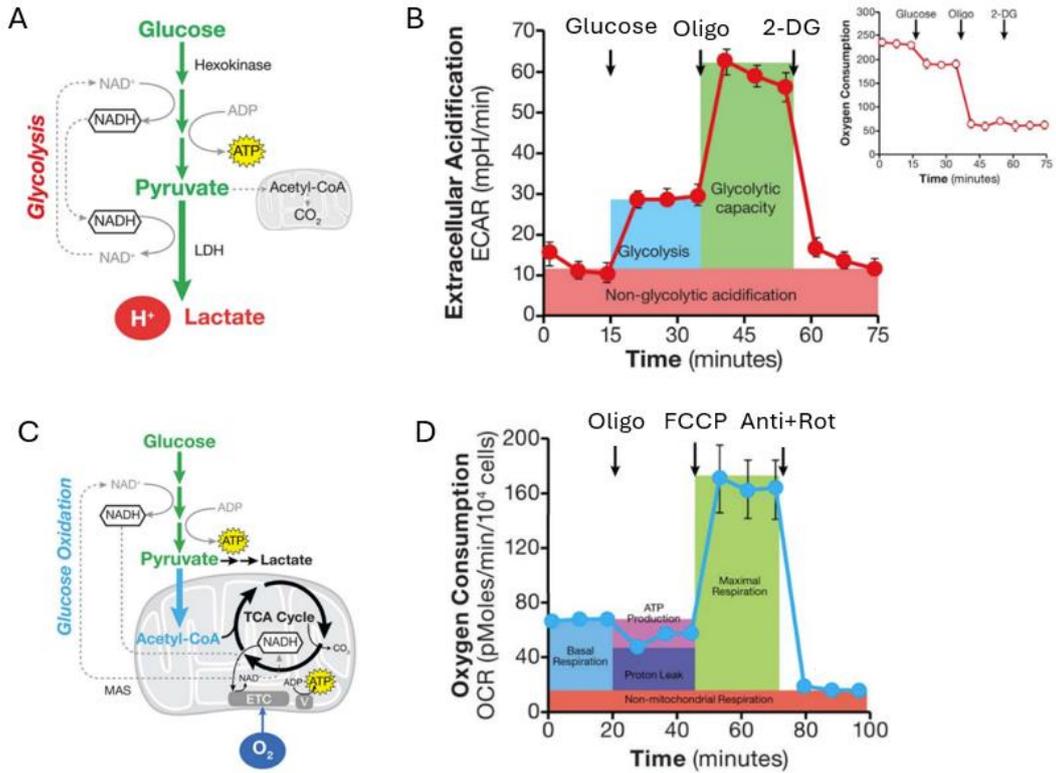


Figura 110. Estudio del metabolismo celular: respiración mitocondrial y vía glucolítica. (A) Esquema de la glucólisis. (B) Ejemplo de análisis del flujo glucolítico y capacidad glucolítica. Se muestra la respuesta cinética ECAR de células HeLa a la glucosa, oligomicina y 2-DG. Se muestra además la medición de OCR en respuesta a la glucosa y la oligomicina (derecha). (C) Esquema de la vía de oxidación de la glucosa. (D) Se muestra mediante el OCR la respuesta cinética de células HeLa a oligomicina, FCCP y Anti+Rot (antimicina A y rotenona). A partir de este gráfico se calculan y cuantifican los valores de respiración basal, producción de ATP, pérdida de protones y respiración máxima. Modificado de (Pike Winer and Wu 2014).

Resultados – Parte II

Generación del modelo celular tumoral mamario de ausencia de RET (RET-KO)

Para estudiar en profundidad los efectos de la presencia o ausencia de la señalización de RET en las células tumorales sobre el tejido adiposo, nos propusimos generar un nuevo modelo celular murino carente o *knock-out* (KO) de la expresión de RET (RET-KO). Para ello, llevamos a cabo la edición del gen de *Ret* mediada por el sistema CRISPR/Cas9 en la línea tumoral mamaria murina EO771. Las células EO771 han sido descritas como un modelo representativo del subtipo luminal de cáncer de mama humano resistente a la terapia endócrina (Le Naour, Rossary, and Vasson 2020; Le Naour et al. 2020), subtipo en el cual RET se encuentra altamente expresado (Pecar et al. 2023). Estas células expresan ER pero son negativas para PR (ER+PR-), indicando un ER no funcional, también en concordancia con los tumores generados por la sobre-expresión de RET en nuestro modelo de ratón transgénico *Ret*/MTB (Gattelli et al. 2018).

En el laboratorio contamos con varias líneas tumorales mamarias que expresan Cas9 acopladas a GFP (Cas9-GFP), incluyendo la línea EO771 (EO771-Cas9) (**Figura R9A-B**). Para llevar a cabo la delección del gen de *Ret*, primero se diseñaron dos guías alternativas de RNA o *single guide RNA* (sgRNA), las cuales fueron clonadas en el plásmido lentiviral, que además brinda a las células la resistencia ortogonal al antibiótico G418. Partículas virales conteniendo el plásmido con la sgRNA (RET-KO) o el plásmido sin sgRNA, como control (RET-WT), se utilizaron para infectar cultivos de células EO771-Cas9. A continuación, se seleccionaron las células con el antibiótico correspondiente para enriquecer la población de células editadas. En ambas líneas celulares, EO771 RET-KO y RET-WT (*pools*), verificamos la efectividad de la edición por la técnica de T7 endonucleasa (Sentmanat et al. 2018) (**Figura R9C**). Observamos que, si bien ocurrió la edición, no fue evidente la diferencia a nivel de la abundancia de la proteína RET, presumiblemente debido a que un porcentaje de las células aún contenía el gen de *Ret* sin editar (**Figura R9D**). Al trabajar con *pools* de células hay que considerar que cada célula puede haber reparado el corte generado por las Cas9 de manera diferente, de modo que a nivel poblacional haya una reducción de la proteína, pero no una deficiencia total. Decidimos entonces realizar una selección clonal de las líneas establecidas, esto es aislar células únicas por dilución límite y luego amplificar cada una de ellas como líneas independientes, obteniendo así 2 líneas clonales (*clones*) EO771 RET-KO (sg1RET y sg2RET) y sus correspondientes controles RET-WT. Luego, se obtuvieron los lisados proteicos de cultivos de cada una de las líneas y evaluamos los niveles de RET por WB, verificando así la ausencia de expresión de RET en las células RET-KO (**Figura R9E**).

Se realizó una caracterización de las células EO771 RET-KO en comparación con su contraparte RET-WT. Primero, se evaluó la activación de vías de señalización río abajo, como la proteína ERK, en respuesta a la activación de RET por su ligando, GDNF. Para ello, cultivos de células EO771 RET-KO o RET-WT se hambreadon por 24 horas y se estimularon con GDNF durante tiempos cortos (5, 15, 20 y 30 minutos). Se extrajo proteína de los cultivos y se realizó un WB con anticuerpos específicos de activación de ERK. Según lo esperado, observamos mayor respuesta al estímulo en los niveles de fosforilación/activación de ERK respecto de la proteína total (pT202/Y204ERK/ERK) en las

células RET-WT (**Figura R9F**).

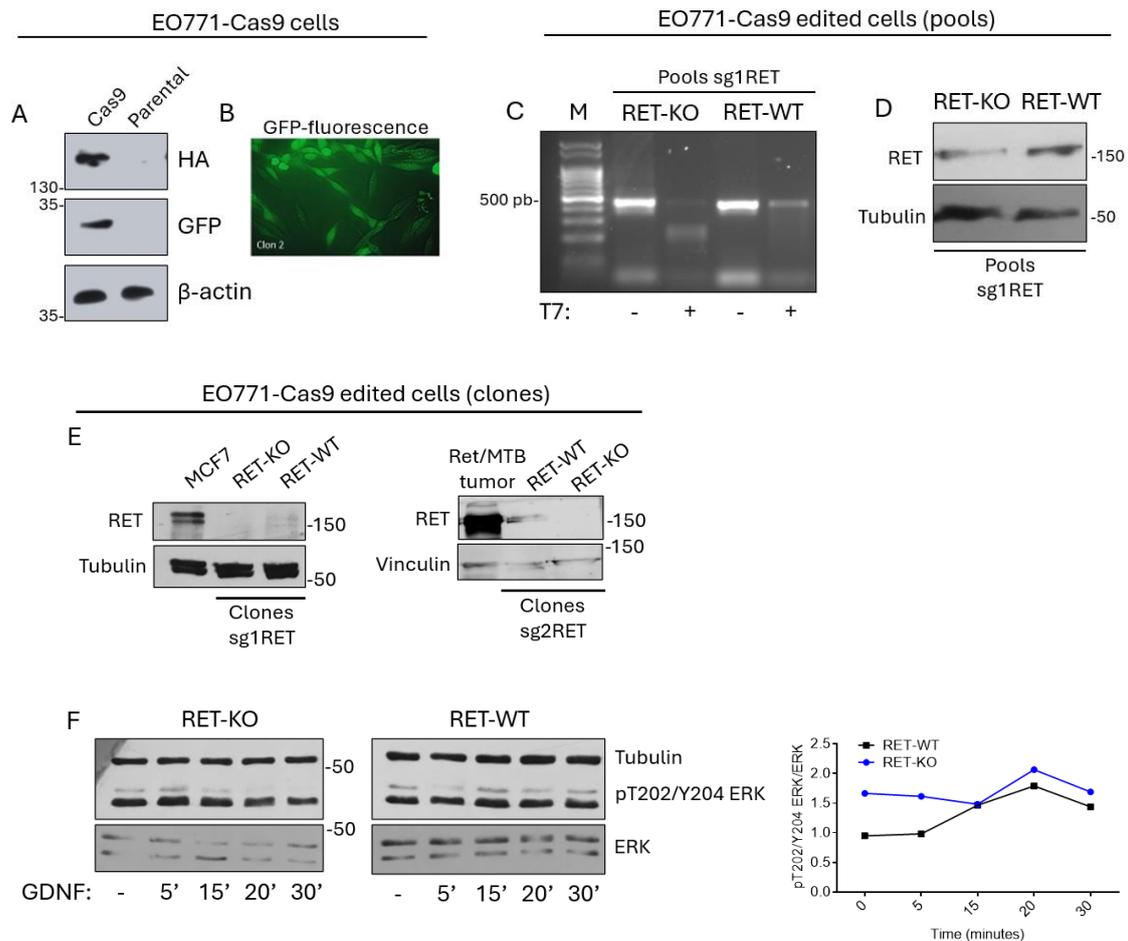


Figura R9. Caracterización del modelo celular tumoral mamario EO771 RET-KO. (A) Ensayo de WB utilizando anticuerpos específicos para las proteínas indicadas y (B) visualización de fluorescencia de células EO771-Cas9 (GFP-Cas9). (C) Ensayo de T7 endonucleasa y (D) análisis de WB para RET sobre extractos de DNA genómico o extractos proteicos, respectivamente, provenientes de las líneas EO771 RET-KO y RET-WT (*pools*). En el ensayo de T7 se visualizan los productos de PCR generados a partir de DNA genómico proveniente de las líneas celulares RET-KO (sg1RET) y RET-WT (No sg1RNA), digeridos (+) o no (-) con T7. La PCR se realizó con *primers* específicos para el exón 2 de *Ret* conteniendo el sitio de hibridación de las guías para la Cas9. El producto generado es de aproximadamente 450pb. M: marcador de peso molecular. (E) Ensayos de WB para la detección de RET realizados sobre lisados obtenidos de las líneas RET-KO y RET-WT (*clones*) generadas con las distintas sgRNAs (sg1RNA o sg2RNA). Se utilizaron lisados de células MCF7 y de un tumor RET/MTB como controles positivos de la expresión de RET. Tubulina o Vinculina fueron usadas como control de carga. (F) Análisis de WB realizados a partir de lisados proteicos de células EO771 RET-WT o RET-KO que fueron estimuladas o no (-) con GDNF (10µg/ml) por los tiempos indicados. Se analizaron los niveles de activación de ERK con anticuerpos específicos. Se realizó la cuantificación de las bandas por ImageJ y se muestra el resultado de los niveles de pT202/Y204 ERK/ERK total para cada línea a lo largo del tiempo.

Como parte de la caracterización de las líneas generadas, debido a nuestro interés en focalizar el estudio en la interacción de la célula tumoral con el tejido adiposo circundante, y considerando la importancia del tejido adiposo en el balance energético, nos preguntamos si la presencia o no de RET en las células tumorales podría modular su

capacidad energética. Para ello, las células EO771 RET-KO o RET-WT fueron sembradas en placas especiales para este estudio y, al día siguiente, se midió su respiración mitocondrial (*Mitostress test*) y la glucólisis (*Glycostress test*) en un analizador de flujo *Seahorse*. Se muestran las curvas de OCR resultantes del ensayo de *mitostress* a lo largo del tiempo para ambos cultivos, células RET-WT o RET-KO (**Figura R10A**), y los gráficos resultantes de la cuantificación de la respiración basal, producción de ATP, respiración máxima, fuga de protones y capacidad de reserva (**Figura R10B**). En lo que respecta a la respiración mitocondrial, los resultados indican que las células RET-KO son significativamente menos activas metabólicamente que las células RET-WT (**Figura R10B**). Si bien el análisis de cada sección de la curva se realizó solo para los clones sg1RET, tanto RET-WT como RET-KO, también se evaluó la respiración mitocondrial de las líneas generadas con sg2RNA. Se verificó que las líneas clonales, sg1RET y sg2RET, no presentaron diferencias significativas (**Figura R10C**).

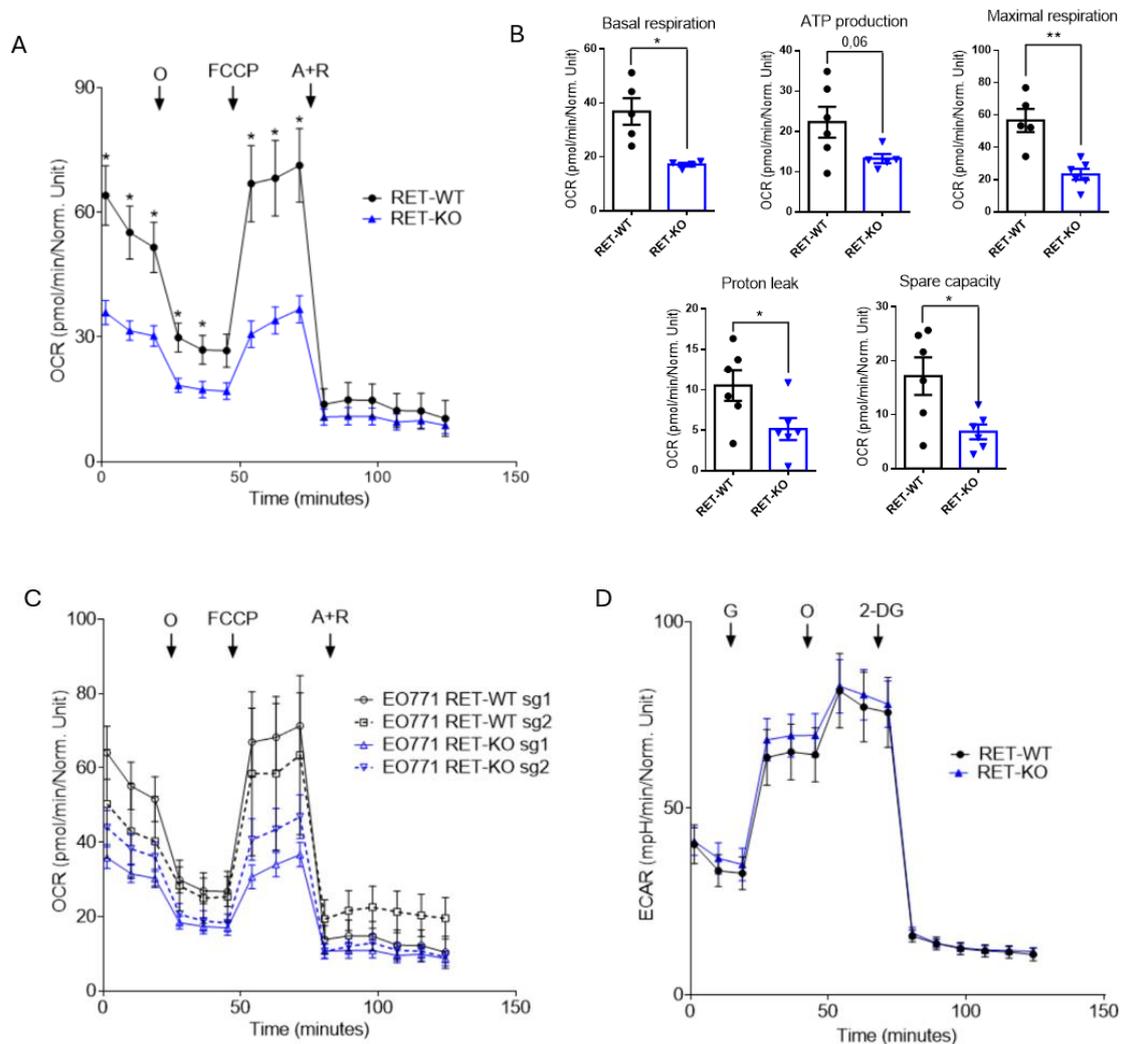


Figura R10. Caracterización metabólica del modelo celular tumoral mamario EO771 RET-KO. (A) Se muestra mediante la curva de OCR la respuesta cinética de células EO771 RET-WT y RET-KO (sg1RET) a oligomicina, FCCP y A+R (respiración mitocondrial)(N=1). (B) A partir del gráfico de OCR se calcularon los valores de respiración basal, producción de ATP, respiración máxima, fuga de protones y capacidad de reserva. Dichas cuantificaciones se evaluaron mediante t de Student. (C) Del mismo modo que en A, se muestra mediante la curva de OCR la respuesta cinética de la

respiración mitocondrial comparando los resultados obtenidos para las 2 líneas clonales independientes (sg1RET y sg2RET). (D) Se muestra la respuesta cinética ECAR de células EO771 RET-WT y RET-KO (sg1RET) a la glucosa, oligomicina y 2-DG (glucólisis). Todas las curvas se evaluaron estadísticamente mediante prueba t de *Student*, comparando la media de cada tipo celular en cada punto temporal.

Se muestran además las curvas de ECAR resultantes del ensayo de *glycostress* a lo largo del tiempo, en dónde no se observan diferencias significativas en cuanto a la vía de la glucólisis en las líneas celulares EO771 RET-KO respecto de la línea control RET-WT (**Figura R10D**). Estos resultados indican que la presencia de RET reprograma metabólicamente a las células tumorales aumentando su capacidad de respiración aeróbica, pero sin aparente modificación de su capacidad de realizar glucólisis.

Efecto del secretoma dependiente de la expresión de RET en células tumorales sobre cultivos de adipocitos maduros

Decidimos estudiar *in vitro* si el secretoma de RET en la célula tumoral es capaz de modular características específicas de los adipocitos maduros, como su contenido lipídico o su perfil de expresión de marcadores específicos. Para ello, utilizamos un cultivo de adipocitos diferenciados *in vitro*, tratados con medios condicionados (CM) de cultivos de células tumorales EO771 RET-WT en comparación con el CM provenientes de las células RET-KO. Para esto, utilizamos una línea de pre-adipocitos (PA) que puede ser diferenciada a adipocitos maduros blancos en cultivo siguiendo protocolos establecidos (Matesanz et al. 2017). Una vez llegados a la madurez, tratamos los cultivos con los CM durante 72 horas (**Figura R11A**). Al culminar los tratamientos, cosechamos las células adiposas para analizar diferentes marcadores y por otro lado las fijamos para realizar tinción de lípidos por *Oil-red*.

No observamos diferencias morfológicas significativas ni tampoco respecto del contenido lipídico en los adipocitos tratados o no con CM provenientes de las células tumorales RET-WT o RET-KO (**Figura R11B**). Globalmente, el análisis de expresión de marcadores por RT-qPCR, tanto de adipocito maduro y factores de transcripción de adipogénesis temprana (*Adiponectin*, *Cebpa* *Pparg* y *Wisp1*) como de adipocitos inmaduros o precursores como PAs (*Pdgfra* y *Dlk1*), no fue concluyente respecto de la presencia de RET en las células tumorales. (**Figura R11C**). Estos resultados sugieren que la señalización de RET en la célula tumoral no es suficiente para generar un cambio profundo sobre el adipocito maduro aislado.

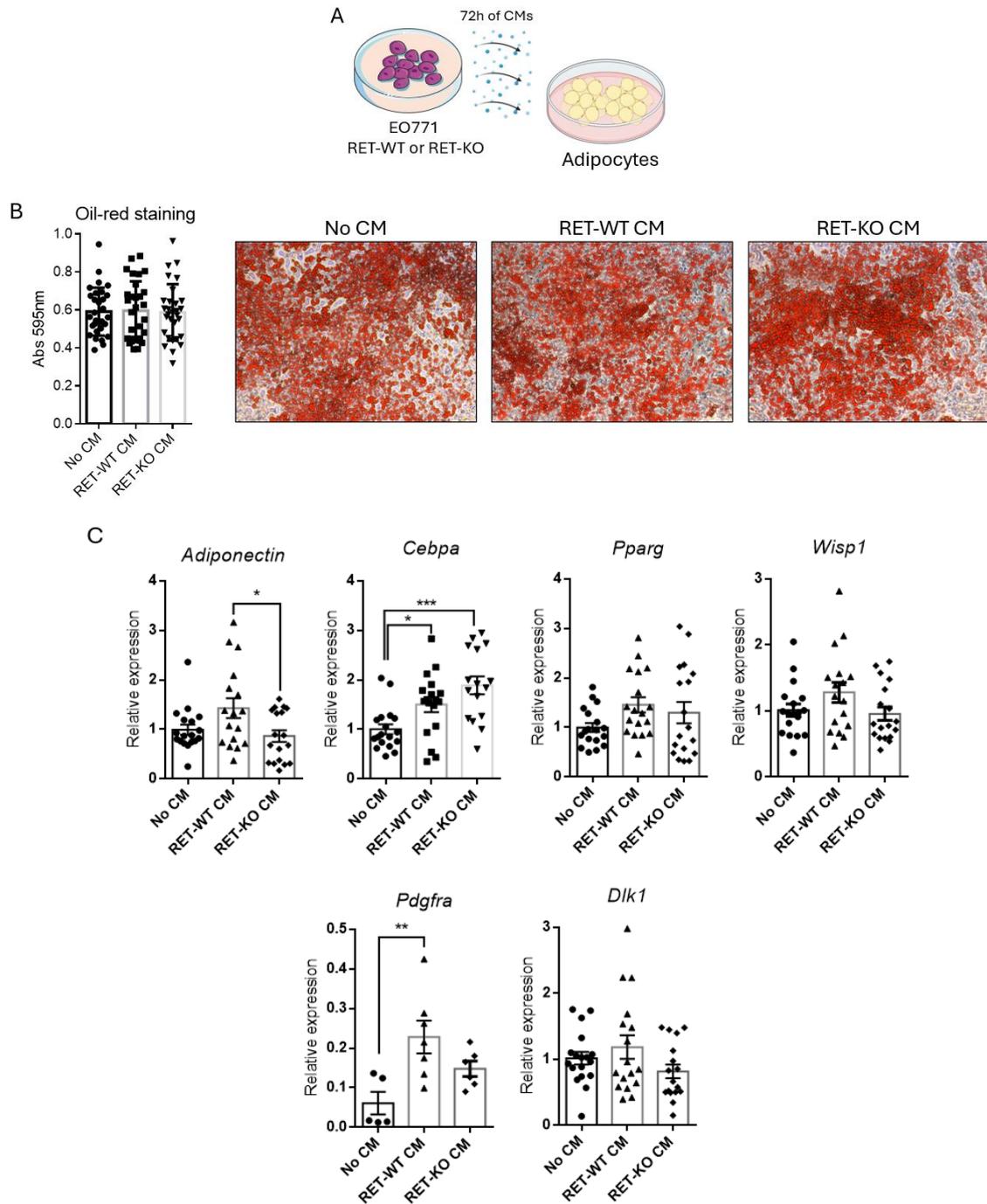


Figura R11. Expresión de marcadores de diferenciación de adipocitos en cultivos de adipocitos maduros tratados con CM de células tumorales del modelo RET-KO. (A) Esquema del experimento realizado. (B) Adipocitos maduros (D9 del protocolo de diferenciación) tratados o no tratados (No CM) con medio condicionado proveniente de células tumorales EO771 RET-WT (RET-WT CM) o RET-KO (RET-KO CM) durante 72 horas, se fijaron y tiñeron mediante *Oil-red* y se tomaron fotografías de las cuales se muestran imágenes representativas (aumento: X100). Posteriormente, se realizó la cuantificación de la tinción solubilizando el colorante adquirido por las células y se midió su absorbancia a 595 nm. Se muestran los resultados correspondientes de 3 experimentos independientes (N=3). (C) En un experimento equivalente, se extrajo RNA de los cultivos y se analizó la expresión de marcadores del estado de diferenciación de adipocitos por RT-qPCR con *primers* específicos. Se muestran los resultados de 3 experimentos (N=3). Los valores de expresión de cada uno de los genes se relativizaron a la expresión de *Gapdh*. El análisis estadístico de las cuantificaciones se analizó mediante *One Way ANOVA*.

Efecto del secretoma dependiente de la expresión de RET en células tumorales sobre cultivos de adipocitos durante el proceso de diferenciación

Decidimos estudiar *in vitro* si el secretoma de RET es capaz de afectar la capacidad adipogénica de los PA durante el proceso de diferenciación, momento en el cual las células adiposas se encuentran en etapas susceptibles a modificaciones, similarmente a lo que sucede en post-lactancia o bien en un tejido adiposo que aloja una lesión neoplásica. Para estos ensayos, tomamos cultivos de PAs y los tratamos con CM provenientes de células EO771 RET-KO o RET-WT junto con las drogas necesarias para inducir la diferenciación (esto es, troglitazona, insulina, dexametasona e IBMX) (**Figura R12A**). PA en proceso de diferenciación con su medio completo (sin CM tumoral) se utilizaron como control (No CM). Se realizó este protocolo hasta finalizar la diferenciación (9 días), cambiando el medio de las células cada dos días. Al finalizar, del mismo modo que se procedió anteriormente, se fijaron las células para tinción de lípidos con *Oil-red* y en un experimento equivalente se extrajo RNA para medición de marcadores.

A partir de la tinción de *Oil-red* se puede observar que el tratamiento con los CM de las células tumorales disminuye significativamente el contenido de lípidos en las células adiposas. Por otro lado, la cuantificación de la tinción indica que no hay diferencias significativas entre las células adiposas tratadas con los CM provenientes de células RET-KO y RET-WT, sugiriendo que la presencia de RET no impacta en la incorporación de lípidos de estas células (**Figura R12B**).

Sin embargo, se hallaron diferencias significativas en los marcadores de diferenciación de adipocito, entre los tratamientos con el medio de células RET-KO en comparación con el medio de células RET-WT (**Figura R12C**). Mediante las mediciones por RT-qPCR de marcadores específicos, observamos una reducción en marcadores de adipocito blanco, mostrando diferencias significativas para *Adiponectin* y *Pparg* y, acompañado de un aumento significativo en su regulador negativo, *Wisp1*. Respecto a los marcadores de adipocitos inmaduros y PAs, estos no resultaron concluyentes. Si bien *Pdgfra* se encuentra significativamente aumentado en las células tratadas con CM RET-WT, *Dlk1* presenta el mismo patrón en las tratadas con CM RET-KO (**Figura R12C**). Aquí, la delección del RET tumoral (CM de células RET-KO) revierte parcialmente los cambios inducidos por el medio tumoral en varios de los marcadores.

Con estos experimentos concluimos que el contacto con el secretoma de las células tumorales interrumpe la diferenciación de los adipocitos, ya que la mayoría de las células del cultivo permanecen en un estado más indiferenciado (**Figura R12B-C**). Luego, la ausencia de RET en la célula tumoral (RET-KO) reestablece ciertas características al secretoma, permitiendo una recomposición parcial de la diferenciación, que aunque no alcanza los valores basales, representa un aumento respecto de los efectos inhibitorios del CM proveniente de las células tumorales RET-WT.

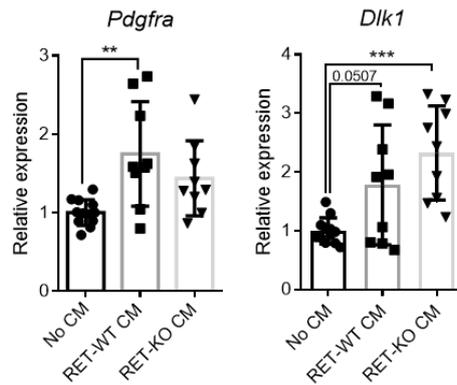


Figura R12. Expresión de marcadores de diferenciación de adipocitos en cultivos en proceso de diferenciación tratados con CM de células tumorales del modelo RET-KO. (A) Esquema del experimento realizado. (B) Pre-adipocitos murinos se diferenciaron *in vitro* mediante el agregado secuencial al medio de cultivo de troglizaton, IBMX, dexametasona e insulina (No CM). Paralelamente, se diferenciaron pre-adipocitos agregando el *cocktail* de diferenciación al medio condicionado proveniente de células EO771 RET-WT (RET-WT CM) o RET-KO (RET-KO CM). Al finalizar el protocolo de diferenciación de 9 días, los cultivos de adipocitos se fijaron y tiñeron mediante *Oil-red*. Se tomaron fotografías y se muestran imágenes representativas (aumento: X200). Posteriormente, se realizó la cuantificación de la tinción solubilizando el colorante adquirido por las células y se midió su absorbancia a 595 nm. Se muestran los resultados de dos experimentos (N=2). El análisis estadístico de los valores de las cuantificaciones se analizó mediante *One Way ANOVA*. (C) En un experimento equivalente, se extrajo RNA de los cultivos de adipocitos generados en (A) y se analizaron por RT-qPCR la expresión de los marcadores de diferenciación de adipocitos indicados. Se muestran los resultados de dos experimentos (N=2). Los valores de expresión de cada uno de los genes se relativizaron a la expresión de *Gapdh*. El análisis estadístico de los valores de las cuantificaciones se analizó mediante *One Way ANOVA* y, para algunos genes, se utilizó el test t de *Student* para comparar los tratamientos RET-WT CM y RET-KO CM y evaluar independientemente esta hipótesis.

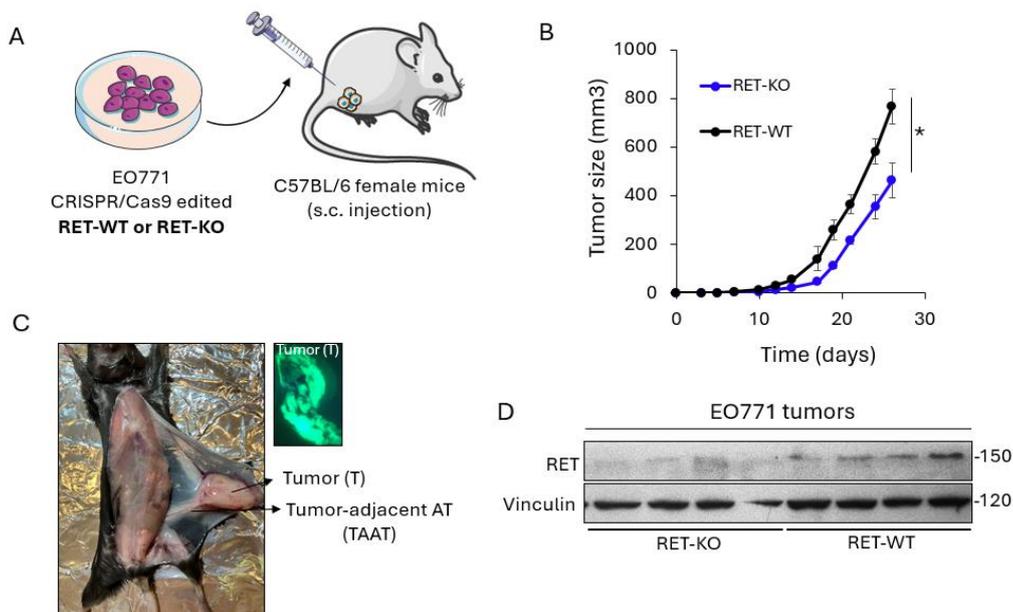
Generación del modelo *in vivo* tumoral mamario RET-KO

Muchas de las líneas tumorales que expresan Cas9 generadas en el laboratorio, si bien pueden utilizarse en ensayos *in vitro*, son rechazadas *in vivo* y no desarrollan tumores cuando se introducen en ratones (alotrasplantes). En el caso de las EO771-Cas9, contrario a lo observado para las otras líneas tumorales (descrito en Metodología), se comprobó su capacidad de formar tumores en ratones, resultando un modelo de interés para realizar experimentos *in vivo*.

Con el objetivo de evaluar *in vivo* el desarrollo tumoral y el impacto en el tejido adiposo adyacente, se preparó una suspensión de células EO771 RET-KO o sus controles RET-WT y se inyectaron (1×10^6 células/ratón) subcutáneamente en la almohadilla de grasa o *fat pad* de ratones hembra C57BL/6, estableciendo así un nuevo modelo tumoral singénico de alotrasplante (EO771-tumor) con delección de RET (**Figura R13A**). La dimensión de los tumores se supervisó cada 2 días y con dichas mediciones se realizó el cálculo del volumen tumoral correspondiente. Como se ha observado previamente con otros modelos (Gattelli et al. 2013), los tumores generados por las células RET-KO resultaron significativamente de menor tamaño a aquellos desarrollados por las células RET-WT (**Figura R13B**). Transcurridas 3-4 semanas desde el día de las inyecciones, los ratones fueron sacrificados y se llevaron a cabo las autopsias para escindir y almacenar el material de interés. Durante

las autopsias, de cada hembra, se procedió con la disección anatómica tanto de tejido tumoral (T) como del tejido estromal adyacente, mayormente tejido adiposo, definido como TAAT del inglés *Tumor Adjacent Adipose Tissue* (**Figure R13C**). Adicionalmente, tejido mamario de la mama contralateral (AT) también fue recolectado como control. Mediante fluorescencia para GFP verificamos la generación tumoral por parte de las células inyectadas (EO771-cas9) (**Figure R13C**). Mediante ensayos de WB sobre lisados de tejido tumoral verificamos los niveles de expresión de RET en los tumores RET-WT respecto de los RET-KO (**Figure R13D**).

Confirmamos por IHC que los tumores generados tanto por las células RET-KO como por las RET-WT son de tipo ER+PR- (**Figure R13E**, panel superior y medio), como ha sido descrito por otros grupos (Le Naour et al. 2020). La disminución en el tamaño tumoral observada en las curvas de crecimiento es acompañada consistentemente por la disminución significativa de la proliferación celular en los tumores, lo que fue visualizado mediante el método de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) *in vivo* y posterior análisis del tejido tumoral por IHC con anticuerpos específicos y su correspondiente cuantificación (**Figure R13E**, abajo). El análisis morfológico general por tinciones de H&E muestra que, si bien los tumores son similares, el tejido estromal adyacente al tumor presenta algunas diferencias entre los tumores RET-WT y RET-KO. En el tejido circundante a los tumores RET-WT se observa que los adipocitos son de menor tamaño y que hay mayor contenido de fibrosis respecto de lo observado adyacente a los tumores RET-KO. Esto queda demostrado mediante el abundante contenido de fibras de colágeno evidenciadas por tinción de TdM sobre los cortes histológicos (áreas teñidas en azul) (**Figure R13F**).



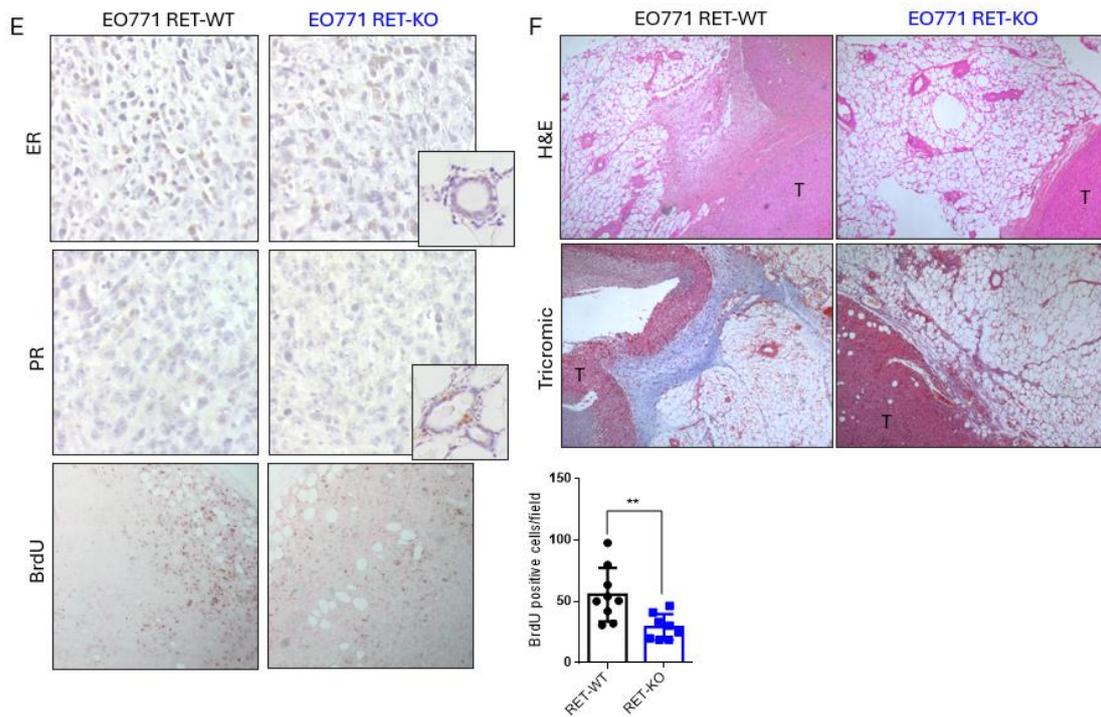


Figura R13. Caracterización del modelo de alostrasplante de tumores mamarios EO771 RET-KO. (A) Esquema de generación de alostrasplantes del modelo EO771 RET-KO. Células murinas EO771 RET-WT o RET-KO fueron inyectadas subcutáneamente en ratones hembra C57BL/6. (B) Curva de crecimiento tumoral en función del tiempo de los tumores generados. Cada grupo tuvo 6 réplicas (n=6). Se muestran los resultados agrupados de 4 experimentos independientes (N=4). Los valores del último punto de la curva se analizaron mediante el test t de *Student*. (C) Fotografía representativa que muestra la ubicación anatómica de los tumores generados. Se indican los tejidos extraídos utilizados para posterior análisis: tumor (T) y tejido adyacente al tumor (TAAT). Se muestra también una foto representativa de la fluorescencia de GFP en el tumor. (D) Análisis de WB realizado sobre lisados tumorales RET-WT y RET-KO para RET con los anticuerpos específicos indicados. (E) Imágenes representativas de las IHC realizadas en los tumores para cada uno de los anticuerpos indicados. Se muestra la cuantificación realizada a partir de la IHC de BrdU (aumento: X200) sobre cortes tumorales. Se contaron las células positivas por campo a X400 y se muestran los resultados como el promedio \pm sd de 2 experimentos independientes (N=2). Los p valores se calcularon mediante t de *Student*. Para ER y PR se muestra la tinción sobre un conducto mamario como control positivo de dichas inmunomarcaciones (aumento: X400). (F) Se muestran imágenes representativas de la histología del tumor (T) y el tejido adyacente TAAT (mayormente tejido adiposo) por tinciones de H&E y las áreas de fibrosis (azul) por tinción de TdM (aumento: X200).

Análisis *in vivo* del impacto de RET en la célula tumoral sobre el estado de diferenciación de los adipocitos adyacentes

Para estudiar las características del tejido adiposo adyacente a los tumores en el contexto de RET, se llevó a cabo el análisis de marcadores específicos de distintos estadios de diferenciación de adipocitos mamarios en el TAAT de los tumores generados en el modelo de alostrasplante, EO771 RET-KO y su contraparte RET-WT, en comparación con tejido adiposo control (AT). Para ello se realizaron ensayos de RT-qPCR utilizando *primers* específicos para determinar la expresión a nivel de RNA de estos marcadores. En algunos casos la expresión a nivel de proteína fue analizada por WB.

Primero se analizó la expresión de marcadores característicos de los adipocitos maduros blancos como *Leptin* y *Adiponectin*, y factores de transcripción de adipogénesis temprana como *Pparg* y *Cebpa* (**Figura R14**). Observamos que los niveles de *Leptin* no cambian y, en el caso de *Adiponectin*, si bien en ambos tejidos peri-tumorales este marcador se encuentra disminuido en comparación al AT control, observamos que en el TAAT de los tumores RET-WT la expresión se encuentra significativamente reducida respecto del TAAT correspondiente a los tumores RET-KO (**Figura R14**). Siendo que nuestra hipótesis involucra la comparación entre el TAAT RET-WT y RET-KO, nos resultó adecuado agregar los gráficos que involucran específicamente esta comparación y realizar la estadística pertinente.

Para el caso de los factores de transcripción, tanto *Cebpa* como *Pparg* se encuentran significativamente disminuidos en el TAAT RET-WT, en comparación al AT control. Interesantemente, *Pparg* se encuentra significativamente elevado en el TAAT RET-KO en comparación a la contraparte RET-WT, y *Cebpa* muestra la misma tendencia (**Figura R14**). Este resultado en *Pparg* sugiere que en el TAAT de los tumores que expresan RET (RET-WT) el proceso de diferenciación podría estar inhibido, mientras que estos efectos serían potencialmente liberados en ausencia de RET en la célula tumoral. En base a la expresión diferencial de *Pparg* en el tejido peri-tumoral, decidimos profundizar en el mecanismo y explorar la expresión de factores reguladores del mismo, como *Wisp1*. Se ha descrito que la actividad de PPAR γ puede ser regulada negativamente tanto a niveles proteicos como del mensajero mediante la proteína WISP1, a través mecanismos parcialmente descritos (Ferrand et al. 2017). Interesantemente, los niveles de expresión de *Wisp1* se encuentran disminuidos en el TAAT del tumor RET-KO (**Figura R14**), lo cual favorecería la actividad de PPAR γ como inductor de adipogénesis en estos tejidos, en comparación a la contraparte RET-WT.

Estos resultados indicarían que, por un lado, en presencia de un tumor, los adipocitos adyacentes a él se encuentran en un estado más inmaduro y que, cuando el tumor expresa RET, su señalización potencia aún más esta inmadurez en los adipocitos circundantes. De este modo, la presencia de RET en el tumor podría regular positivamente los mecanismos de inhibición de la adipogénesis.

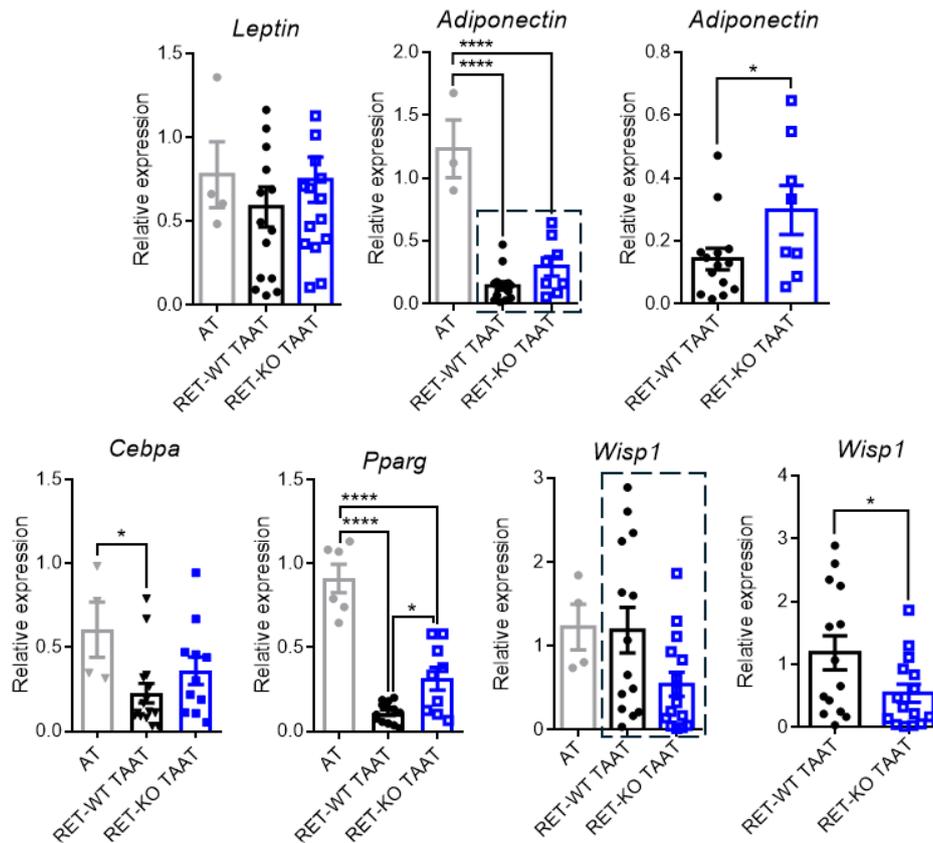


Figura R14. Expresión de marcadores de tejido adiposo maduro blanco o WAT en el modelo de tumores mamarios RET-KO. Análisis de qRT-PCR para los genes de interés realizadas en el tejido adiposo adyacente a tumores (TAAT) RET-WT o RET-KO, o en tejido adiposo subcutáneo de la mama contralateral (AT), descrito como WAT, como control. Se muestran los resultados como el promedio \pm sd. El análisis estadístico se realizó mediante *One Way ANOVA* y, para algunos genes, se utilizó el test t de *Student* para comparar los tratamientos RET-WT TAAT y RET-KO TAAT y evaluar independientemente esta hipótesis. Se muestra la cuantificación de 3 experimentos independientes (N=3).

Debido a que se ha descrito que en algunos modelos murinos existe *browning* en el tejido adiposo adyacente al tumor (Kir et al. 2014), evaluamos también marcadores de adipocito marrón. Analizamos la expresión del gen *Ucp1*, que como se mencionó anteriormente se expresa en adipocitos marrones maduros, y también de los genes *Pgc1a* y *Prdm16*, los cuales se expresan durante la diferenciación adiposa parda. Si bien no observamos cambios significativos en *Ucp1* y *Prdm16* en las muestras de tejido analizadas, si encontramos un aumento significativo en la expresión de *Pgc1a* en el TAAT de tumores RET-WT en comparación al tejido control y al TAAT RET-KO, lo cual indicaría que hay un efecto de *browning*, al menos parcial, en estos tejidos (**Figura R15**).

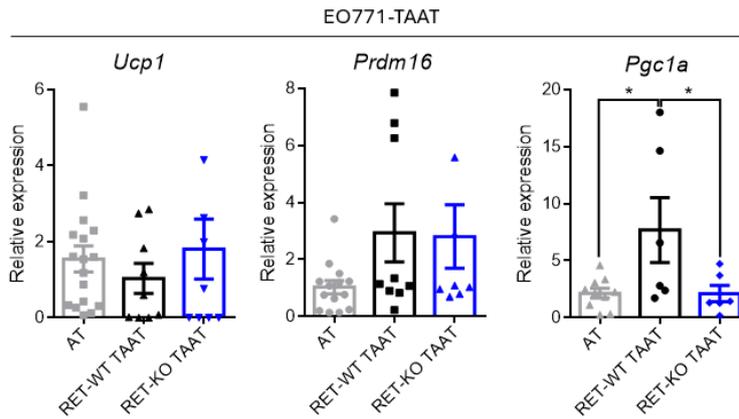


Figura R15. Expresión de marcadores de tejido adiposo maduro marrón o BAT en el modelo de tumores mamarios RET-KO. Análisis de RT-qPCR para los genes de interés realizadas en el tejido adiposo adyacente a tumores (TAAT) RET-WT o RET-KO, o en tejido adiposo subcutáneo de la mama contralateral (AT), descrito como WAT, como control. Se muestran los resultados como el promedio \pm sd. El análisis estadístico se realizó mediante *One Way ANOVA*. Se muestra la cuantificación de 2 experimentos independientes (N=2).

Medimos adicionalmente la expresión de marcadores de células precursoras de adipocitos. Por un lado, se evaluó la expresión de marcadores específicos de células ASCs, como *Dpp4*, donde no se observaron diferencias entre los tejidos analizados, y *Cd24*, el cual vimos que se encuentra significativamente disminuido en los TAAT con respecto al tejido control (**Figura R16A**). Este resultado indicaría que hay una menor proporción de ASCs en los TAAT en relación al tejido control, pero deberían estudiarse más marcadores para poder continuar el estudio en este aspecto. Por otro lado, se analizó la expresión de *Dlk1*, *Pdgfra* e *Icam1*, marcadores de pre-adipocitos (PA). En este caso, tampoco observamos diferencias significativas en la expresión de estos genes comparando los tejidos TAAT de tumores RET-WT y RET-KO, ni entre el TAAT y el tejido adiposo control AT (**Figura R16B**). Sin embargo, al realizar el análisis a nivel proteico de DLK1 observamos una significativa disminución de este factor en el TAAT de tumores RET-KO en comparación con su contraparte RET-WT (**Figura R16C**), sugiriendo su potencial regulación a nivel de proteína mediante la señalización de RET en el tumor.

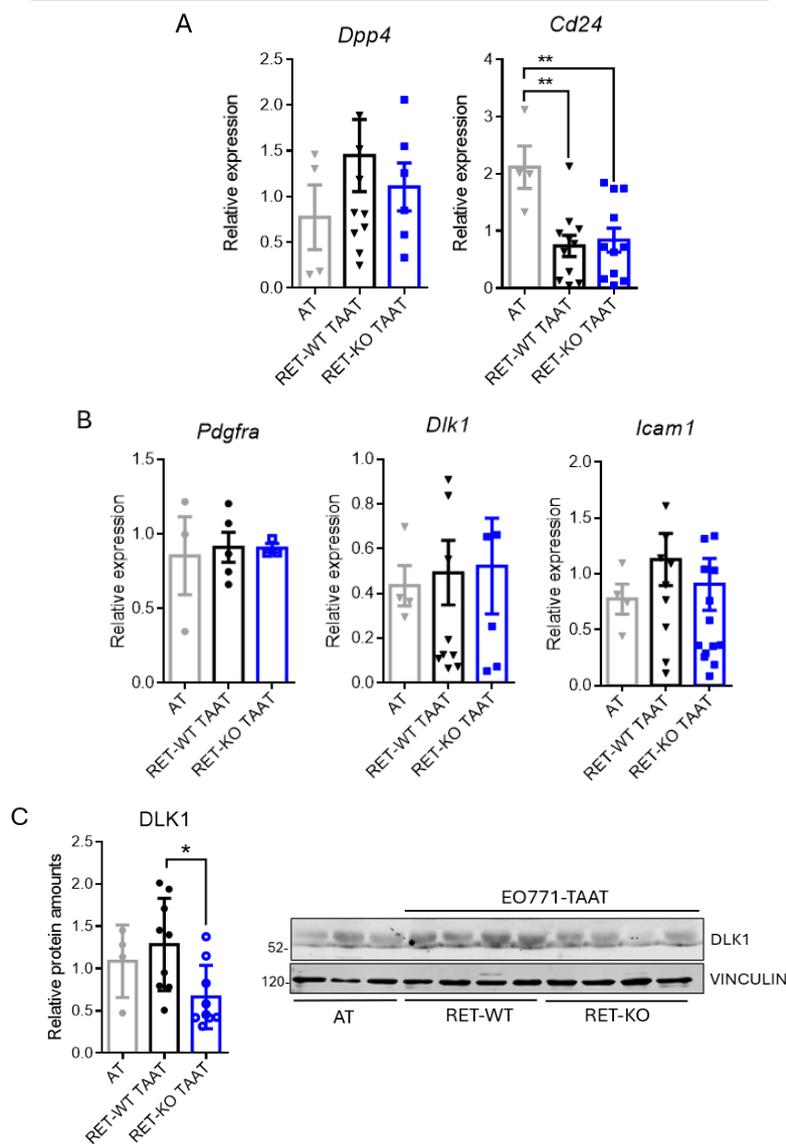


Figura R16. Expresión de marcadores de precursores de adipocitos en el modelo de tumores mamarios RET-KO. Análisis de RT-qPCR para los genes de interés como marcadores de ASCs (A) o marcadores presentes en los PA (B) realizadas en el tejido adiposo adyacente a tumores (TAAT) RET-WT o RET-KO, o en tejido adiposo subcutáneo de la mama contralateral (AT), como control. Se muestran los resultados como el promedio \pm sd de 2 experimentos independientes (N=2). El análisis estadístico se realizó mediante *One Way ANOVA*. (C) Ensayos de WB realizados en los tejidos indicados para DLK1 y Vinculina como control de carga. Se realizó la cuantificación de las bandas por ImageJ y los valores de DLK1/Vinculin se analizaron estadísticamente mediante *One Way ANOVA*. Se muestra la cuantificación de 2 experimentos independientes (N=2).

En su conjunto, hallamos que la presencia de RET en el tumor correlaciona con un tejido adiposo inmaduro, compuesto por adipocitos que pierden ciertos marcadores de madurez y expresan marcadores de adipocitos inmaduros, similar a los PA.

Validación de los hallazgos en muestras humanas: análisis de muestras de tejido adyacente al tumor en pacientes con cáncer de mama en el contexto de la expresión de RET

En primer lugar, utilizando bases de datos disponibles de pacientes (repositorio TCGA TARGET GTEx) realizamos la comparación de la expresión del gen de *RET* en biopsias de tumores de mama según la clasificación de los subtipos moleculares de tumores (normal-like n=40, luminal A n=560, luminal B n=209, Her2 n=82 y basal-like n=191), confirmando lo que nosotros y otros grupos han observado en trabajos previos, que la mayor expresión de *RET* se observa en tumores de tipo luminales (**Figura R17**) (Gattelli et al. 2013). Luego, incluimos en el análisis muestras de tejido adyacente (repositorio TCGA TARGET GTEx) a los tumores y estudiamos la correlación entre la expresión de *RET* y de los marcadores de diferenciación del tejido adiposo mencionados previamente, considerando todos los subtipos tumorales (**Tabla R1**). Estos resultados indican que la expresión de *RET* correlaciona positivamente con *DLK1* en el tejido adyacente de pacientes. Además, observamos que existe una correlación negativa entre la expresión de *RET* y marcadores de adipocito maduro como *LEPTIN* y de *browning* como *PRDM16*.

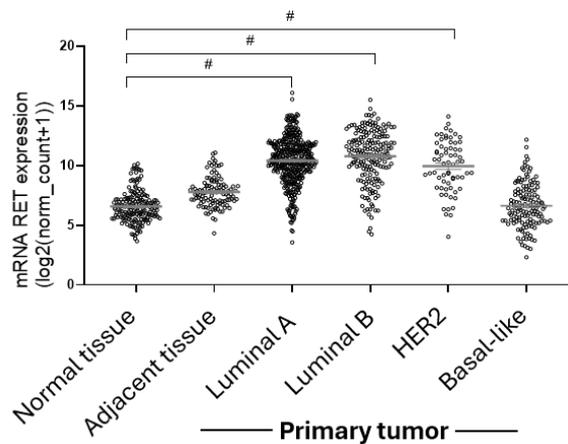


Figura R17. Expresión de RET en los distintos subtipos de tumor mamarios. Comparación de la expresión del gen RET según la clasificación molecular de los tumores de las cohortes TCGA (*Normal Like* n=40, *Luminal A* n=560, *Luminal B* n=209, *Her2* n=82 y *Basal Like* n=191). Se realizó el test Kruskal Wallis seguido del test de comparaciones múltiples Dunn.



Correlation coefficient	RET expression			
	Breast normal tissue (n = 80)	Tumor adjacent tissue (n = 113)	Tumor tissue (n = 1092)	
Pre-adipocytes (PA)	<i>PDGFRA</i>	-0,02 ns	-0,07 ns	-0,14 ****
	<i>DLK1</i>	0,17 ns	0,39 ****	-0,04 ns
White adipocytes	<i>ADIPOQ</i>	-0,27 *	-0,11 ns	0,06 *
	<i>LEPTIN</i>	-0,19 ns	-0,24 **	-0,02 ns
Brown adipocytes	<i>UCP1</i>	0,2 ns	-0,06 ns	-0,04 ns
	<i>PRDM16</i>	-0,2 ns	-0,22 *	0,04 ns

Spearman correlation test. ns: no significant, *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.

Tabla R1. La expresión de RET correlaciona con un tejido adiposo inmaduro en pacientes con cáncer de mama. Correlación entre la expresión de RET y distintos marcadores de diferenciación del tejido adiposo en tejido mamario normal, tejido adyacente al tumor y tejido tumoral. Las correlaciones se evaluaron mediante test de *Spearman*.

Estos resultados demuestran que tanto en tumores humanos y tumores de nuestros modelos pre-clínicos murinos, la expresión de RET tumoral correlaciona positivamente con marcadores de adipocitos inmaduros en el tejido adyacente.

Análisis *in vitro*, utilizando sistemas de co-cultivo, del impacto del RET tumoral sobre el estado de diferenciación de cultivos de adipocitos y sus consecuencias sobre la célula tumoral

En la glándula mamaria, el tumor está en contacto con el tejido adyacente en forma continua, lo cual permite una interacción constante, de ida y vuelta, entre los distintos tipos celulares. Con el objetivo de estudiar las consecuencias de la interacción entre el tejido adiposo y las células tumorales, llevamos a cabo experimentos de co-cultivo de ambos tipos celulares utilizando insertos *transwell*. En este sistema el *transwell* de tamaño de poro pequeño (0,4 µm de diámetro) impide el contacto directo entre las células de los distintos compartimentos, pero permite el intercambio de moléculas de señalización.

El componente adiposo, que se colocó en el pocillo inferior, corresponde a la línea de PA utilizada previamente, que se mantuvo en estado indiferenciado o bien se la sometió al protocolo de diferenciación de modo de obtener adipocitos blancos maduros, como se procedió anteriormente. El componente tumoral, es decir las células tumorales EO771 RET-KO o RET-WT, se colocó en el pocillo superior sobre los *transwells* (**Figura R18**). El co-cultivo se realizó durante 48 horas, tiempo en el cual no se cambió el medio de cultivo, permitiendo el intercambio de factores solubles. Transcurrido ese tiempo, se llevaron a cabo distintos análisis: por un lado, (A) el estudio de marcadores del estado de diferenciación adipogénica en los cultivos de PA o de PA diferenciados a adipocitos maduros, y por otro lado, (B) el análisis metabólico y de proliferación en las células tumorales (**Figura R18**).

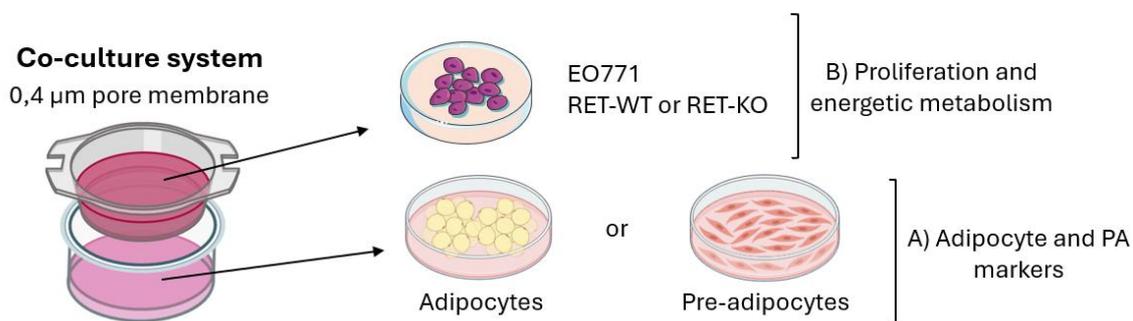


Figura R18. Esquema representativo del sistema *transwell* de co-cultivo de células adiposas con células tumorales mamarias. Células tumorales EO771 RET-KO o RET-WT se co-cultivaron durante 48 horas con pre-adipocitos o adipocitos maduros (D7 del protocolo de diferenciación) mediante insertos *transwell* de poro pequeño, sin cambiar el medio de cultivo. Luego, los adipocitos y PA se lisaron para extracción total de RNA y medición posterior de marcadores de diferenciación por qRT-PCR (A), y las células tumorales se tripsinizaron y contaron para evaluar la proliferación celular, y se plaquearon para la realización de ensayos metabólicos y posterior análisis de respiración mitocondrial y actividad glucolítica (B).

(A) Análisis sobre células adiposas, cultivos de adipocitos maduros o PA, en co-cultivo con células tumorales

Cultivos de adipocitos maduros co-cultivados con las células tumorales se analizaron para marcadores de diferenciación de adipocitos. Para el caso de *Leptin* y *Adiponectin*, se observó una reducción en la expresión de estos marcadores en los adipocitos que fueron co-cultivados con las células tumorales RET-WT en comparación a los co-cultivados con las células RET-KO (**Figura R19**), indicando que, al igual que en los análisis realizados en el modelo *in vivo*, la señalización del RET tumoral promueve la inmadurez de los adipocitos. También analizamos los niveles de los marcadores de adipogénesis temprana, *Pparg* y *Cebpa*, y en este sistema no observamos cambios en dichos marcadores, así como tampoco en la expresión del factor regulador *Wisp1* (**Figura R19**). Al medir marcadores de PA, como *Pdgfra* y *Dlk1*, tampoco observamos cambios significativos con la presencia o ausencia del RET tumoral (**Figura R19**).

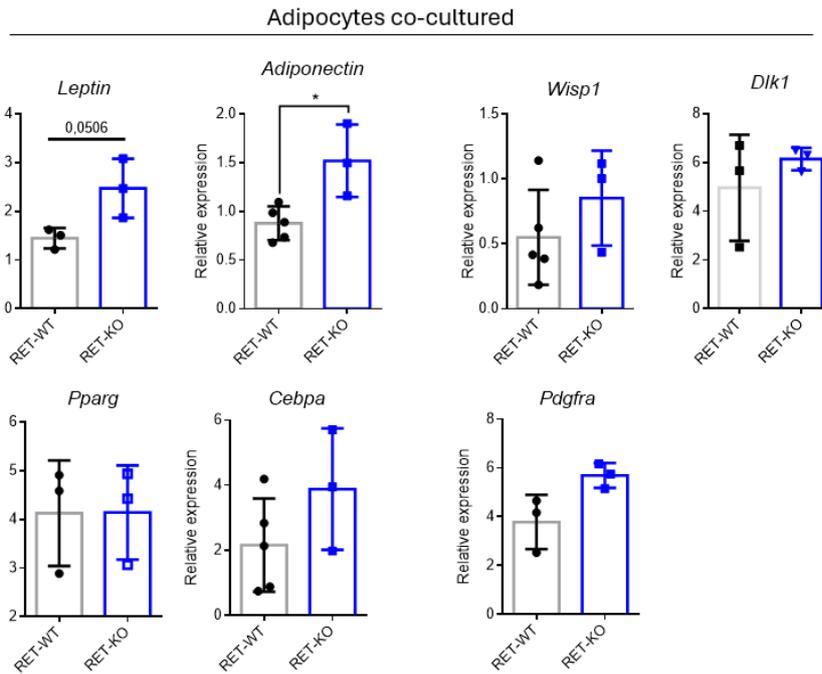


Figura R19. Expresión de marcadores de diferenciación de adipocitos en adipocitos maduros co-cultivados con células tumorales. La expresión de los marcadores de interés se midió por RT-qPCR sobre los cultivos de adipocitos co-cultivados con células tumorales EO771 RET-WT (n=5) o RET-KO (n=3). Se muestran los resultados como el promedio \pm sd. El análisis estadístico se realizó mediante t de *Student*. Se muestran los resultados de dos experimentos (N=2). Los valores de expresión de cada uno de los genes se relativizaron a la expresión de *Gapdh*.

Para la segunda condición, colocando PAs en el pocillo inferior, se midieron principalmente los niveles de los marcadores de esta población, como *Pdgfra*, *Dlk1*, *Cd24* e *Icam1*, y no observamos modificaciones significativas en los niveles de expresión de estos genes con el co-cultivo con las diferentes líneas tumorales RET-WT y RET-KO (**Figura R20**). Estos resultados también concuerdan con lo observado a nivel de expresión de RNA de marcadores en los experimentos *in vivo*, sin embargo los niveles proteicos de DLK1 no fueron analizados en este sistema.

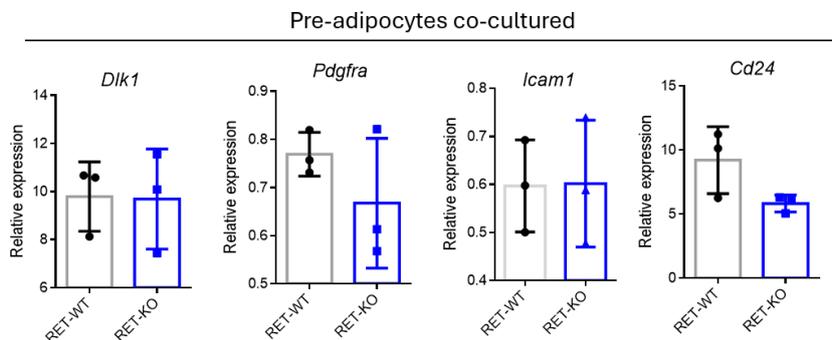


Figura R20. Expresión de marcadores de diferenciación de adipocitos en PA co-cultivados con células tumorales. La expresión de los marcadores de interés se midió por RT-qPCR en pre-adipocitos co-cultivados con células tumorales EO771 RET-WT (n=3) o RET-KO (n=3). Se muestran los resultados como el promedio \pm sd. El análisis estadístico se realizó mediante t de *Student*. Se muestran los resultados de dos experimentos (N=2). Los valores de expresión de cada uno de los genes se relativizaron a la expresión de *Gapdh*.

(B) Análisis sobre células tumorales en co-cultivo con células adiposas

Como se describió en la introducción de esta sección de la tesis, las células tumorales reprograman significativamente su metabolismo para impulsar el crecimiento y la supervivencia del tumor. Esta reprogramación, está regulada por la interacción con los componentes celulares del estroma, siendo los adipocitos los protagonistas en el caso de los tumores mamarios. Por ello, nos preguntamos si las interacciones que existen entre RET en la célula tumoral y las células del tejido adiposo pueden afectar el metabolismo energético de las células tumorales y/o su proliferación.

Llevamos a cabo experimentos de co-cultivo mediante insertos *transwell*, como se describió previamente, y luego las células tumorales se tripsinizaron y plaquearon en placas específicas para realizar análisis metabólicos en equipo *Seahorse*. En paralelo, células tumorales no co-cultivadas también se plaquearon a modo de control. Al día siguiente, se realizaron los cambios de medio pertinentes y se agregaron los reactivos necesarios para llevar a cabo análisis de respiración mitocondrial (*mitostress*) de modo de registrar las curvas de OCR a lo largo del tiempo (en estos experimentos no se estudió la capacidad glucolítica). Se calcularon y graficaron los parámetros de respiración basal, producción de ATP, pérdida de protones, respiración máxima y capacidad de reserva a partir de las curvas de OCR obtenidas.

En primer lugar, se observa que las células RET-WT tienen un mayor consumo de oxígeno que las RET-KO, lo que corresponde a un metabolismo celular más activo, como describimos previamente. Por otro lado, al analizar por separado las curvas RET-WT, se puede ver que estas células no modifican su consumo de oxígeno al ser co-cultivadas con las distintas células adiposas, mientras que sí lo hacen las RET-KO (**Figura R21A-B**), mostrando cambios significativos en el caso del co-cultivo con PA. Por lo tanto, la proximidad de células adiposas aumenta el consumo de oxígeno por parte de la célula tumoral solo en ausencia de RET. Esto significa que, si bien las células RET-KO son intrínsecamente menos activas metabólicamente que las RET-WT, las cuales se encuentran quizás en una capacidad máxima de respiración, la carencia de RET las habilita a aumentar su metabolismo en respuesta al ambiente, seguramente por una vía independiente de RET.

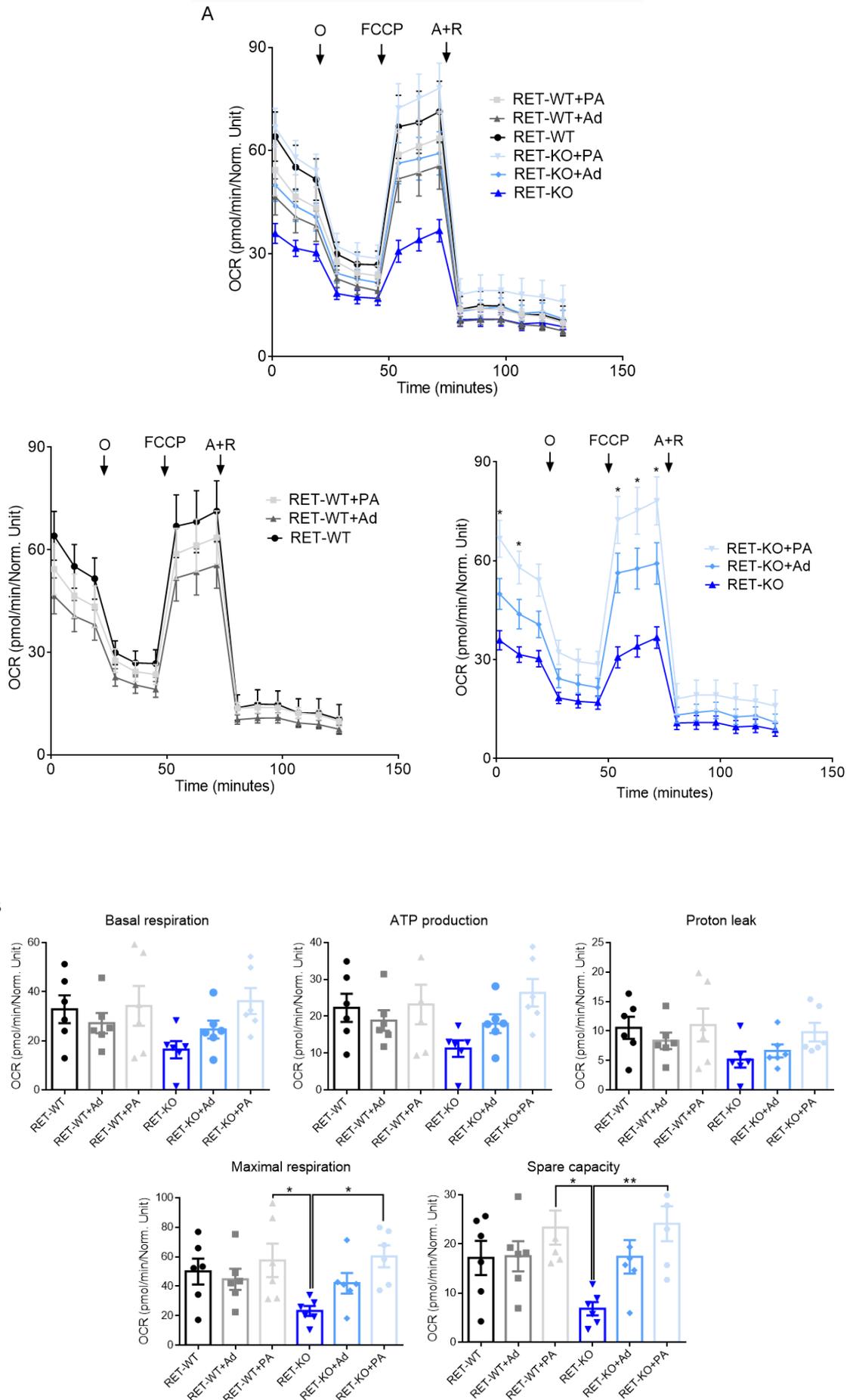


Figura R21. Las células RET-KO aumentan su metabolismo energético al co-cultivarlas con PA.

(A) Se muestra mediante las curvas de OCR la respuesta cinética de células EO771 RET-WT y RET-KO a oligomicina, FCCP y A+R (respiración mitocondrial), previamente co-cultivadas o no con pre-adipocitos (+PA) o adipocitos maduros (+Ad). Las curvas se contrastaron estadísticamente mediante test de *Student*, comparando la curva de las células co-cultivadas (+PA o +Ad) con la de las células sin co-cultivar, en cada punto temporal. Se muestran por separado las curvas de OCR de EO771 RET-WT y RET-KO. Cada tratamiento tuvo 6 réplicas (n=6), se muestran los resultados de un experimento (N=1). (B) A partir de las curvas de OCR, se calcularon los valores de respiración basal, producción de ATP, respiración máxima, fuga de protones y capacidad respiratoria de reserva. Estas cuantificaciones se evaluaron estadísticamente mediante *One Way ANOVA*.

A continuación, analizamos el impacto del co-cultivo en la proliferación de las células tumorales. Para ello, luego de realizarse el co-cultivo, las células tumorales se tripsinizaron y contaron en cámara de Neubauer. La cuantificación realizada indica que, mientras que los adipocitos maduros no tienen impacto en la proliferación de las células tumorales, las células RET-WT proliferaron significativamente más que las RET-KO al co-cultivarse con PA (**Figura R22**). Esto demuestra que los PA, y no así los adipocitos maduros, tienen un efecto proliferativo sobre las células tumorales solo en presencia del receptor RET. Estos resultados sugieren una interacción entre el PA y la célula tumoral que potencialmente favorecería al crecimiento tumoral.

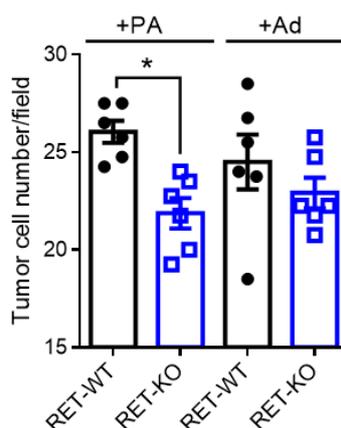


Figura R22. Los PA incrementan la proliferación tumoral en el sistema *transwell* de co-cultivo *in vitro* en forma dependiente de RET.

Se muestra el análisis de proliferación celular de células tumorales en el sistema de co-cultivo con adipocitos diferenciados o PAs. Células EO771 RET-WT o RET-KO se co-cultivaron durante 48 horas con pre-adipocitos (+PA) o adipocitos diferenciados (+Ad) en el sistema de *transwell*. Luego las células se tripsinizaron y contaron en cámara de Neubauer. Cada tratamiento tuvo 6 réplicas (n=6). Se presenta el número promedio de células contadas en cuatro cuadrantes para cada condición de un experimento (N=1). Los resultados se analizaron estadísticamente mediante *One Way ANOVA*.

La interacción entre los PA y la célula tumoral favorece la progresión del cáncer de mama en forma dependiente de RET

En base a este último resultado, nos propusimos evaluar si los PA tienen un efecto pro-tumoral *in vivo*. Para ello, utilizamos nuevamente nuestro modelo de alotrasplante de células EO771 RET-KO o RET-WT, pero en este caso, en un experimento de co-inyección con PA (**Figura R23A**). De este modo, las líneas celulares tumorales y de PA se crecieron en cultivo de manera independiente y el día de la inyección se prepararon las soluciones

de inyección en una proporción 1:1 de células tumorales y PA y se inyectaron en el *fat pad* de ratones hembra C57BL/6 (Xiong et al. 2017). Se generaron así 5 grupos: ratones inyectados sólo con las células tumorales RET-WT o RET-KO, ratones inyectados con la mezcla de células tumorales y PA (RET-WT+PA o RET-KO+PA) y ratones inyectados solo con PA. Como se describió previamente, se registró el tamaño tumoral periódicamente y al final del experimento se recolectaron muestras para su posterior análisis.

En primer lugar, como era de esperarse, los PA *per se* no fueron capaces de generar un tumor. El gráfico de crecimiento tumoral en función del tiempo indica que los ratones inyectados con la combinación RET-WT+PA tuvieron un tamaño tumoral significativamente mayor al del resto de las condiciones (**Figura R23B**). Dicho resultado en el tamaño tumoral es apoyado con el análisis del marcador de proliferación pS10H3 sobre cortes de tejido tumoral. Como esperábamos, los tumores RET-WT+PA presentaron un mayor número de células en proliferación (**Figura R23C**). Interesantemente, no se observó esta diferencia con las células RET-KO, es decir que, consistente con los hallazgos previos en el sistema de co-cultivo, la presencia de RET en el tumor es necesaria para que los PA promuevan un efecto proliferativo.

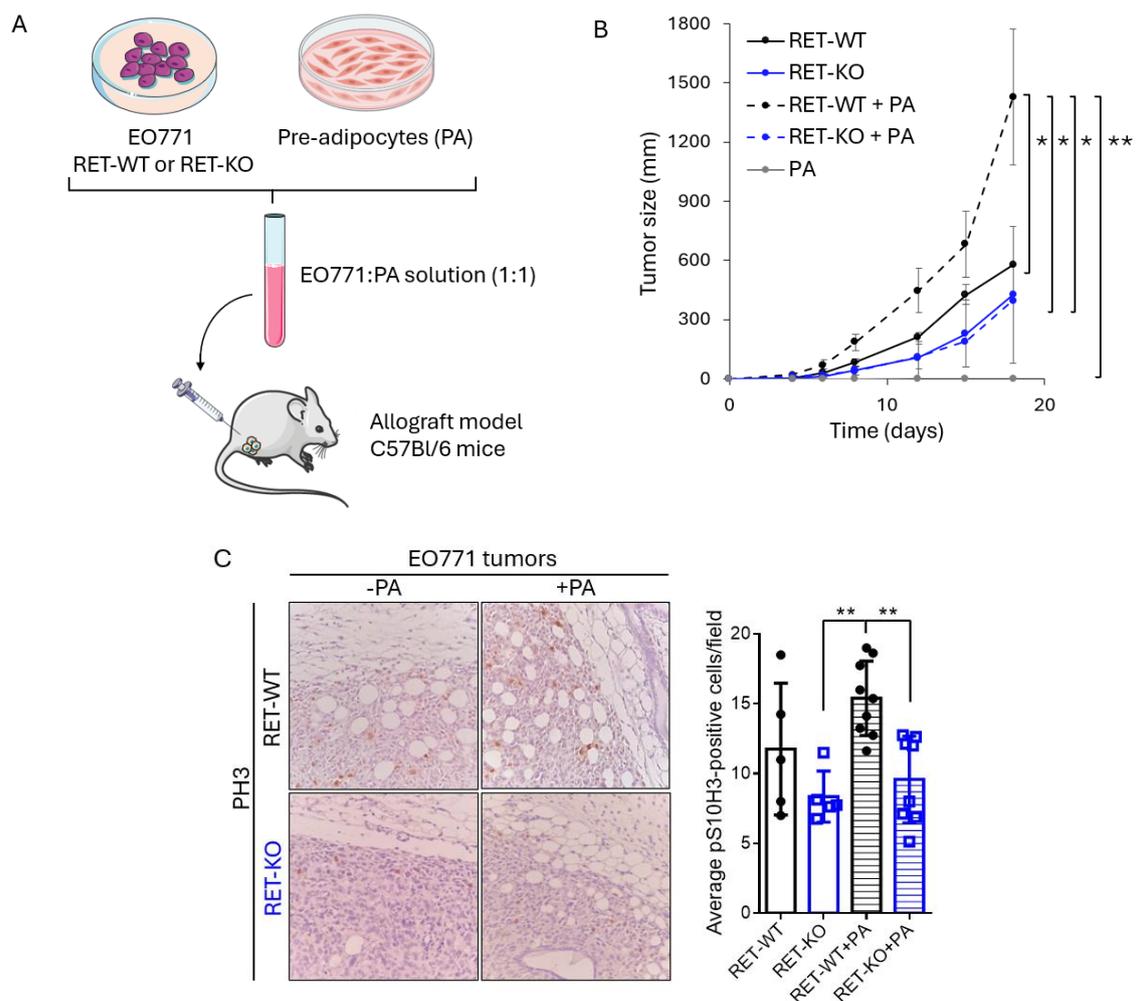


Figura R23. Los PA incrementan el crecimiento tumoral en el sistema de co-inyección *in vivo* en forma dependiente de RET. (A) Esquema del experimento de co-inyección *in vivo*. (B) Curva de crecimiento tumoral en función del tiempo de ratones C57BL/6 inyectados con células EO771 RET-WT o RET-KO (n=4) solas o en co-inyección con pre-adipocitos (PA) (RET-WT + PA o RET-KO + PA)(n=5); o bien solo inyectados con PA (n=3). Se muestra una curva representativa de dos experimentos independientes (N=2). Los valores del último punto de la curva se analizaron estadísticamente por *One Way ANOVA*. (C) Se muestran imágenes representativas de la IHC para pS10H3 sobre cortes de tejido tumoral (aumento: X400). Se muestra la cuantificación obtenida mediante el conteo de las células positivas por campo (X400) en 2 experimentos independientes (N=2). Los resultados se muestran como el promedio \pm sd. Los valores se analizaron estadísticamente mediante *One Way ANOVA*.

En esta segunda parte del trabajo de tesis (PARTE II) introducimos al receptor RET como un nuevo modulador de la interacción entre la célula tumoral y el tejido adiposo mamario que actúa en favor de la progresión tumoral. Los experimentos muestran que la presencia de RET en la célula tumoral correlaciona con un estado inmaduro del tejido adiposo mamario similar a los pre-adipocitos (PA); además, demostramos que los PA tienen un efecto pro-tumoral dependiente de RET.

En la última parte de esta tesis investigaremos cuáles son las moléculas que participan en la interacción entre ambos tipos celulares.

PARTE III

La señalización RET/PDGF-B como integradora
de la comunicación entre la célula tumoral y el
tejido adiposo mamario

Introducción – Parte III

Como se describió en los capítulos anteriores, la señalización de RET impacta en la remodelación del tejido adiposo circundante, tanto en el contexto de la glándula mamaria normal (Parte I), como durante el desarrollo de un tumor mamario (Parte II).

Identificar las moléculas involucradas en la comunicación entre ambos tejidos contribuirá al diseño de nuevas estrategias terapéuticas para pacientes con cáncer de mama RET+ que bloqueen la interacción de la célula tumoral con el microambiente. Esta búsqueda involucra el conocimiento tanto de los factores liberados a partir de la señalización de RET en el tumor que impactan en la madurez de los adipocitos y/o pre-adipocitos (PA) circundantes, como de los mediadores liberados en consecuencia por el componente adiposo que puedan impactar en la célula tumoral.

Vías de señalización relevantes en los adipocitos inmaduros y PA

⊗ PDGF/PDGFR

Al igual que RET, PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) es un RTK que se activa por la unión con alguno de sus ligandos, conocidos como factores derivados de plaquetas (PDGF), lo que induce la dimerización del receptor y su autofosforilación en los residuos tirosina. Existen dos clases de PDGFR, PDGFR α y PDGFR β , los cuales muestran patrones de autofosforilación ligeramente diferentes, que median el acoplamiento de proteínas efectoras facilitando vías de señalización superpuestas pero distintas. Estos receptores activan distintas vías mitogénicas relevantes en cáncer, como la de PI3K/Akt, mTOR y NF κ B, ERK y JNK (Zou et al. 2022), las cuales regulan la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis, y la migración celular (**Figura I11**).

En los PA, los estudios han demostrado que los PDGFs pueden ejercer tanto efectos mitogénicos, así como inhibitorios de su diferenciación hacia adipocitos maduros (Fitter et al. 2012). Existen distintas isoformas de los ligandos PDGF: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D, siendo PDGF-A y PDGF-B los ligandos más abundantes en los tejidos estromales. En cuanto a los receptores, los PDGFR se caracterizan por estar presentes en todas las poblaciones celulares de origen mesenquimal (Turley, Cremasco, and Astarita 2015). Particularmente en la subpoblación de células progenitoras adiposas (ASCs y PAs), si bien ambos receptores, PDGFR α y PDGFR β , se expresan (Gao et al. 2018; Cattaneo et al. 2020; C. Sun et al. 2020); PDGFR α presenta mayores niveles en esta población (Cattaneo et al. 2020). Además, PDGFR β es el marcador celular principal de los pericitos, las células que recubren los vasos sanguíneos (Armulik, Genové, and Betsholtz 2011), por lo que se lo asocia más con esta población de células que con las progenitoras adiposas. PDGF-A tiene una mayor afinidad por PDGFR α , mientras que PDGF-B puede unirse a ambos receptores, pero su interacción de preferencia es con PDGFR β (**Figura I11**).

Con el fin de su implementación en la clínica, para bloquear la señalización de receptores RTKs como PDGFR o RET, se han desarrollado varios inhibidores selectivos (Y. Sun et al. 2022). El uso de imatinib, que es un potente inhibidor de uso clínico de la actividad tirosina quinasa tanto de PDGFR α como PDGFR β , en cultivos de PAs ha mostrado promover la diferenciación de los mismos, lo que confirma que los PDGF son ligandos inhibitorios de la

adipogénesis (Fitter et al. 2012; Rivera-Gonzalez et al. 2016).

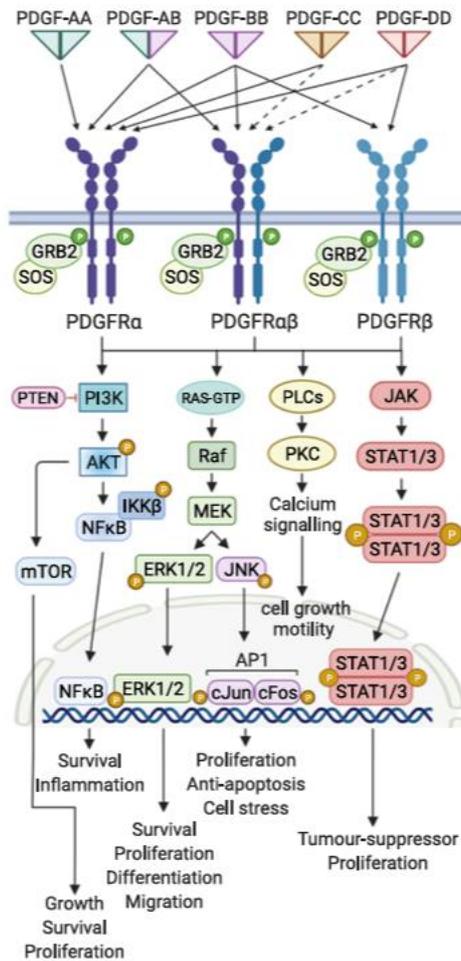


Figura I11. Vías de señalización intracelular de la vía de PDGF/PDGFR. Los dímeros de PDGF se unen a subunidades de PDGFR y las activan con diferentes afinidades. PDGF-AA y PDGF-CC activan específicamente a los heterodímeros de PDGFR α , PDGF-AB puede activar tanto a PDGFR α como PDGFR β , PDGF-BB y PDGF-DD pueden activar los tres subtipos de receptores. La unión del ligando induce la dimerización del receptor y su autofosforilación en los residuos tirosina de la quinasa. PDGFR α y PDGFR β muestran patrones de autofosforilación ligeramente diferentes, que median el acoplamiento de proteínas efectoras facilitando vías de señalización superpuestas pero distintas. Todas las proteínas efectoras que se unen a PDGFR tienen dominios de homología Src-2 (SH2), que son esenciales para la unión a los sitios de autofosforilación de PDGFR. La activación del receptor conduce a distintas cascadas de señalización involucradas en vías mitogénicas. Modificado de Li, et al, 2022.

DLK1

DLK1 es una proteína reportada como regulador negativo de la adipogénesis (Hudak and Sul 2013). Se ha demostrado que la presencia de DLK1 inhibe la diferenciación de PA a adipocitos maduros, manteniéndolos en un estado inmaduro. DLK1 es una proteína transmembrana expresada de manera abundante en los PA y su expresión disminuye abruptamente durante la diferenciación de los adipocitos (Smas and Sul 1993). Si bien su regulación no ha sido estudiada en profundidad, debido a que la expresión de DLK1 está

siempre asociada al mantenimiento del fenotipo precursor (Smas, Chen, and Sul 1997; Smas, Green, and Sul 1994; Smas and Sul 1993), se la utiliza como marcador exclusivo de esta población. Es el único gen conocido cuya expresión se encuentra regulada negativamente por completo (se pierde su detección) durante la diferenciación de los adipocitos (Smas and Sul 1993; Smas et al. 1999; Sul 2009).

La proteína de DLK1 se presenta en dos formas principales: una forma de membrana (DLK1_M) y una forma soluble (DLK1_S), generada a partir del clivaje extracelular de la proteína transmembrana mediante la proteasa TACE, conocida también como Adam17 (Y. Wang and Sul 2006). Esta enzima se expresa en PAs y su actividad puede ser modulada por distintas vías; ERK, por ejemplo, promueve la activación de la proteasa a través de su fosforilación (Soond et al. 2005). La forma soluble de DLK1 (DLK1_S) es la responsable de la función inhibitoria sobre la adipogénesis (Y. Wang and Sul 2006; Mei et al. 2002; Smas, Chen, and Sul 1997), ya que se ha reportado que este efecto se pierde si se elimina el sitio de clivaje de la proteína (Mei et al. 2002). Por otro lado, la forma de membrana de DLK1 (DLK1_M) inhibe la proliferación de los PA (Mortensen et al. 2012; Traustadottir et al. 2013).

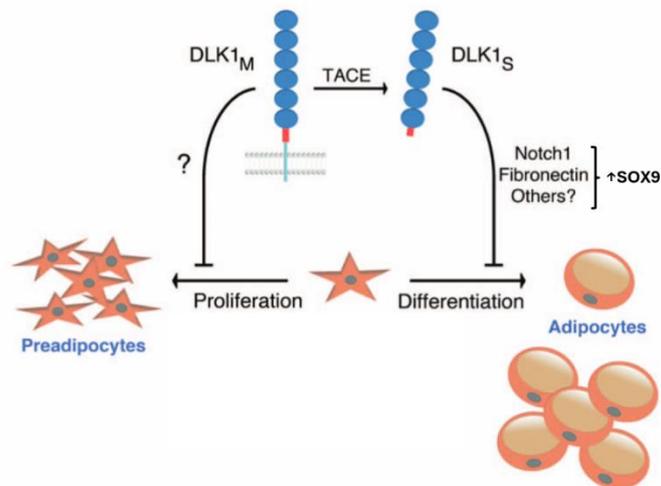


Figura I12. Señalización y regulación de DLK1. Esquema de la función dual de DLK1 en el tejido adiposo. Mientras que la forma soluble de DLK1 (DLK1_S) inhibe la diferenciación de los preadipocitos, su proliferación es reprimida por la DLK1 unida a la membrana (DLK1_M). El clivaje del DLK1 en la membrana es mediado por la proteasa TACE extracelularmente. DLK1_S es un ligando que se ha reportado puede activar señalizaciones a través de Notch1, fibronectina, y otros receptores, y actuar a través de SOX9, reprimiendo la transcripción de genes necesarios para la adipogénesis. Modificado de (Traustadottir et al. 2013).

DLK1_S puede interactuar con el receptor Notch, el cual se ha demostrado que inhibe la adipogénesis (Osathanon et al. 2012). DLK1 puede activar la señalización de Notch de manera indirecta, modulando la disponibilidad de los verdaderos ligandos de Notch y, por lo tanto, afectando la diferenciación celular, incluida la adipogénesis (Baladrón et al. 2005; Nueda et al. 2007). Otros estudios han sugerido que DLK1 puede unirse también a fibronectina (Y. Wang et al. 2010), una glicoproteína de la matriz extracelular, y esta interacción podría influir en la señalización y la adhesión celular, afectando los procesos de diferenciación celular como la adipogénesis. Independientemente de cuál receptor estimule, se ha reportado que la inhibición que DLK1 ejerce sobre la adipogénesis es

mediante la regulación de la expresión del factor de transcripción SOX9 (Y. Wang and Sul 2009), el cual suprime la expresión de *Cebpb* y *Cebpd* uniéndose directamente a sus sitios reguladores en las regiones promotoras (Y. Wang and Sul 2009).

Además de su efecto inhibitorio de la adipogénesis, DLK1 desempeña un papel importante en la regulación de los *pools* de células madre tanto en la diferenciación tisular durante el desarrollo normal de diferentes órganos (en cerebro, músculos e hígado), como en neoplasias (Elisa Stellaria Grassi and Pietras 2022; Pittaway et al. 2021). Algunos reportes indican que DLK1 regula la plasticidad de las células tumorales hacia un fenotipo menos diferenciado (Y. Kim et al. 2009), similar a las células madre, lo cual podría conferir una mayor agresividad y resistencia terapéutica. Postulándolo como un marcador de células madre tumorales, DLK1 se encontró expresado con una alta frecuencia en varios tipos de tumor como glioma (Yin et al. 2006; Elisa Stellaria Grassi, Pantazopoulou, and Pietras 2020), hepatoblastoma (López-Terrada et al. 2009), cáncer de pulmón (L. Li et al. 2014) y también en cáncer de mama (Nueda et al. 2017; Pittaway et al. 2021). Si bien se desconoce el mecanismo de acción, se ha sugerido que las funciones oncogénicas de DLK1 dependen mayormente de la forma DLK1_s (Elisa S. Grassi et al. 2020; Elisa Stellaria Grassi, Pantazopoulou, and Pietras 2020).

Resultados – Parte III

Efecto del secretoma de los PA sobre las células tumorales

En la sección anterior de la tesis determinamos que los PA mamarios tienen un efecto promotor sobre la progresión tumoral en presencia de RET. Dado que la activación de RET induce proliferación celular y otros mecanismos que son funcionales al crecimiento del tumor, nos preguntamos si el efecto pro-tumoral de los PA ocurre a través de la activación de este receptor. Para ello, cosechamos CM de cultivos de PA y lo utilizamos para estimular células tumorales RET+. En estos experimentos de señalización utilizamos las células MCF7, ya que éstas poseen mayores niveles de RET en comparación a la línea EO771 y responden de forma más robusta a la estimulación por GDNF (Boulay et al. 2008; Gattelli et al. 2013; I. Plaza-Menacho et al. 2010). Encontramos que el CM proveniente de los PA es capaz de inducir la fosforilación/activación de RET, a niveles comparables a los observados con la estimulación de GDNF recombinante (**Figura R24A-B**), lo que indicaría que estas células son capaces de producir alguno de los ligandos alternativos de RET. Evaluamos también la presencia de RET en los PA mediante ensayos de WB, y determinamos que RET no se expresa, al menos en esta línea de PA mamarios, por lo que descartamos que la secreción de ligandos de RET tenga un efecto autocrino sobre estas células en nuestro sistema (**Figura R24C**).

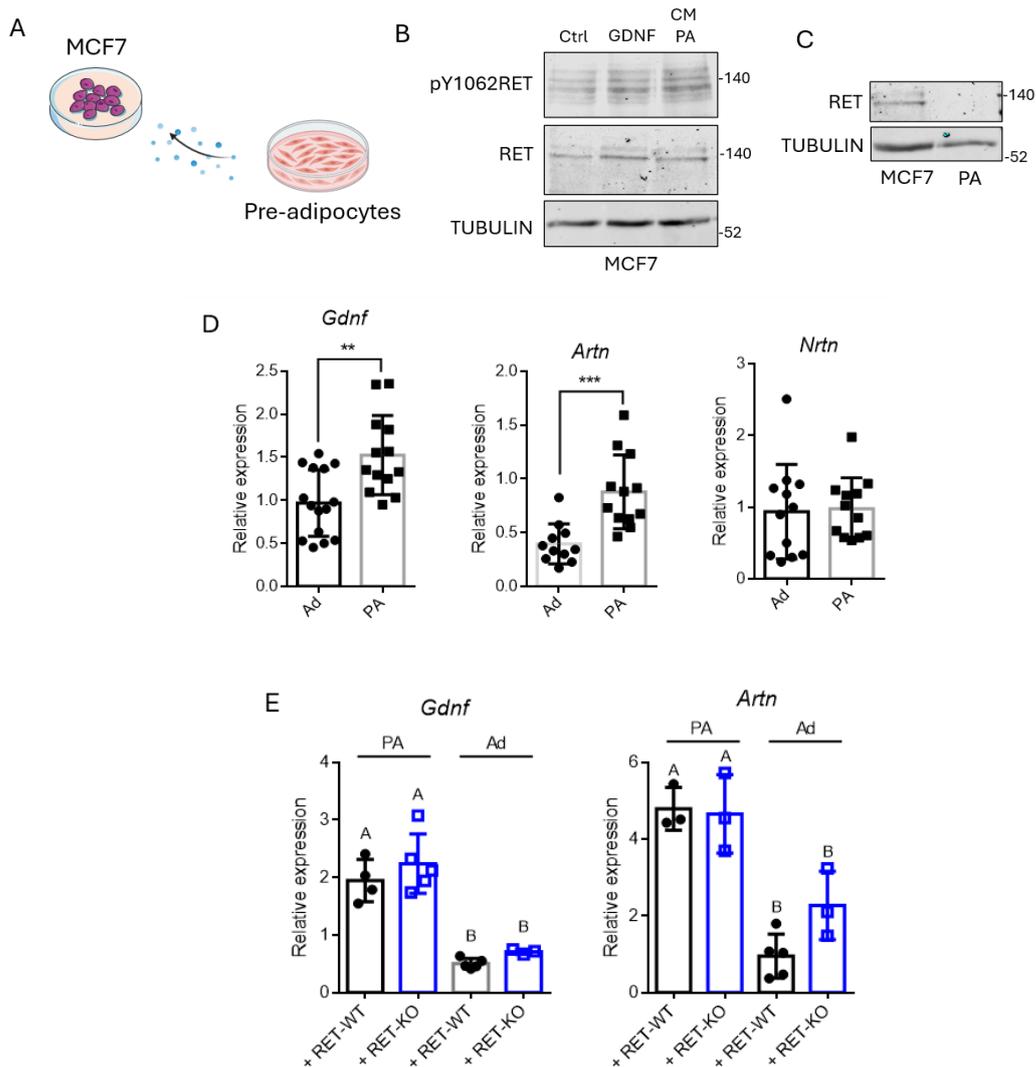


Figura R24. Los pre-adipocitos producen altos niveles de los ligandos de RET. (A) Células MCF7 se hambreadaron durante 6 horas y se estimularon o no (Ctrl) con GDNF (10 ng/ul) (GDNF) o con el medio condicionado proveniente de pre-adipocitos (PA CM) durante 15 minutos. (B) Luego de la estimulación, se obtuvieron los lisados proteicos y se realizaron ensayos WB para las proteínas indicadas. (C) Análisis de la expresión de RET en PA mediante ensayos de WB; lisados de MCF7 se utilizaron como control positivo. (D) Expresión de ligandos de RET mediante análisis de RT-qPCR realizados con *primers* específicos en muestras de RNA total de cultivos de pre-adipocitos (PA) y adipocitos maduros blancos (Ad). Los resultados se evaluaron estadísticamente para test t de *Student*. Los valores de expresión de cada uno de los genes se relativizaron a la expresión de *Gapdh*. (E) Expresión de ligandos de RET mediante análisis de RT-qPCR realizados con *primers* específicos en muestras de RNA total de cultivos de pre-adipocitos (PA) y adipocitos maduros blancos (Ad) co-cultivados con células tumorales EO771 RET-WT o RET-KO. Los resultados se evaluaron mediante *One Way ANOVA*. Se muestran los resultados de dos experimentos (N=2). Los valores de expresión de cada uno de los genes se relativizaron a la expresión de *Gapdh*.

Decidimos estudiar en profundidad si los PA y/o los adipocitos maduros, son capaces de producir ligandos de RET. Para ello, analizamos la expresión de los ligandos de RET en cultivos de PA o adipocitos maduros blancos, y en respuesta al co-cultivo con células tumorales que expresan o no RET implementando el sistema de *transwell*. Demostramos que los PA expresan niveles significativamente mayores de los ligandos *Gdnf* y *Artn* que los adipocitos maduros (**Figura R24D**). Por otro lado, mientras que *Nrtn* no presentó diferencias, *Pspn* no pudo ser detectado. Interesantemente, la expresión de estos genes no se modifica por el co-cultivo con las células RET-WT o RET-KO, es decir que la mayor o menor expresión de cada uno de ellos depende de características intrínsecas de los niveles de diferenciación de las células adiposas (**Figura R24E**).

Así, para un tumor que expresa RET, es significativa la presencia de PAs en el microambiente tumoral, ya que los PAs favorecerían el crecimiento del tumor proveyendo de ligandos que activan la señalización de RET, aumentando la proliferación celular. De esta manera, en el TAAT de un tumor que expresa RET se encuentran disminuidos los factores que promueven la adipogénesis, como PPAR γ y CEBP α , manteniendo así un tejido adiposo mas indiferenciado que favorecería al tumor.

En la primera parte de esta tesis (Parte I) nuestros resultados previos verificaron la presencia de ligandos de RET en el tejido mamario glandular murino (Vallone et al. 2022). Seguidamente, nos preguntamos si los ligandos de RET son más abundantes en la periferia tumoral de los tumores RET+ en los modelos *in vivo*. Al medir los niveles de expresión de los ligandos de RET en el tejido adyacente observamos que los mismos se encuentran presentes en el tejido peri-tumoral y que presentan perfiles heterogéneos de expresión. Tanto *Gdnf* como *Artn*, los ligandos expresados por los PA, se encuentran en altos niveles en el TAAT de los tumores RET-WT, siendo esta expresión disminuida significativamente en el tejido adyacente de los tumores RET-KO (**Figura R25**). Nuevamente, el RNA mensajero de *Pspn* no fue detectado. *Nrtn*, por último, si bien se encuentra presente en el AT control, se encuentra disminuido en el tejido peri-tumoral y no presenta diferencias entre el tejido RET-WT y RET-KO (**Figura R25**).

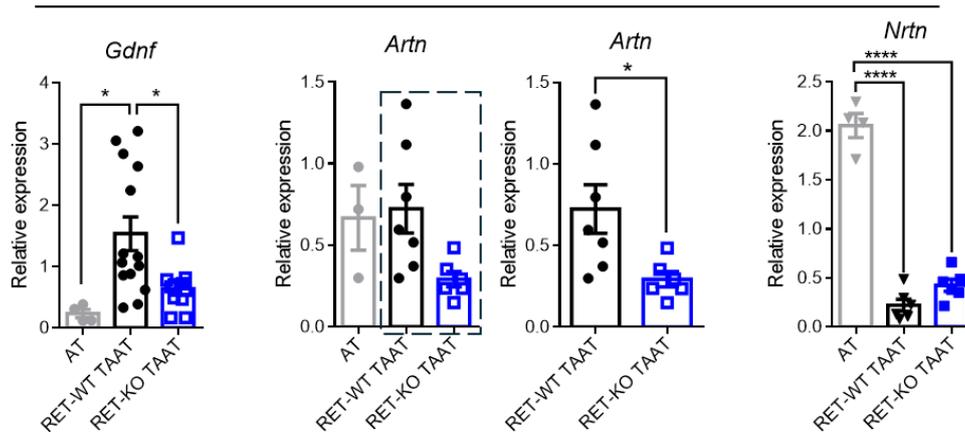


Figura R25. El TAAT de tumores que expresan RET presenta altos niveles de los ligandos de RET. Análisis de la expresión de los ligandos de RET fueron realizados por mediciones de RT-qPCR en el tejido adiposo adyacente a tumores (TAAT) RET-WT o RET-KO, o en tejido adiposo subcutáneo de la mama contralateral (AT) como control. Se muestran los resultados como el promedio \pm sd. El análisis estadístico se realizó mediante *One Way ANOVA* y, para *Artn*, se utilizó el test t de *Student* para comparar los tratamientos RET-WT CM y RET-KO CM y evaluar independientemente esta hipótesis. Se muestran las cuantificaciones de 2 experimentos independientes (N=2).

Hasta aquí identificamos a los ligandos de RET como mediadores que pueden ser producidos por las células adiposas inmaduras de tipo PA e impactar sobre la célula tumoral RET+ favoreciendo la proliferación y el crecimiento tumoral.

Búsqueda de mediadores del secretoma tumoral dependiente de RET que impacten sobre las células adiposas

Para identificar nuevas posibles moléculas candidatas que medien el efecto que produce RET desde la célula tumoral sobre el tejido adiposo, retomamos el uso del modelo transgénico *Ret/MTB*. Analizamos los datos de un RNA-seq realizado sobre tejido de glándulas mamarias hiperplásicas de hembras bitransgénicas *Ret/MTB* generadas por inducción de sobre-expresión de RET en el epitelio mamario. Se utilizaron glándulas mamarias de hembras simple transgénicas (*MTB/-*) que no presentan modificaciones como grupo control (Gattelli et al. 2018) (**Figura R26A**). Todos los animales estuvieron bajo inducción con DOX durante 2 meses. Como se describió antes, estas hiperplasias poseen aberraciones tanto en el epitelio mamario como en el tejido adiposo circundante. Es importante mencionar que en el procesamiento de estos tejidos no se realizó una separación de cada tipo celular, es decir, que el patrón de expresión génica que se observa corresponde a la sumatoria del tejido epitelial (hiperplásico o normal) y del estroma circundante de la glándula.

Se llevó a cabo el análisis generando primero un gráfico de tipo *volcano plot* utilizando los valores *Differential Expression* (DESeq2), el cual ilustra los genes expresados diferencialmente entre el tejido glandular control y el que sobre-expresa RET, incluyendo

los genes regulados positiva (*Up*) y negativamente (*Down*). Los umbrales de significancia se establecieron en $p < 0,01$ y $\log_2\text{FoldChange} \pm 1$ (**Figura R26B**).

Dentro de los genes que presentaron diferencias significativas, opuesto a lo que esperábamos, no se encuentran *Up*-regulados genes de citoquinas inflamatorias inducidas por RET, como por ejemplo *IL6*. Sin embargo, se realizaron búsquedas bibliográficas y observamos que varios de los genes cuya expresión se modificó significativamente se encuentran enriquecidos en adipocitos de tipo *brown*, como *Ucp2* (Ricquier 1999) y *Cox6c* (C. Wang et al. 2022), o en adipocitos inmaduros tipo PA, como *Cebpd* (Hishida et al. 2009) y *Pdgfa* (Rivera-Gonzalez et al. 2016), el cual se indica en el gráfico, ambas moléculas involucradas en la regulación de la diferenciación del tejido adiposo (**Figura R26B**).

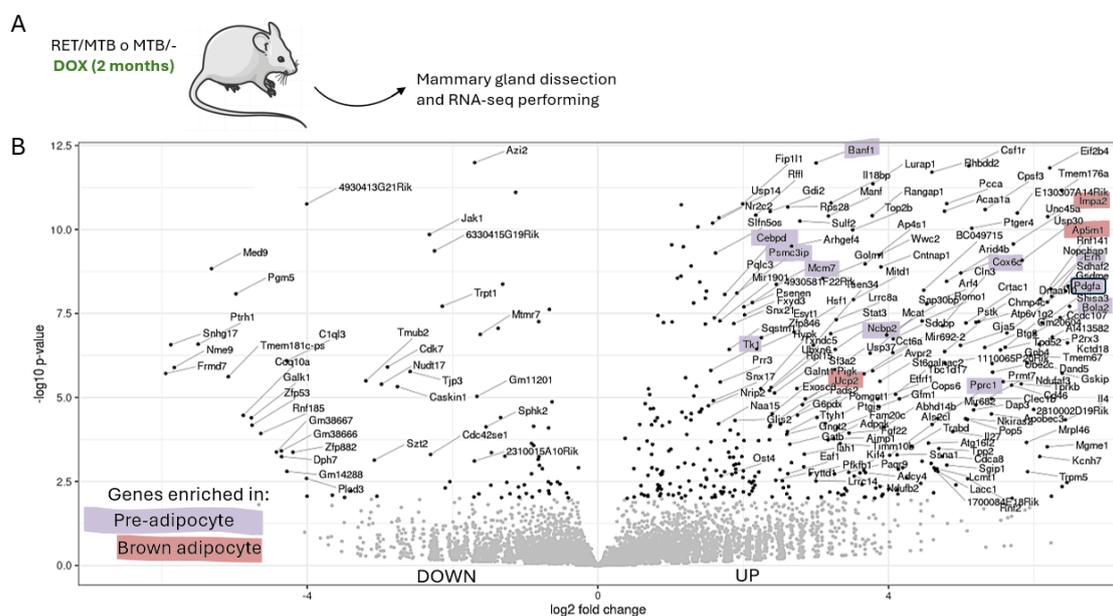


Figura R26. Las hiperplasias producidas la sobre-expresión de RET en el ratón transgénico Ret/MTB presentan genes enriquecidos en la regulación de la diferenciación de adipocitos. (A) Se llevó a cabo del análisis del RNA-seq realizado en glándulas control (MTB/- Dox, n=4) o con sobre-expresión de RET (Ret/MTB Dox, n=4). (B) Se muestra el *Volcano plot* generado con DESeq2 ilustra los genes expresados de manera diferencial entre el tejido mamario control y el que sobre-expresa RET. Los umbrales de significancia se establecieron en $p < 0,01$ y $\log_2\text{FoldChange} \pm 1$. Aquellos genes mencionados en la bibliografía por expresarse en pre-adipocitos o adipocitos maduros *brown*, se resaltan en colores.

Los ligandos PDGFs son factores solubles que representan potenciales buenos candidatos de interacción con el tejido adiposo inmaduro: por ejemplo, como se mencionó anteriormente, los PA expresan diferencialmente uno de sus receptores, PDGFR α , y esta vía de señalización ha sido descrita en los PA (Fitter et al. 2012). Seguidamente, la expresión de los ligandos PDGF-A y PDGF-B fue validada en tejido tumoral RET+ de los distintos modelos *in vivo* (**Figura R27A-C**). Para ello, utilizamos muestras de tejido tumoral de tumores generados por la sobre-expresión de RET en el modelo Ret/MTB (Gattelli et al. 2018) y de tumores generados en el modelo de alotrasplante de células EO771 RET-WT, utilizando como control de ausencia/reducción de expresión de RET los tumores Ret/MTB

luego de remoción de DOX y los tumores RET-KO, respectivamente. Se realizaron análisis de WB sobre los lisados proteicos de los tejidos tumorales con anticuerpos específicos para PDGF-B y PDGF-A. Se observó una reducción en los niveles PDGF-B en aquellos tumores que disminuyen su crecimiento como consecuencia del apagado/ausencia de la señalización de RET, mientras que PDGF-A se mantuvo sin cambios (**Figura R27A**). Adicionalmente, se analizaron cortes histológicos de estos tumores conteniendo también tejido adyacente al tumor. Se evaluó la presencia de PDGFR α por IHC observamos que este receptor se expresa solo en el tejido adyacente y no en el tumor (**Figura R27B**). En el modelo de alotrasplante, observamos una disminución significativa de PDGF-B, no así de PDGF-A, en los tumores RET-KO en comparación a los RET-WT, confirmando lo que observamos en el modelo transgénico (**Figura R27C**).

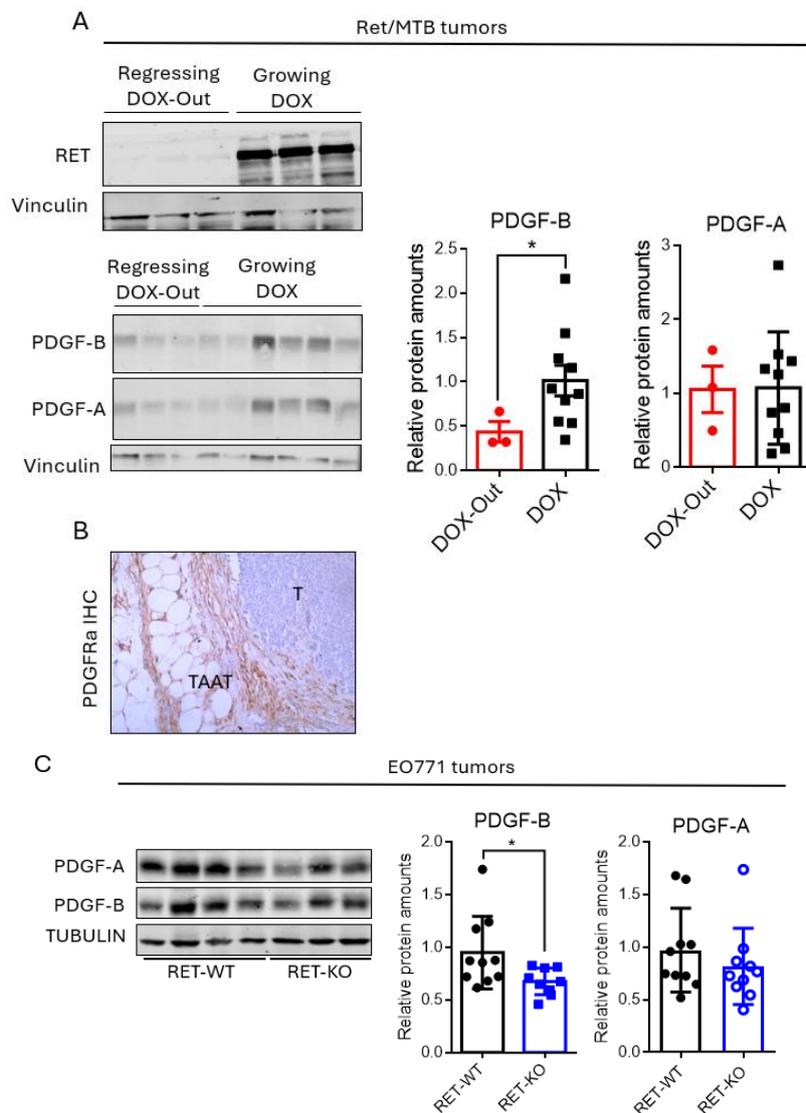


Figura R27. En modelos pre-clínicos, los tumores que expresan RET producen niveles elevados de PDGF-B. (A) Análisis de WB realizados para las proteínas indicadas a partir de secciones de tumores Ret/MTB creciendo bajo el tratamiento con DOX (2 g/l)(DOX, n=6) o regresionando luego de haber retirado la DOX por 72 horas (DOX-Out, n=3). La cuantificación de las bandas se realizó mediante ImageJ y se analizaron estadísticamente los valores mediante la prueba t de Student. Se muestra la cuantificación de 2 experimentos independientes (N=2). (B) Se muestra una imagen

representativa de la IHC realizada para PDGFR α en el tumor (T) y TAAT de un corte de tejido tumoral Ret/MTB (aumento: 40X). (C) Se realizaron ensayos de WB en los tumores generados a partir de la inyección de células EO771 RET-WT o RET-KO en animales C57Bl/6. La cuantificación de las bandas se realizó mediante ImageJ y se analizaron los valores estadísticamente mediante t de Student. Se muestra la cuantificación de 2 experimentos independientes (N=2).

A modo de conclusión, pudimos observar que PDGF-B se expresa diferencialmente de acuerdo a la presencia de RET en el tumor.

Validación de los hallazgos en muestras humanas: análisis de muestras de tumor y tejido adyacente al tumor en pacientes con cáncer de mama en el contexto de la expresión de RET

Realizamos un estudio de correlación entre los niveles de expresión de los ligandos PDGFs y RET en tejidos tumorales mamarios humanos y tejido adyacente al tumor en datos pertenecientes a TCGA. Observamos una correlación positiva entre la expresión de *RET* y *PDGFB* en tejido tumoral (**Tabla R2A**), confirmando lo hallado en el tejido tumoral murino de los modelos *in vivo*. Si estudiamos esta correlación en más detalle, discriminando entre los distintos subtipos tumorales, vemos que esta resulta significativa solo en los tumores luminales A, el subtipo con mayor expresión de *RET* (**Tabla R2B**).

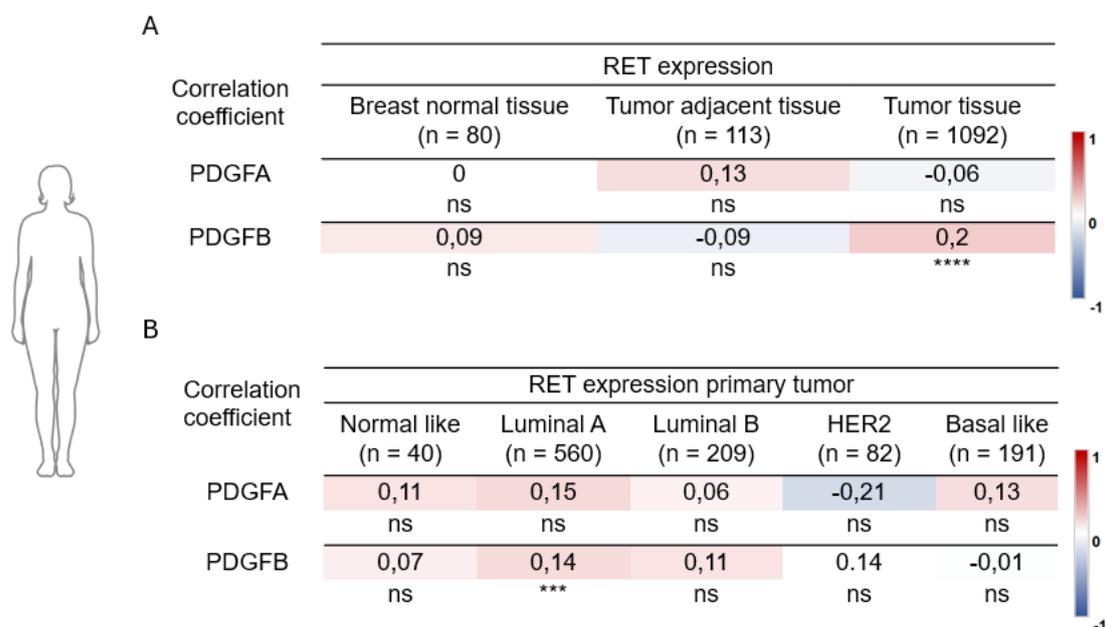


Tabla R2. La expresión de *RET* correlaciona positivamente con *PDGFB* en tumores de mama humanos. (A) Correlación entre la expresión de RET y ligandos PDGF en tejido mamario normal, tejido adyacente al tumor y tejido tumoral. El análisis se evaluó estadísticamente mediante test de Spearman. ns: no significant, *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001. (B) Correlación de la expresión de RET y PDGFs según la clasificación molecular de los tumores de las cohortes TCGA (Normal Like n=40, Luminal A n=560, Luminal B n=209, Her2 n=82 y Basal Like n=191). El análisis se evaluó estadísticamente mediante test de Spearman. ns: no significant, *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.

Nos preguntamos, entonces, si PDGF-B puede ser un factor liberado por las células tumorales mamarias en respuesta a la activación de la señalización de RET. Para ello, cultivamos células tumorales humanas, MCF7 y T47D, otra línea con alta expresión de RET

(Gattelli et al. 2013), y las estimulamos con el ligando de RET (GDNF) en ausencia (DMSO) o presencia de un inhibidor selectivo de la actividad de RET, BLU-667 (BLU). Para las T47D, se agregó adicionalmente GFR α 1, ya que estas células no expresan el co-receptor y es necesario que ambos componentes (ligando y co-receptor) estén presentes para que se active RET (Gattelli et al. 2013). Luego de 24 horas, se extrajeron los lisados proteicos y se llevaron a cabo ensayos de WB con anticuerpos específicos.

Los resultados indican que la activación de RET por GDNF induce la producción de PDGF-B (**Figura R28A**), la cual disminuye en presencia del inhibidor de RET, confirmando que este receptor debe activarse para que se desencadene la producción de PDGF-B. Este resultado fue confirmado en células T47D (**Figura R28B**). Se muestra, a modo de control, que la fosforilación de RET aumenta con el agregado de GDNF.

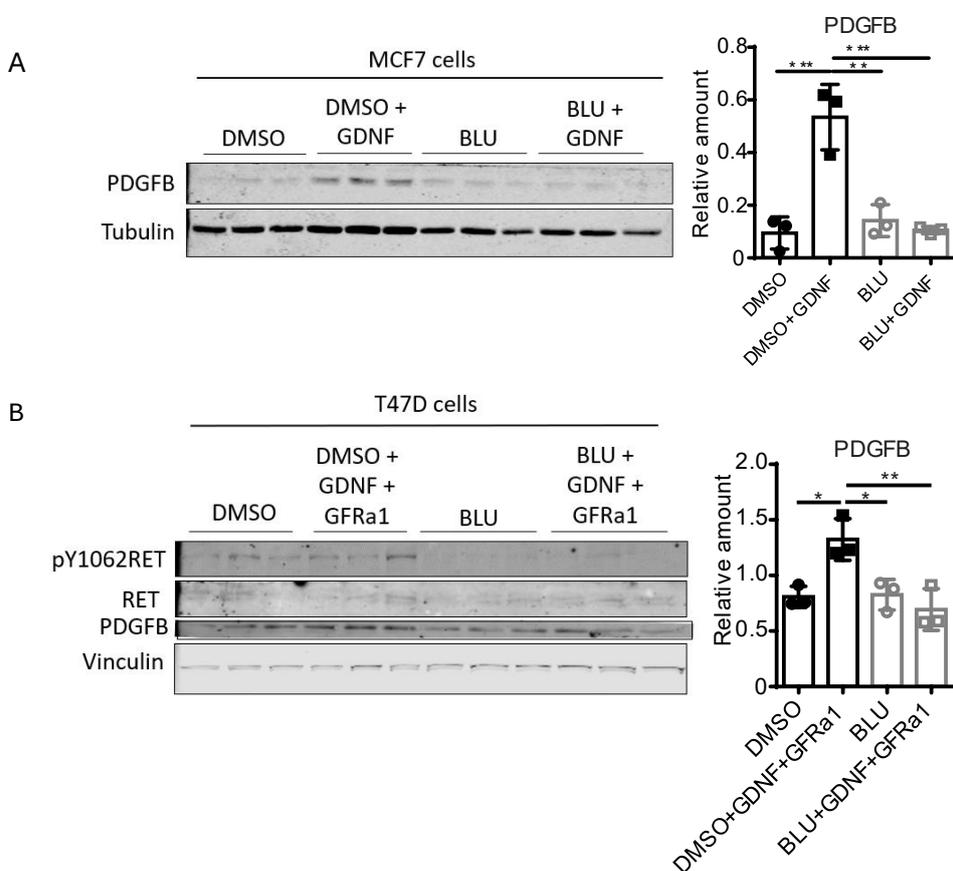


Figura R28. La activación de RET promueve la producción de PDGF-B en células de cáncer de mama. Células de cáncer de mama humano (A) MCF7 (N=2) y (B) T47D (N=1) se trataron con el ligando de RET (GDNF 25 ng/ul) o con el ligando y el co-receptor en el caso de T47D (GDNF+GFR α 1 100 ng/ul) en presencia del inhibidor de RET (BLU-667 2000 nM) o DMSO como control. El análisis de WB se llevó a cabo utilizando anticuerpos específicos. Se utilizó ImageJ para cuantificar las bandas. Los resultados se muestran como la media \pm sd. Los p valores se calcularon mediante *One Way ANOVA*.

Efecto del secretoma dependiente de la expresión/activación de RET en las células tumorales sobre los PA

Sabiendo que la activación de RET desencadena la producción de PDGF-B, nos preguntamos si este ligando es liberado por las células tumorales al medio extracelular. Para ello, quisimos evaluar si el PDGF-B producido por las células tumorales puede activar la vía de señalización correspondiente en PA. Para ello, cultivos de PA se estimularon con los CM cosechados de cultivos de las células EO771 RET-KO (RET-KO CM) o RET-WT (RET-WT CM) (**Figura R29A**). Se utilizó como control positivo de la estimulación el tratamiento con PDGF-BB recombinante. Evaluamos la fosforilación de ERK, como un factor río abajo de la señalización de PDGFR α , observamos que solo los CM provenientes de las células que expresan RET son capaces de inducir la activación de esta quinasa (**Figura R29B**).

Seguidamente, decidimos evaluar el potencial impacto del CM proveniente de células tumorales RET-WT o RET-KO en la proliferación de PAs en cultivo. Para ello, tratamos cultivos de PAs con CM provenientes de células EO771 RET-KO o RET-WT durante 48 horas y, transcurrido ese tiempo, estudiamos la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS. Observamos que, por un lado, los CM tumorales aumentan significativamente la proliferación de los PA (**Figura R29C**), lo cual es un resultado esperado ya que las células tumorales producen mitógenos y factores de crecimiento que disparan vías proliferativas (Goustin et al. 1986). Por otro lado, no observamos diferencias significativas en la viabilidad celular comparando los tratamientos realizados con los CM de células con y sin expresión de RET (**Figura R29C**), sugiriendo que la señalización del RET tumoral no impactaría en la capacidad de proliferación de los PA.

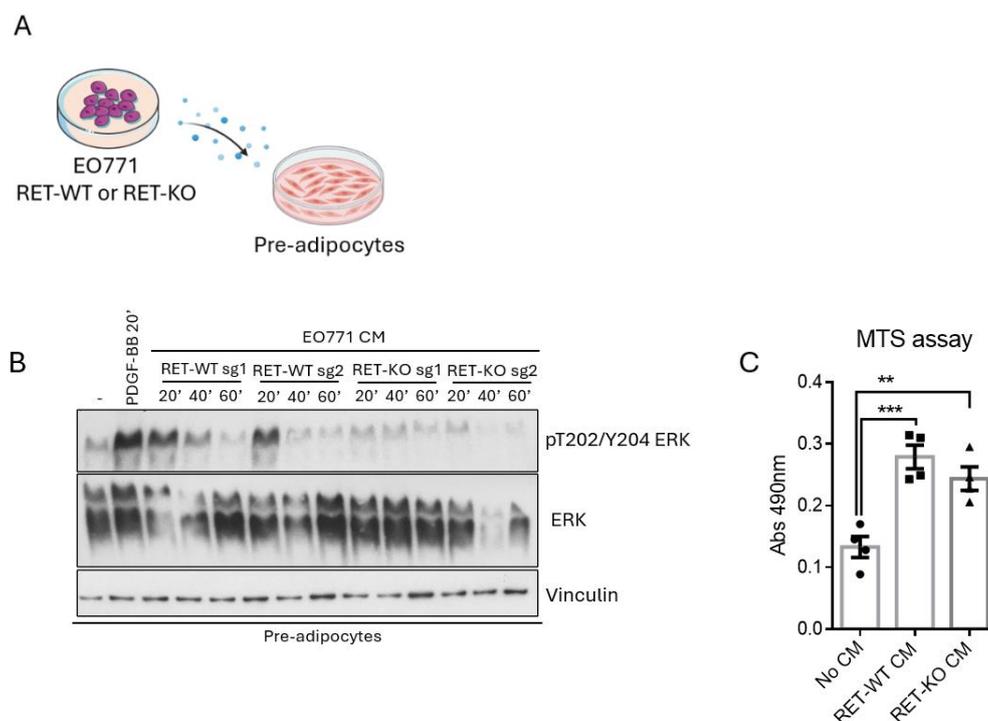


Figura R29. El secretoma mediado por expresión de RET en la célula tumoral modifica la señalización en los PA. (A) Esquema general del experimento. (B) Pre-adipocitos (PA) se hambreadon y trataron durante 20 minutos con PDGF-BB recombinante (100 ng/ul) o medio condicionado de células EO771 RET-WT (RET-WT CM) o RET-KO (RET-KO CM) durante distintos tiempos (20, 40 y 60 minutos). Posteriormente, se realizó un análisis de WB sobre los lisados

proteicos con los anticuerpos indicados (N=1). (C) Pre-adipocitos (PA) se plaquearon en una placa de 96 pocillos y se estimularon o no (No CM) con medios condicionados provenientes de células tumorales RET-WT o RET-KO durante 48 horas. Luego, se estudió la viabilidad celular mediante ensayo de MTS y posterior medición de absorbancia a 490nm. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante *One Way ANOVA*. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes realizados (N=3).

La señalización de RET/PDGF-B en la célula tumoral mamaria impacta en los PA perpetuando su estado inmaduro

Quisimos evaluar la activación de PDGFR α en los PA por parte del secretoma de las células tumorales. Para ello, cultivos celulares de PA fueron tratados con CM provenientes de cultivos de células MCF7 tratadas o no con GDNF en presencia de BLU-677 o DMSO como control (**Figura R30A**). Se utilizó como control positivo de la estimulación el tratamiento con PDGF-BB recombinante. Es importante mencionar que PDGF-B es un ligando capaz de unirse y activar tanto a PDGFR α como PDGFR β . Siendo PDGFR α un receptor relevante para el mantenimiento del fenotipo inmaduro en PAs, focalizamos nuestro análisis en esta isoforma.

Observamos que el CM proveniente de las células tumorales estimuladas con GDNF (DMSO+GDNF) induce la fosforilación de PDGFR α , al igual que la estimulación con PDGF-BB, demostrando la presencia del ligando en el medio condicionado y una activación eficiente sobre los PA. Este efecto es dependiente de la activación de RET, ya que el medio condicionado de células tratadas con el inhibidor de RET (BLU+GDNF) no logran niveles detectables de pY742PDGFR α (**Figura R30B**).

Como introdujimos previamente, el clivaje extracelular de DLK1 lo convierte en un ligando soluble (DLK1_s) capaz de disparar señalizaciones que llevan a la inhibición de la adipogénesis y el mantenimiento del estado indiferenciado en PAs, y además podría tener efectos pro-tumorales (Elisa S. Grassi et al. 2020; Elisa Stellaria Grassi, Pantazopoulou, and Pietras 2020). Reportes indican que la activación de PDGFR induce, vía activación de ERK, la activación de una proteasa extracelular, Adam17, que cliva proteínas de membrana de la familia de DLK1 (Mendelson et al. 2010). En base a esta información, decimos estudiar si el secretoma inducido por la señalización de RET en la célula tumoral afecta el clivaje específico de DLK1, vía activación de PDGFR α , en PAs.

Para ello, tratamos cultivos de PA con los medios condicionados provenientes de las células MCF7, estimuladas o no (CTRL) con GDNF (GDNF), o alternativamente con PDGF-BB, como control positivo de activación de PDGFR. Previo a dicha estimulación, los PAs se trataron previamente o no con el inhibidor selectivo de PDGFR (imatinib) (**Figura R30C**). Luego de los tratamientos, se cosecharon tanto las células como el medio de cultivo para realizar ensayos de WB. Los resultados del análisis indican, por un lado, que la fosforilación de PDGFR α en PAs disminuye si los mismos se tratan previamente con imatinib, confirmando que la vía de PDGFR se activa con el medio proveniente de una célula tumoral activada por RET, por lo cual se infiere que contiene el ligando PDGF (**Figura R30C**). Por otro lado, evaluamos la expresión de DLK1 en los PA (DLK1_M) y observamos que al estimularlas con PDGF-BB o con los medios condicionados, DLK1_M disminuye en

comparación a las células sin estimular (-), y que su expresión se reestablece en valores similares al control si las células se tratan previamente con imatinib (**Figura R30C**).

Para estudiar si DLK1 está siendo clivada extracelularmente, realizamos ensayos de WB sobre extractos proteicos concentrados del medio condicionado de los PA, luego de los 20 minutos de tratamiento. Observamos que la presencia de DLK1 en el medio extracelular (DLK1_s) aumenta considerablemente en las células tratadas con los CM, en comparación a las células no estimuladas. Además, si los PA se tratan previamente con imatinib, se pierde este efecto en DLK1 en el medio extracelular (**Figura R30D**). Este resultado indica que la presencia de DLK1_s se regula mediante la activación de la vía de PDGFR α , probablemente mediante la activación de una proteasa, y el secretoma de RET en la célula tumoral participa de este proceso.

Si bien no podemos verificar por qué proteasa específica está siendo realizado el clivaje, podemos confirmar que la regulación inducida por RET/PDGFB involucra la proteólisis de DLK1 ya que observamos un cambio en el peso molecular si se trata de la proteína en la célula (~55 KDa) o en el medio extracelular (~50 KDa). Estos pesos moleculares coinciden con lo reportado en la bibliografía (Y. Wang and Sul 2006).

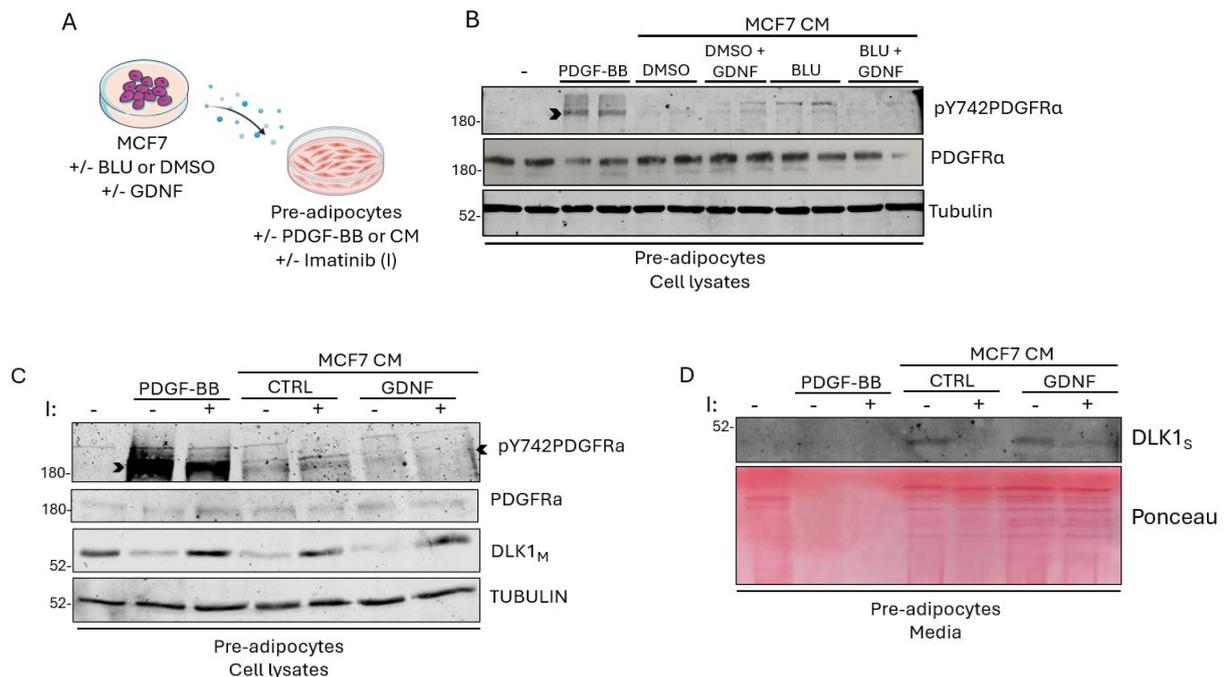


Figura R30. El secretoma mediado por la señalización de RET en la célula tumoral activa PDGFR α en los PA. (A) Esquema general de los experimentos. (B) Pre-adipocitos (PA) se trataron durante 20 minutos con PDGF-BB recombinante (100 ng/ul) o medio acondicionado (CM) de cultivos de células MCF7 tratadas previamente como se indica. El análisis de WB se realizó sobre lisados proteicos con los anticuerpos indicados. Se muestra un experimento representativo de 4 experimentos independientes realizados (N=4). (C) PA se trataron durante 20 minutos con PDGF-BB recombinante (100 ng/ul) o medio acondicionado (CM) de cultivos de células MCF7 tratadas previamente según se indica. Previo a la estimulación, los PA se trataron (I) o no con imatinib durante 3 horas. Se muestra el análisis de WB para detectar las proteínas indicadas. (D) Se cosecharon los medios condicionados de los PA tratados en las condiciones mencionadas en (C), se precipitaron y

concentraron las proteínas y se realizaron ensayos de WB con anticuerpos específicos. Se muestra la tinción de *Ponceau* revelando las proteínas totales en los medios extracelulares.

A modo de conclusión, la señalización de RET/PDGF-B en la célula tumoral mamaria impacta en los PA. Particularmente demostramos que PDGF-B es un factor secretado por la célula tumoral en respuesta a la señalización de RET, siendo éste capaz de modificar vías de señalización intracelulares y producir cambios fundamentales en los PA comprometiendo su estado inmaduro.

En esta última parte del trabajo de tesis, Parte III, focalizamos el estudio en dilucidar el mecanismo por el cual el RET tumoral interactúa con el tejido adiposo circundante, particularmente con los PA. Revelamos mediadores y postulamos un posible mecanismo de dicha interacción.

Discusión

En la primer parte de esta tesis (Parte I) demostramos que **la expresión aberrante de RET afecta la transición normal post-lactancia en la glándula mamaria, incrementando el potencial del desarrollo de cáncer.**

Investigamos la expresión de RET en la glándula mamaria centrandolo análisis en las transiciones fisiológicas de este órgano y observamos que **RET se expresa durante la lactancia y sus niveles se reducen abruptamente durante la transición a la involución.** Varios interrogantes quedan sin responder respecto de la regulación de la expresión de RET durante el desarrollo de la glándula mamaria normal. Sin embargo, mediante el ensayo de sellado unilateral de glándula, pudimos demostrar que la reducción de RET al inicio de la involución se debe a señales locales inducidas por el cese de la lactancia y no está involucrada la disminución sistémica de las hormonas lactogénicas circulantes (**Figura R4**). En condiciones patológicas, como los tumores mamarios, RET se encuentra sobre-expresado, lo cual es más pronunciado en tumores endócrino resistentes y en metástasis cerebrales (Varešlija et al. 2019). Si bien se ha descrito que algunos factores que participan en la fisiología normal de la glándula mamaria pueden estar involucrados, como la señalización mediada por ER (Morandi et al. 2013), la regulación de la expresión de RET parece ser más compleja, mediante la participación de otros factores como estímulos inflamatorios que median por ejemplo el transcurso de la involución (Esseghir et al. 2007; Gattelli et al. 2013). De hecho, el promotor de *RET* posee varios sitios teóricos de regulación no estudiados, incluyendo sitios de unión para varios STATs (Gattelli et al. 2020). Para comprender en profundidad dichos mecanismos, deben diseñarse estudios específicos sobre la regulación de RET en la célula epitelial mamaria tanto normal como tumoral.

Resulta interesante que el patrón de expresión de RET en la glándula mamaria es opuesto a la abundancia (Hanin and Ferguson-Smith 2023) y el tamaño (Zwick et al. 2018) de los adipocitos durante los distintos estadios, es decir que mientras que en la lactancia RET se encuentra elevado, la abundancia de adipocitos maduros es baja y, durante la involución, momento en el cual RET se encuentra disminuido, la abundancia de adipocitos aumenta significativamente. Basándonos en los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis, en donde afectando la expresión de RET tumoral en diversos sistemas, observamos modificaciones en los adipocitos adyacentes, especulamos que RET podría cumplir un rol fisiológico como regulador de la diferenciación del tejido adiposo: en lactancia RET podría estar manteniendo la población de pre-adipocitos residentes bloqueando su diferenciación para luego al disminuir su señalización en la etapa siguiente de involución, liberar este bloqueo permitiendo la repoblación por parte de los adipocitos; pero está hipótesis debe ser probada.

En esta etapa de la investigación utilizamos el modelo de ratón transgénico Ret/MTB previamente desarrollado en el laboratorio. Utilizando ratones Ret/MTB, el grupo ha reportado previamente que la sobre-expresión de RET WT es oncogénica en la glándula mamaria, y que además las hembras multíparas exhiben una mayor incidencia de tumores mamarios que las hembras nulíparas (Gattelli et al. 2018), lo que indica, en concordancia con los resultados de esta tesis, que **el pasaje por la post-lactancia promueve la incidencia de neoplasias inducidas por RET.** En el presente estudio, analizamos las

etapas más tempranas del desarrollo tumoral. Globalmente, identificamos un incremento significativo de lesiones neoplásicas en las glándulas Ret/MTB luego de transcurrida la involución (Post-I), en comparación con las glándulas control, también bitransgénicas, de ratones hembra nulíparas (5.94 ± 1.52 versus 2.60 ± 1.39 , respectivamente) (**Figura R7**). Nuestros resultados apoyan los estudios realizados en modelos de tumores mamarios que demuestran que la involución tiene efectos pro-tumorales (Lyons et al. 2011; Martinson et al. 2015; O'Brien et al. 2010; Pennock et al. 2018).

Antes de la aparición de lesiones, hemos hallado que **la expresión aberrante de RET induce defectos en el desarrollo normal de la glándula mamaria**. Primero, mostramos que la sobre-expresión forzada de RET durante la lactancia, momento de mayor diferenciación de la glándula, conduce a un aumento en marcadores de involución, simultáneamente con un incremento de células epiteliales en proliferación, lo que probablemente contribuye a la mayor incidencia de tumores en las hembras múltiparas. De hecho, un análisis de RNA-seq realizado en tejido mamario lactante sobre-expresando RET mostró un perfil de expresión génica relacionado con el aumento de riesgo de cáncer (Vallone et al. 2022). Luego, observamos que la sobre-expresión de RET durante la involución temprana conduce a una aparición prematura de marcadores de involución tardíos, como la disminución en la muerte de células epiteliales por mecanismos disparados por caspasas (**Figura R6**). Curiosamente, los modelos de ratón que investigan los efectos de oncogenes mamarios conocidos a menudo mostraron alteraciones en la involución que, en la mayoría de los casos, la retrasa y facilita la progresión del tumor (Hutchinson et al., 2001; Castillo-Lluva et al., 2015; Jäger et al., 1997). Por el contrario, los ratones que expresaban constitutivamente MYC exhibieron una involución acelerada que se correlacionaba con una mayor incidencia de cáncer (Jäger et al., 1997; Stewart et al., 1984), como observamos con el modelo Ret/MTB.

Hemos observado, también, que como parte de la aceleración en el proceso de involución las glándulas presentan una mayor área cubierta por tejido adiposo cuando se sobre-expresa RET (**Figura R6**). Este efecto podría ser indirecto, causado por una ganancia en el espacio cubierto por tejido adiposo como consecuencia de las señales propias de la involución, o bien directo, en el cual RET podría participar, a través de la estimulación con factores solubles sobre la población de células adiposas maduras, progenitoras o bien en estados intermedios de diferenciación.

En base a los resultados obtenidos más adelante en la tesis (Parte II) que vinculan a RET con los pre-adipocitos, nos preguntamos si la expresión elevada de RET durante la post-lactancia promueve la generación de un ambiente adiposo inmaduro. Para ello, realizamos la inmunotinción para PDGFR α en muestras de tejidos mamario de hembras Ret/MTB en involución de los experimentos anteriormente descritos (**Figura R6A**). Observamos que los animales con sobre-expresión de RET en el tejido mamario presentan mayores niveles de este marcador (**Figura D1A**). Respecto a esto, se ha demostrado que la población de células progenitoras adiposas (ASCs y pre-adipocitos)(PDGFR α +) puede contribuir a la población de células epiteliales durante el desarrollo temprano de la glándula mamaria y la preñez (Joshi et al. 2019). Según este trabajo, las hormonas sexuales esteroideas

inducen la liberación de ligandos PDGF por parte del epitelio mamario, que actúan estimulando la migración local de las células del nicho mesenquimal PDGFR α + de manera quimiotáctica hacia el compartimento epitelial (Joshi et al. 2019). En ese sentido, y considerando los trabajos que muestran que los estrógenos son capaces de inducir la activación de RET, nuestros resultados aportan al entendimiento de estos procesos.

Los cortes de tejidos que exhiben hiperplasias inducidas por RET en post-lactancia (Post-I) en el sistema Ret/MTB, también presentaron áreas adyacentes positivas para PDGFR α (**Figura D1B**). Esto muestra una mayor presencia de adipocitos inmaduros en la proximidad de células que poseen señalización activa de RET.

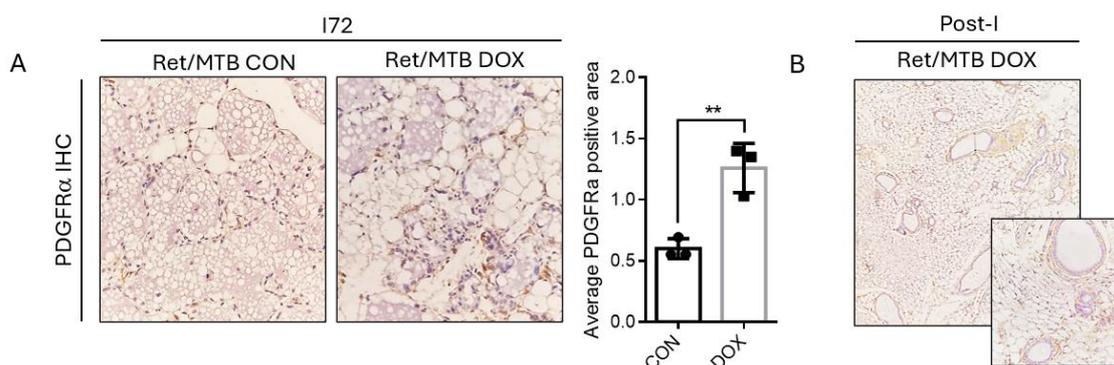


Figura D1. La expresión de RET en post-lactancia promueve un estroma adiposo inmaduro. (A) Secciones de glándula mamaria de 72 horas de involución obtenido de las hembras transgénicas Ret/MTB después del tratamiento con DOX (2 g/l)(Ret/MTB DOX) o sin DOX como grupo control (Ret/MTB CON) según se indica en el esquema de la **Figura R6A**, fueron analizadas por IHC para PDGFR α . Se cuantificó el área positiva para PDGFR α , en función del área total (aumento: 400X). Los datos se presentan como la media \pm sd. p valores mediante la prueba de t test de Student. (B) Se muestra la IHC para PDGFR α (aumento: 200X y 400X) en secciones de glándula mamaria con inducción crónica de RET por DOX durante 2 meses en hembras transgénicas (Ret/MTB DOX) una vez finalizado el período de involución (Post-I), según se indica en el esquema de la **Figura R7A**.

De este modo, los resultados hasta aquí abordaron un vacío presente en la bibliografía acerca de la potencial función fisiológica de RET en la glándula mamaria. Identificamos el impacto y las modificaciones que la presencia de RET dispara tanto en el epitelio mamario como en el tejido adiposo circundante en la glándula en desarrollo.

En la segunda y tercer parte (Parte II y Parte III) de la tesis, hallamos que **la interacción entre la célula tumoral mamaria y el tejido adiposo es regulada por el eje RET/PDGF-B, reteniendo adipocitos inmaduros que favorecen el crecimiento tumoral.**

En esta etapa de la investigación el modelo utilizado principalmente fueron las células murinas tumorales EO771 editadas para RET (RET-KO y su contraparte control RET-WT), tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. La línea celular EO771 es ER+PR-, pero se presenta cierta controversia en la bibliografía, ya que algunos grupos de investigación la utilizan como modelo luminal endócrino resistente (Le Naour et al. 2020) y otros para modelar el cáncer de mama triple negativo (Knab et al. 2021). En cualquier caso, son células que no responden a terapias anti-estrogénicas. Considerando que los tumores mamarios que expresan altos niveles de RET son en general insensibles a la privación de

estrógenos (Gattelli et al. 2013; I. Plaza-Menacho et al. 2010), la línea EO771 representa un buen modelo para nuestro estudio, compartiendo además características similares a los tumores del modelo transgénico Ret/MTB (Gattelli et al. 2018).

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis metabólico de las células EO771, observamos que las células RET-KO poseen una respiración mitocondrial disminuida en comparación a las células RET-WT (**Figura R10**). Estos hallazgos indican que la señalización de RET influye de alguna manera, ya sea en la biogénesis de mitocondrias, o bien en la funcionalidad de éstas. Existe un reporte que muestra que la señalización de RET rescata los defectos morfológicos y funcionales mitocondriales en células humanas deficientes en PINK1, una proteína importante para la funcionalidad mitocondrial (Klein et al. 2014). Los autores muestran que la señalización de RET restablece la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones, que está reducida en mutantes de PINK1.

Por otro lado, contrario a reportes que indican que las células tumorales aumentan su respiración al co-cultivarlas con cultivos primarios provenientes de tejido adiposo mamario (Micallef et al. 2021), observamos en nuestros ensayos que las células EO771 RET-WT no modifican de manera significativa sus parámetros de respiración mitocondrial en co-cultivo con adipocitos o pre-adipocitos (**Figura R21**). Sin embargo, las células RET-KO si incrementan su respiración mitocondrial como consecuencia del co-cultivo con PA, adquiriendo valores similares a las células RET-WT. Este resultado sugiere que hay una regulación sobre la actividad mitocondrial de las células tumorales que actúa de manera independiente a RET, probablemente disparada por factores liberados por los PA. Sería interesante continuar explorando esta funcionalidad de RET en la actividad mitocondrial en un futuro.

En conjunto, mediante la implementación del modelo EO771 RET-KO tanto *in vitro* como *in vivo*, observamos que **el efecto de la señalización de RET en la célula tumoral impacta sobre el tejido adiposo manteniendo un fenotipo inmaduro**, evidenciada en la disminución de la expresión de *Adiponectin*, *Pparg* y *Cebpa* (**Figura R14**), y el aumento de DLK1, marcador específico de PA (**Figura R16**). Respecto del mecanismo involucrado en este proceso, varios aspectos quedan por resolver. Por ejemplo, en los experimento *in vitro* de medios condicionados (**Figura R12**), la presencia de RET en la célula tumoral no parece interferir en la incorporación de lípidos por parte de adipocitos durante el proceso de diferenciación. Sin embargo, un aumento en el tejido adiposo de fenotipo inmaduro (**Figura R14**), implica necesariamente una pérdida de lípidos por parte de los adipocitos en un fenómeno de de-diferenciación; o bien, una proliferación del fenotipo inmaduro o PA directamente inducida por el RET tumoral. La proliferación de los PA no se ve afectada por la señalización de RET tumoral en los ensayos *in vitro* de medio condicionado (**Figura R29**), por lo que desestimamos esta última posibilidad. Distintos grupos han demostrado que los tumores son capaces de inducir de-diferenciación en el tejido adiposo circundante (Zhu et al. 2022; Dirat et al. 2011), pero no se conoce en profundidad los mecanismos por los cuales esto ocurre. Para determinar que un proceso de de-diferenciación está ocurriendo, es correcto realizar experimentos específicos para comprobarlo, como

ensayos de seguimiento de linaje o *linage tracing in vivo* con ratones especialmente diseñados, en donde células en distintos estados de diferenciación pueden marcarse y registrarse a lo largo del tiempo en distintas condiciones (Joshi et al. 2019; C. Sun et al. 2020). Para tal fin, estamos trabajando en colaboración con el laboratorio de la Dra. Sabio (CNIO, España), quien es experta en la utilización de modelos animales modificados genéticamente.

Aportando al mecanismo, hallamos que el aumento en la expresión de *Wisp1* correlaciona con la presencia de RET (**Figura R12 y Figura R14**). WISP1 es una proteína de secreción que mantiene el estado de pre-adipocito e impide su diferenciación regulando negativamente la acción del factor de transcripción PPAR γ (Ferrand et al. 2017). Por lo tanto, especulamos que su expresión podría estar siendo modificada a través de la señalización de RET, en los pre-adipocitos, y luego actuar paracrinamente en los adipocitos maduros circundantes, regulando allí negativamente la expresión de *Pparg* y, en consecuencia, *Cebpa* (**Figura R14**), ya que este es regulado por *Pparg* (Rosen et al. 1999). Tanto WISP1 como DLK1 se expresan principalmente en pre-adipocitos y su expresión disminuye durante la adipogénesis, siendo totalmente ausentes en los adipocitos maduros (Ferrand et al. 2016; Smas and Sul, 1993; Smas and Sul, 1997; Wang et al. 2006). Además, ambos son factores que pueden ser producidos por células tumorales y se consideran pro-tumorales: WISP1, al ser secretado al microambiente, participa de la linealización de las fibras de colágeno, lo cual favorece la malignidad y la metástasis (Jia et al. 2019); DLK1, por su parte, se ha visto que aumenta la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo como MDA-MB-231 (Nueda et al. 2007; Yanai et al. 2010). En este sentido, la presencia de estos factores en el microambiente podría promover, por un lado, el mantenimiento del estado inmaduro de los pre-adipocitos y por otro, con participación de éstos, el crecimiento tumoral.

Respecto de DLK1, probamos además que, **en el pre-adipocito la producción del DLK1 extracelular, DLK1_s, es disparada por el secretoma de la señalización de RET en la célula tumoral**, con la participación de la vía de PDGF-B/PDGFR. Sabiendo que DLK1_s participa del mantenimiento del fenotipo inmaduro impidiendo la diferenciación de pre-adipocitos (Mei et al. 2002), sería interesante analizar si este factor es capaz de inducir la de-diferenciación en adipocitos maduros, algo que no está descrito en la bibliografía. Dado que PDGFR α no se expresa en adipocitos maduros (Joshi et al, 2019), PDGF-B no podría ser el mediador de este efecto en los adipocitos. Es por ello por lo que sería relevante evaluar si la disminución de marcadores de madurez en los adipocitos se debe al efecto del DLK1_s, producido por los pre-adipocitos del microambiente mamario en respuesta al PDGF-B proveniente de la señalización de RET en el tumor.

Respecto a los ligandos PDGFs, identificamos a **PDGF-B como un factor producido, tanto *in vitro* como *in vivo*, por la activación de RET**, convirtiéndolo en nuestro principal candidato a mediar el efecto de RET en el tejido adiposo. Nuestros resultados, además de demostrar la producción de PDGF-B río abajo de RET en la célula tumoral y su potencial de producir modificaciones en la señalización de los PA (**Figura R27, Figura R28 y Figura 30**), ponen de manifiesto la alta homología que existe entre el PDGF-B humano y murino. Como

ha sido probado por otros autores (Gao et al. 2018), demostramos que el PDGF-B humano, proveniente de las células MCF7, es capaz de activar el receptor PDGFR α en los PA de origen murino (**Figura 30**).

Como mencionamos en la Introducción, la señalización de RET favorece la metástasis a cerebro en cáncer de mama (Jagust et al. 2024; Varešlija et al. 2019). Por otro lado, se ha demostrado que células tumorales mamarias con alta expresión de PDGF-B tienen una mayor predisposición a generar metástasis a cerebro, que a otros órganos, en comparación a células que tienen baja expresión de este factor (Thies et al. 2021). En ese sentido, nuestro aporte, el cual demuestra que la señalización de RET induce la producción de PDGF-B en células tumorales, podría contribuir al entendimiento de la metástasis cerebral en cáncer de mama.

La postulación de PDGF-B como factor candidato inducido por RET surge del análisis de los resultados del RNAseq de tejido mamario de hiperplasias producidas a partir de la sobre-expresión de RET en el modelo Ret/MTB. Sin embargo, aquí PDGF-A es el ligando que se encuentra *Up*-regulado, y no PDGF-B (**Figura R26**). Ahora bien, los tumores generados a partir de la sobre-expresión de RET presentan un aumento significativo de PDGF-B, y no de PDGF-A (**Figura R27**). Este resultado es apoyado por el análisis de biopsias humanas de TCGA, donde observamos una correlación positiva entre RET y PDGF-B en muestras del tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama, y no entre RET y PDGF-A (**Tabla R2**). Especulamos que podría existir algún tipo de regulación a nivel de la disponibilidad de los distintos ligandos, siendo PDGF-A más abundante en estadios más tempranos de la tumorigenesis y PDGF-B en estadios más avanzados; pero este tema resta por ser estudiado. De todas formas, tanto PDGF-A como PDGF-B se unen con alta afinidad al mismo receptor, PDGFR α , formando homo- o heterodímeros (Chen, Chen, and He 2013).

Contrario a lo esperado, en el análisis de RNA-seq no se revelan cambios significativos en las citoquinas inflamatorias canónicas inducidas por la señalización de RET, como IL-6 o TNF α (Esseghir et al. 2007; Gattelli et al. 2013). De hecho, estudiamos ambas citoquinas en el TAAT en del modelo de tumores EO771 RET-WT *versus* RET-KO y no observamos diferencias significativas en este tejido adyacente frente a la expresión del RET tumoral (datos no mostrados). Acompañando estos resultados negativos, se realizaron ensayos de citometría de flujo del componente inmune presente en los tumores RET-KO y RET-WT, sin observar cambios significativos en ninguna de las poblaciones analizadas (linfocitos, macrófagos y MDSC) como consecuencia de la presencia o no de RET en el tumor. Por lo tanto, decidimos no avanzar en esta dirección en nuestras investigaciones.

Por otro lado, demostramos que **los pre-adipocitos expresan niveles significativamente mayores de los ligandos de RET, *Gdnf* y *Artn*, que los adipocitos maduros**. Otros trabajos también han mostrado que GDNF puede ser producido por las ASCs (Zhong et al, 2016) y por fibroblastos (α SMA+) que infiltran el tumor (Esseghir et al. 2007). Nuestro hallazgo es indicativo de que los pre-adipocitos tienen un efecto pro-tumoral directo en tumores RET+, ya que se ha reportado que estos ligandos inducen proliferación en células de cáncer de mama que expresan RET (Gattelli et al, 2013).

En cuanto a las características pro-tumorales de los pre-adipocitos, destacamos un estudio donde se analizaron mediante scRNA-seq tumores de mama, incluyendo todos los subtipos, y su microambiente (S. Z. Wu et al. 2021). En la fracción estromal no inmune, identificaron tres poblaciones principales de células, incluyendo fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), células perivasculares y células endoteliales (S. Z. Wu et al. 2021). Dentro de la población de CAFs, los autores definieron cinco sub-poblaciones, siendo una de ellas positiva para *DLK1* (*DLK1*⁺). Especulamos que estas células pueden provenir no solo del *pool* de pre-adipocitos sino también de los adipocitos de-diferenciados de la periferia tumoral. Considerando que estas células, no solo son fenotípicamente muy similares a los fibroblastos, sino que también comparten un patrón de expresión común con los CAFs como *PDGFRA*, es lógico que sean reconocidas dentro de esta población celular.

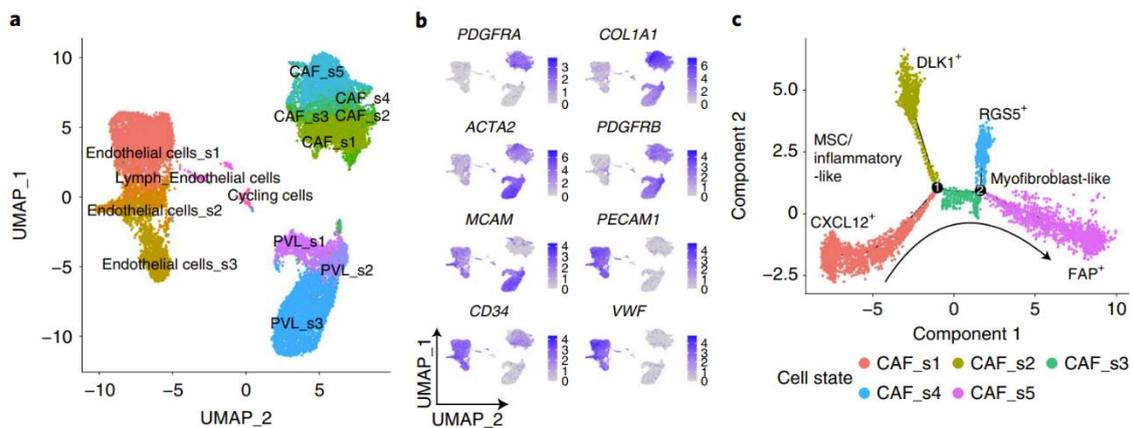


Figura D2. Los pre-adipocitos forman parte del microambiente tumoral en pacientes con cáncer de mama. (A) Perfiles transcripcionales y fenotípicos de diversos estados de diferenciación mesenquimal en cánceres de mama. Visualización UMAP de poblaciones de células mesenquimales, incluidas CAFs (6573 células), células perivasculares (PVL)(5423 células), células endoteliales (7899 células), células endoteliales linfáticas (203 células) y células PVL cíclicas (50 células). (B) Gráficos de marcadores canónicos para CAF (*PDGFRA*, *COL1A1*, *ACTA2*, *PDGFRB*), PVL (*ACTA2*, *PDGFRB* y *MCAM*) y células endoteliales (*PECAM1*, *CD34* y *VWF*). (C) Estados celulares y expresión de genes que cambian en función del pseudotiempo para las cinco poblaciones definidas de CAFs. Modificado de (S. Z. Wu et al. 2021).

La capacidad pro-tumoral de los CAFs está ampliamente demostrada y, frente a nuestros resultados, que demuestran la capacidad pro-tumoral de los pre-adipocitos, resulta lógico que esta población sea incluida dentro de las poblaciones que agrupan los CAFs. Sin embargo, es interesante destacar que solo las células *DLK1*⁺ tienen la potencialidad de diferenciarse a adipocitos, mientras que el resto de las sub-poblaciones tiene una capacidad muy reducida (Zhu et al. 2022). Si consideramos que los CAF y los PA tienen una capacidad pro-tumoral mayor que los adipocitos maduros, la plasticidad celular de los PA podría presentar una ventaja desde una mirada terapéutica, ya que al diferenciarlos en adipocitos maduros se podría impedir o enlentecer el crecimiento tumoral. Esta estrategia fue utilizada por el grupo del Dr. Christofori (Biomedizin Unibas, Suiza), donde utilizaron rosiglitazona como tratamiento anti-tumoral para, en este caso, diferenciar a adipocitos las células tumorales transdiferenciadas a células mesenquimales (Ishay-ronen et al. 2019). Si bien la rosiglitazona sola no fue suficiente para impedir el crecimiento tumoral, si

lo fue su combinación con un inhibidor de MEK, otro receptor de la familia RTK. Como experimentos a futuro, nos proponemos incluir este tipo de estrategias en el tratamiento de tumores mamarios, por ejemplo, ensayando la adición de rosiglitazona o bien inhibidores de PDGFR (como imatinib), en combinación con inhibidores de RET (como pralsetinib).

Finalmente, esperamos que los aportes de este trabajo al conocimiento de los mecanismos básicos, tanto en la fisiología normal como tumoral, que gobiernan la interacción entre dos componentes celulares relevantes en la glándula mamaria, como las células epiteliales y los adipocitos, contribuirán al diseño de mejores y más efectivas terapias para combatir el cáncer de mama en el futuro.

Conclusiones

Se muestra a continuación un esquema y listado, a modo de resumen, de las principales **Conclusiones** obtenidas:

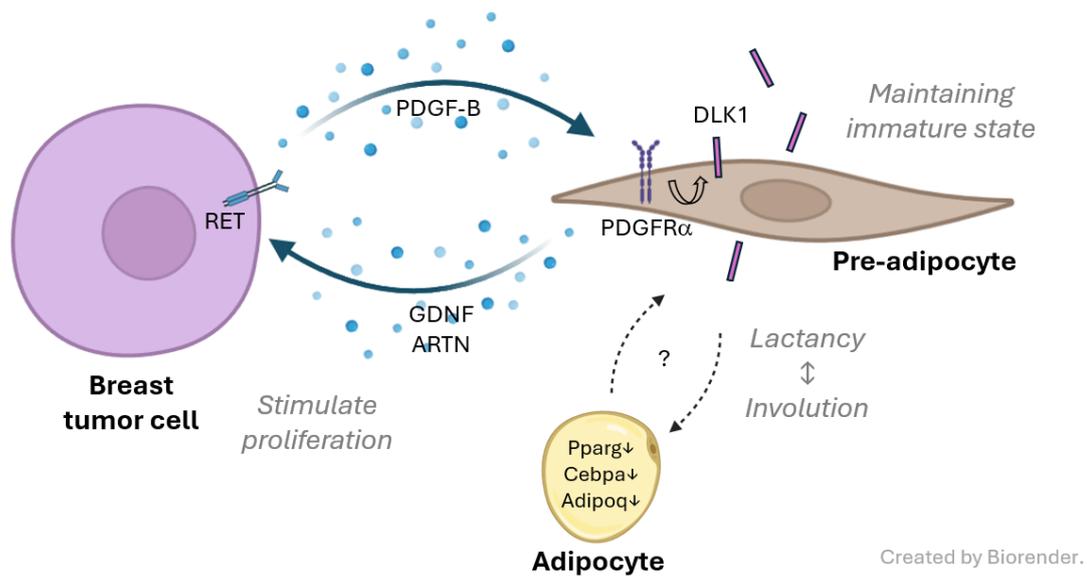


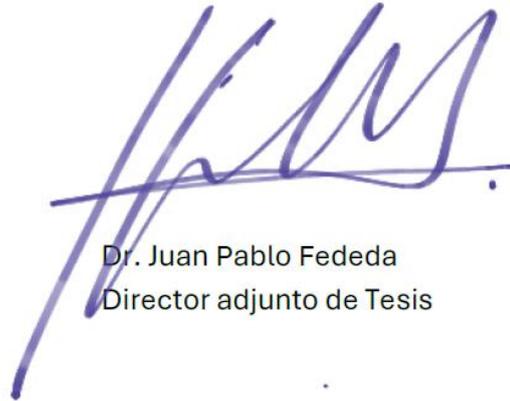
Figura C. La señalización de RET promueve la generación de un microambiente adiposo inmaduro pro-tumoral. La activación de RET en la célula tumoral mamaria induce la liberación de PDGF-B, el cual promueve el mantenimiento del fenotipo inmaduro en pre-adipocitos. A su vez, a través de la señalización de PDGFR α en pre-adipocitos, el secretoma de RET favorece el clivaje extracelular de DLK1, el cual, además de participar del mantenimiento del fenotipo inmaduro, es pro-tumoral. En línea con estos descubrimientos, encontramos que en la periferia de tumores RET $^{+}$ disminuye la expresión de marcadores de adipocito blanco maduro, como *Pparg*, *Cebpa* y *Adipoq*. Por otro lado, encontramos que la expresión de RET se encuentra finamente regulada durante los estadios de la glándula mamaria normal, y que este receptor participa de la transición post-lactancia, afectando la remodelación del tejido adiposo en ese período. Por último, encontramos que a través de la liberación de ligando de RET, como GDNF y ARTN, los pre-adipocitos tienen un efecto pro-tumoral sobre células tumorales RET $^{+}$, tanto *in vivo* como *in vitro*.

- RET está regulado durante el desarrollo normal de la glándula mamaria, principalmente en la transición de lactancia a involución (post-lactancia).
- La expresión aberrante de RET durante post-lactancia causa defectos en el desarrollo, aberraciones en el tejido adiposo y promueve la tumorigénesis.
- La expresión de RET en el tumor mamario regula el estado de madurez de los adipocitos circundantes (mediante PDGF-B), favoreciendo un fenotipo inmaduro similar a sus precursores, los pre-adipocitos.
- Los pre-adipocitos son capaces de expresar ligandos de RET (GDNF y ARTN) y poseen un efecto pro-tumoral dependiente de la expresión de RET en el tumor.

- El eje RET/PDGF-B integra la señalización de la interacción entre el tumor mamario y el tejido adiposo circundante en favor del crecimiento tumoral.



Dra. Albana Gattelli
Directora de Tesis



Dr. Juan Pablo Fededa
Director adjunto de Tesis



Lic. Sabrina A. Vallone
Tesisista

Bibliografía

- Andreucci, Elena, Paola Francica, Antony Fearn, Lesley-Ann Martin, Paola Chiarugi, Clare M. Isacke, and Andrea Morandi. 2016. "Targeting the Receptor Tyrosine Kinase RET in Combination with Aromatase Inhibitors in ER Positive Breast Cancer Xenografts." *Oncotarget* 7 (49): 80543–53. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11826>.
- Armulik, Annika, Guillem Genové, and Christer Betsholtz. 2011. "Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises." *Developmental Cell* 21 (2): 193–215. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>.
- Balaban, Seher, Robert F. Shearer, Lisa S. Lee, Michelle van Geldermalsen, Mark Schreuder, Harrison C. Shtein, Rose Cairns, et al. 2017. "Adipocyte Lipolysis Links Obesity to Breast Cancer Growth: Adipocyte-Derived Fatty Acids Drive Breast Cancer Cell Proliferation and Migration." *Cancer & Metabolism* 5:1. <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0163-7>.
- Baladrón, Victoriano, María José Ruiz-Hidalgo, María Luisa Nueda, María José M. Díaz-Guerra, José Javier García-Ramírez, Ezio Bonvini, Elena Gubina, and Jorge Laborda. 2005. "Dlk Acts as a Negative Regulator of Notch1 Activation through Interactions with Specific EGF-like Repeats." *Experimental Cell Research* 303 (2): 343–59. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.10.001>.
- Bambhroliya, Arvind, Renae D. Van Wyhe, Swaminathan Kumar, Bisrat G. Debeb, Jay P. Reddy, Steve Van Laere, Randa El-Zein, Arvind Rao, and Wendy A. Woodward. 2018. "Gene Set Analysis of Post-Lactational Mammary Gland Involution Gene Signatures in Inflammatory and Triple-Negative Breast Cancer." *PLOS ONE* 13 (4): e0192689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192689>.
- Bernard, Jamie J., and Elizabeth A. Wellberg. 2021. "The Tumor Promotional Role of Adipocytes in the Breast Cancer Microenvironment and Macroenvironment." *The American Journal of Pathology* 191 (8): 1342–52. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.02.006>.
- Blakely, Collin M, Louis Sintasath, Celina M D’Cruz, Kristina T Hahn, Katherine D Dugan, George K Belka, and Lewis a Chodosh. 2005. "Developmental Stage Determines the Effects of MYC in the Mammary Epithelium." *Development (Cambridge, England)* 132 (5): 1147–60. <https://doi.org/10.1242/dev.01655>.
- Bochet, Ludivine, Camille Lehuédé, Stéphonies Dauvillier, Yuan Yuan Wang, Béatrice Dirat, Victor Laurent, Cédric Dray, et al. 2013. "Adipocyte-Derived Fibroblasts Promote Tumor Progression and Contribute to the Desmoplastic Reaction in Breast Cancer." *Cancer Research* 73 (18): 5657–68. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0530>.
- Borges, Virginia F., Traci R. Lyons, Doris Germain, and Pepper Schedin. 2020. "Postpartum Involution and Cancer: An Opportunity for Targeted Breast Cancer Prevention and Treatments?" *Cancer Research* 80 (9): 1790–98. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-19-3448>.
- Borrello, M. G., L. Alberti, A. Fischer, D. Degl’Innocenti, C. Ferrario, M. Gariboldi, F. Marchesi, et al. 2005. "Induction of a Proinflammatory Program in Normal Human Thyrocytes by the RET/PTC1 Oncogene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (41): 14825–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503039102>.
- Bottos, Alessia, Dagmar Gotthardt, Jason W. Gill, Albana Gattelli, Anna Frei, Alexandar Tzankov, Veronika Sexl, Aleksandra Wodnar-Filipowicz, and Nancy E. Hynes. 2016. "Decreased NK-Cell Tumour Immunosurveillance Consequent to JAK Inhibition Enhances Metastasis in Breast Cancer Models." *Nature Communications* 7 (May): 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms12258>.
- Boulay, Anne, Madlaina Breuleux, Christine Stephan, Caroline Fux, Cathrin Briskin, Maryse Fiche, Markus Wartmann, Michael Stumm, Heidi A. Lane, and Nancy E. Hynes. 2008. "The Ret Receptor Tyrosine Kinase Pathway Functionally Interacts with the ERα Pathway in Breast Cancer." *Cancer Research* 68 (10): 3743–51. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5100>.
- Bray, Freddie, Mathieu Laversanne, Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Isabelle Soerjomataram, and Ahmedin Jemal. 2024. "Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN

- Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 74 (3): 229–63. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
- Brun, R. P., J. B. Kim, E. Hu, S. Altiok, and B. M. Spiegelman. 1996. "Adipocyte Differentiation: A Transcriptional Regulatory Cascade." *Current Opinion in Cell Biology* 8 (6): 826–32. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(96\)80084-6](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(96)80084-6).
- Cao, Z., R. M. Umek, and S. L. McKnight. 1991. "Regulated Expression of Three C/EBP Isoforms during Adipose Conversion of 3T3-L1 Cells." *Genes & Development* 5 (9): 1538–52. <https://doi.org/10.1101/gad.5.9.1538>.
- Cattaneo, Paola, Debanjan Mukherjee, Simone Spinozzi, Lunfeng Zhang, Veronica Larcher, William B. Stallcup, Hiroshi Kataoka, et al. 2020. "Parallel Lineage-Tracing Studies Establish Fibroblasts as the Prevailing In Vivo Adipocyte Progenitor." *Cell Reports* 30 (2): 571-582.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.046>.
- Chapman, Rachel S., Paula C. Lourenco, Elizabeth Tonner, David J. Flint, Stefan Selbert, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Alan R. Clarke, and Christine J. Watson. 1999. "Suppression of Epithelial Apoptosis and Delayed Mammary Gland Involution in Mice with a Conditional Knockout of Stat3." *Genes and Development* 13 (19): 2604–16. <https://doi.org/10.1101/gad.13.19.2604>.
- Chawla, A., and M. A. Lazar. 1994. "Peroxisome Proliferator and Retinoid Signaling Pathways Co-Regulate Preadipocyte Phenotype and Survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (5): 1786–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1786>.
- Chen, Po-Han, Xiaoyan Chen, and Xiaolin He. 2013. "Platelet-Derived Growth Factors and Their Receptors: Structural and Functional Perspectives." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1834 (10): 2176–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.015>.
- Chiariello, Mario, Roberta Visconti, Francesca Carlomagno, Rosa Marina Melillo, Cecilia Bucci, Vittorio De Franciscis, Gary M. Fox, et al. 1998. "Signalling of the Ret Receptor Tyrosine Kinase through the C-Jun NH2-Terminal Protein Kinases (JNKs): Evidence for a Divergence of the ERKs and JNKs Pathways Induced by Ret." *Oncogene* 16 (19): 2435–45. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201778>.
- Clarkson, Richard W.E., Matthew T. Wayland, Jennifer Lee, Tom Freeman, and Christine J. Watson. 2004. "Gene Expression Profiling of Mammary Gland Development Reveals Putative Roles for Death Receptors and Immune Mediators in Post-Lactational Regression." *Breast Cancer Research: BCR* 6 (2): R92–109. <https://doi.org/10.1186/bcr754>.
- Colleluori, Georgia, Jessica Perugini, Giorgio Barbatelli, and Saverio Cinti. 2021. "Mammary Gland Adipocytes in Lactation Cycle, Obesity and Breast Cancer." *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 22 (2): 241–55. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09633-5>.
- Corsa, Callie A S, and Ormond A Macdougald. 2018. "Cyclical Dedifferentiation and Redifferentiation of Mammary Adipocytes." *Cell Metabolism* 28 (2): 187–89. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.013>.
- Cristancho, Ana G., and Mitchell A. Lazar. 2011. "Forming Functional Fat: A Growing Understanding of Adipocyte Differentiation." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (11): 722–34. <https://doi.org/10.1038/nrm3198>.
- Devericks, Emily N., Meredith S. Carson, Lauren E. McCullough, Michael F. Coleman, and Stephen D. Hursting. 2022. "The Obesity-Breast Cancer Link: A Multidisciplinary Perspective." *Cancer and Metastasis Reviews* 41 (3): 607–25. <https://doi.org/10.1007/s10555-022-10043-5>.
- Dirat, Béatrice, Ludivine Bochet, Marta Dabek, Danièle Daviaud, Stéphanie Dauvillier, Bilal Majed, Yuan Yuan Wang, et al. 2011. "Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion." *Cancer Research* 71 (7): 2455–65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>.
- Drilon, Alexander, Zishuo I. Hu, Gillianne G.Y. Lai, and Daniel S.W. Tan. 2018. "Targeting Ret-

- Driven Cancers: Lessons from Evolving Preclinical and Clinical Landscapes." *Nature Reviews Clinical Oncology* 15 (3): 151–67. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.175>.
- Drilon, Alexander, Jessica J. Lin, Thomas Filleron, Ai Ni, Julie Milia, Isabella Bergagnini, Vaios Hatzoglou, et al. 2018. "Frequency of Brain Metastases and Multikinase Inhibitor Outcomes in Patients With *RET*-Rearranged Lung Cancers." *Journal of Thoracic Oncology* 13 (10): 1595–1601. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.07.004>.
- Emont, Margo P., Christopher Jacobs, Adam L. Essene, Deepti Pant, Danielle Tenen, Georgia Colleluori, Angelica Di Vincenzo, et al. 2022. "A Single-Cell Atlas of Human and Mouse White Adipose Tissue." *Nature* 603 (7903): 926–33. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04518-2>.
- Engin, Atilla. 2017. "Obesity-Associated Breast Cancer: Analysis of Risk Factors." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 960:571–606. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_25.
- Esseghir, Selma, S. Katrina Todd, Toby Hunt, Richard Poulson, Ivan Plaza-Menacho, Jorge S. Reis-Filho, and Clare M. Isacke. 2007. "A Role for Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor-Induced Expression by Inflammatory Cytokines and *RET*/*GFRa1* Receptor up-Regulation in Breast Cancer." *Cancer Research* 67 (24): 11732–41. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2343>.
- Esteve Ràfols, Montserrat. 2014. "Adipose Tissue: Cell Heterogeneity and Functional Diversity." *Endocrinología Y Nutrición: Organo De La Sociedad Espanola De Endocrinología Y Nutrición* 61 (2): 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>.
- Faubert, Brandon, Ashley Solmonson, and Ralph J. DeBerardinis. 2020. "Metabolic Reprogramming and Cancer Progression." *Science (New York, N.Y.)* 368 (6487): eaaw5473. <https://doi.org/10.1126/science.aaw5473>.
- Ferrand, Nathalie, Véronique Béreziat, Marthe Moldes, Maurice Zaoui, Annette K. Larsen, and Michèle Sabbah. 2017. "WISP1/*CCN4* Inhibits Adipocyte Differentiation through Repression of *PPARγ* Activity." *Scientific Reports* 7 (1): 1749. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01866-2>.
- Ferrero, Radiana, Pernille Rainer, and Bart Deplancke. 2020. "Toward a Consensus View of Mammalian Adipocyte Stem and Progenitor Cell Heterogeneity." *Trends in Cell Biology* 30 (12): 937–50. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.09.007>.
- Fisher, Bernard, Joseph P. Costantino, D. Lawrence Wickerham, Carol K. Redmond, Maureen Kavanah, Walter M. Cronin, Victor Vogel, et al. 1998. "Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 90 (18): 1371–88. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.18.1371>.
- Fitter, Stephen, Kate Vandyke, Stan Gronthos, and Andrew C. W. Zannettino. 2012. "Suppression of PDGF-Induced *PI3* Kinase Activity by Imatinib Promotes Adipogenesis and Adiponectin Secretion." *Journal of Molecular Endocrinology* 48 (3): 229–40. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0003>.
- Fornetti, Jaime, Holly A. Martinson, Courtney B. Betts, Traci R. Lyons, Sonali Jindal, Qiuchen Guo, Lisa M. Coussens, Virginia F. Borges, and Pepper Schedin. 2014. "Mammary Gland Involution as an Immunotherapeutic Target for Postpartum Breast Cancer." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 19 (2): 213–28. <https://doi.org/10.1007/s10911-014-9322-z>.
- Gantov, Mariana, Priscila Pagnotta, Cecilia Lotufo, Gustavo Marcelo Rindone, Maria Fernanda Riera, Juan Carlos Calvo, and Judith Toneatto. 2021. "Beige Adipocytes Contribute to Breast Cancer Progression." *Oncology Reports* 45 (1): 317–28. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7826>.
- Gao, Zhanguo, Alexis C. Daquinag, Fei Su, Brad Snyder, and Mikhail G. Kolonin. 2018. "PDGFR α /PDGFR β Signaling Balance Modulates Progenitor Cell Differentiation into White and Beige Adipocytes." *Development (Cambridge, England)* 145 (1): dev155861.

- <https://doi.org/10.1242/dev.155861>.
- Gattelli, Albana, Martín E. García Solá, Tim C. Roloff, Robert D. Cardiff, Edith C. Kordon, Lewis A. Chodosh, and Nancy E. Hynes. 2018. "Chronic Expression of Wild-Type Ret Receptor in the Mammary Gland Induces Luminal Tumors That Are Sensitive to Ret Inhibition." *Oncogene* 37 (29): 4046–54. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0235-y>.
- Gattelli, Albana, Nancy E. Hynes, Ignacio E. Schor, and Sabrina A. Vallone. 2020. "Ret Receptor Has Distinct Alterations and Functions in Breast Cancer." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 25 (1): 13–26. <https://doi.org/10.1007/s10911-020-09445-4>.
- Gattelli, Albana, Ivan Nalvarte, Anne Boulay, Tim C. Roloff, Martin Schreiber, Neil Carragher, Kenneth K. Macleod, et al. 2013. "Ret Inhibition Decreases Growth and Metastatic Potential of Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Cells." *EMBO Molecular Medicine* 5 (9): 1335–50. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302625>.
- Ghaben, Alexandra L., and Philipp E. Scherer. 2019. "Adipogenesis and Metabolic Health." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20 (4): 242–58. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>.
- Girnius, Nomedá, Yvonne J. K. Edwards, and Roger J. Davis. 2018. "The cJUN NH₂-Terminal Kinase (JNK) Pathway Contributes to Mouse Mammary Gland Remodeling during Involution." *Cell Death & Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0081-z>.
- Gouon-Evans, Valérie, and Jeffrey W. Pollard. 2002. "Unexpected Deposition of Brown Fat in Mammary Gland During Postnatal Development." *Molecular Endocrinology* 16 (11): 2618–27. <https://doi.org/10.1210/me.2001-0337>.
- Goustin, A. S., E. B. Leof, G. D. Shipley, and H. L. Moses. 1986. "Growth Factors and Cancer." *Cancer Research* 46 (3): 1015–29.
- Grassi, Elisa S., Pauline Jeannot, Vasiliki Pantazopoulou, Tracy J. Berg, and Alexander Pietras. 2020. "Niche-Derived Soluble DLK1 Promotes Glioma Growth." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 22 (12): 689–701. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.10.005>.
- Grassi, Elisa Stellaria, Vasiliki Pantazopoulou, and Alexander Pietras. 2020. "Hypoxia-Induced Release, Nuclear Translocation, and Signaling Activity of a DLK1 Intracellular Fragment in Glioma." *Oncogene* 39 (20): 4028–44. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1273-9>.
- Grassi, Elisa Stellaria, and Alexander Pietras. 2022. "Emerging Roles of DLK1 in the Stem Cell Niche and Cancer Stemness." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 70 (1): 17–28. <https://doi.org/10.1369/00221554211048951>.
- Greenberg, A S, J J Egan, S A Wek, M C Moos, C Londos, and A R Kimmel. 1993. "Isolation of cDNAs for Perilipins A and B: Sequence and Expression of Lipid Droplet-Associated Proteins of Adipocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (24): 12035–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.12035>.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, and H. S. Sul. 1998. "Understanding Adipocyte Differentiation." *Physiological Reviews* 78 (3): 783–809. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.783>.
- Grieco, Michele, Massimo Santoro, Maria Teresa Berlingieri, Rosa Marina Melillo, Rosangela Donghi, Italia Bongarzone, Marco A. Pierotti, Giuseppe Della Porta, Alfredo Fusco, and Giancarlo Vecchiot. 1990. "PTC Is a Novel Rearranged Form of the Ret Proto-Oncogene and Is Frequently Detected in Vivo in Human Thyroid Papillary Carcinomas." *Cell* 60 (4): 557–63. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90659-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90659-3).
- Grinman, Diego Y., Valeria P. Careaga, Elizabeth A. Wellberg, María V. Dansey, Edith C. Kordon, Steven M. Anderson, Marta S. Maier, et al. 2019. "Liver X Receptor- α Activation Enhances Cholesterol Secretion in Lactating Mammary Epithelium." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 316 (6): E1136–45. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00548.2018>.
- Groot, Jan Willem B. De, Thera P. Links, John T.M. Plukker, Cornelis J.M. Lips, and Robert M.W. Hofstra. 2006. "RET as a Diagnostic and Therapeutic Target in Sporadic and Hereditary Endocrine Tumors." *Endocrine Reviews* 27 (5): 535–60. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0017>.

- Grzelak, Candice A., Erica T. Goddard, Emma E. Lederer, Kamy Rajaram, Jinxiang Dai, Ryann E. Shor, Andrea R. Lim, et al. 2022. "Elimination of Fluorescent Protein Immunogenicity Permits Modeling of Metastasis in Immune-Competent Settings." *Cancer Cell* 40 (1): 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.11.004>.
- Gunther, EDWARD J., GEORGE K. BELKA, GERALD B. W. WERTHEIM, JAMES WANG, JENNIFER L. HARTMAN, ROBERT B. BOXER, and LEWIS A. CHODOSH. 2002. "A Novel Doxycycline-Inducible System for the Transgenic Analysis of Mammary Gland Biology." *The FASEB Journal* 16 (3): 283–92. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0551com>.
- Hanin, Geula, and Anne C. Ferguson-Smith. 2023. "Mammary Adipocyte Flow Cytometry as a Tool to Study Mammary Gland Biology." *FEBS Open Bio* 13 (7): 1218–27. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13620>.
- Happ, Brigitte, and Bernd Groner. 1993. "The Activated Mammary Gland Specific Nuclear Factor (MGF) Enhances in Vitro Transcription of the Beta-Casein Gene Promoter." *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 47 (1): 21–30.
- Hennighausen, Lothar, and Gertraud W Robinson. 1998. "Think Globally, Act Locally: The Making of a Mouse Mammary Gland." *Genes & Development* 12 (301): 449–55.
- Hishida, Tomoaki, Makoto Nishizuka, Shigehiro Osada, and Masayoshi Imagawa. 2009. "The Role of C/EBPdelta in the Early Stages of Adipogenesis." *Biochimie* 91 (5): 654–57. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.002>.
- Hovey, Russell C., and Lucila Aimó. 2010. "Diverse and Active Roles for Adipocytes During Mammary Gland Growth and Function." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15 (3): 279–90. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9187-8>.
- Hudak, Carolyn S., and Hei Sook Sul. 2013. "Pref-1, a Gatekeeper of Adipogenesis." *Frontiers in Endocrinology* 4 (July). <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00079>.
- Hughes, Katherine, and Christine J. Watson. 2012. "The Spectrum of STAT Functions in Mammary Gland Development." *Jak-Stat* 1 (3): 151–58. <https://doi.org/10.4161/jkst.19691>.
- Hume, Robert D., Sara Pensa, Elizabeth J. Brown, Peter A. Kreuzaler, Jessica Hitchcock, Anke Husmann, Jonathan J. Campbell, Annabel O. Lloyd-Thomas, Ruth E. Cameron, and Christine J. Watson. 2018. "Tumour Cell Invasiveness and Response to Chemotherapeutics in Adipocyte Invested 3D Engineered Anisotropic Collagen Scaffolds." *Scientific Reports* 8 (1): 12658. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30107-3>.
- Hwang, Eun Suk, Dong Wook Kim, Jung Hwan Hwang, Hye Sook Jung, Jae Mi Suh, Young Joo Park, Hyo Kyun Chung, et al. 2004. "Regulation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) and STAT1-Dependent Genes by RET/PTC (Rearranged in Transformation/Papillary Thyroid Carcinoma) Oncogenic Tyrosine Kinases." *Molecular Endocrinology* 18 (11): 2672–84. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0168>.
- Hynes, N. E., and C. J. Watson. 2010. "Mammary Gland Growth Factors: Roles in Normal Development and in Cancer." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (8): a003186. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003186>.
- Hynes, Nancy E, and Heidi A Lane. 2005. "ERBB RECEPTORS AND CANCER :." *Nature Reviews Cancer* 5 (May). <https://doi.org/10.1038/nrc1609>.
- Ibáñez, Carlos F. 2013. "Structure and Physiology of the RET Receptor Tyrosine Kinase." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2): a009134. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009134>.
- Ikeda, Kenji, and Tetsuya Yamada. 2020. "UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes." *Frontiers in Endocrinology* 11 (July). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00498>.
- Ishay-ronen, Dana, Maren Diepenbruck, Ravi Kiran, Reddy Kalathur, Junrong Wang, Christoph Hess, Dana Ishay-ronen, et al. 2019. "Gain Fat — Lose Metastasis : Converting Invasive Breast Cancer Cells into Adipocytes Inhibits Cancer Article Gain Fat — Lose Metastasis :

- Converting Invasive Breast Cancer Cells into Adipocytes Inhibits Cancer Metastasis." *Cancer Cell* 35 (1): 17-32.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.12.002>.
- Jagust, Petra, Aoibhin M. Powell, Mihaela Ola, Louise Watson, Ana de Pablos-Aragoneses, Pedro García-Gómez, Ramón Fallon, et al. 2024. "RET Overexpression Leads to Increased Brain Metastatic Competency in Luminal Breast Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 116 (10): 1632–44. <https://doi.org/10.1093/jnci/djae091>.
- Jhiang, S. M., J. Y. Cho, T. L. Furminger, J. E. Sagartz, Q. Tong, C. C. Capen, and E. L. Mazzaferri. 1998. "Thyroid Carcinomas in RET/PTC Transgenic Mice." *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 154:265–70. https://doi.org/10.1007/978-3-642-46870-4_17.
- Jia, Hong, Jagadeesh Janjanam, Sharon C. Wu, Ruishan Wang, Glendin Pano, Marina Celestine, Ophelie Martinot, et al. 2019. "The Tumor Cell-Secreted Matricellular Protein WISP1 Drives pro-Metastatic Collagen Linearization." *The EMBO Journal* 38 (16): e101302. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101302>.
- Joshi, Purna A., Paul D. Waterhouse, Katayoon Kasaian, Hui Fang, Olga Gulyaeva, Hei Sook Sul, Paul C. Boutros, and Rama Khokha. 2019. "PDGFR α Stromal Adipocyte Progenitors Transition into Epithelial Cells during Lobulo-Alveologenesis in the Murine Mammary Gland." *Nature Communications* 10 (1): 1760. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09748-z>.
- Kan, Zhengyan, Bijay S Jaiswal, Jeremy Stinson, Vasantharajan Janakiraman, Deepali Bhatt, Howard M Stern, Peng Yue, et al. 2010. "Diverse Somatic Mutation Patterns and Pathway Alterations in Human Cancers." *Nature* 466 (August). <https://doi.org/10.1038/nature09208>.
- Kang, J., P. X. Qian, V. Pandey, J. K. Perry, L. D. Miller, E. T. Liu, T. Zhu, D. X. Liu, and P. E. Lobie. 2010. "Artemin Is Estrogen Regulated and Mediates Antiestrogen Resistance in Mammary Carcinoma." *Oncogene* 29 (22): 3228–40. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.71>.
- Kim, Dae-Seok, and Philipp E. Scherer. 2021. "Obesity, Diabetes, and Increased Cancer Progression." *Diabetes & Metabolism Journal* 45 (6): 799–812. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0077>.
- Kim, Young Rae, Hee Sun Sun, Minho Won, Kyeong Ah Ah, Jin Man Kim, Byung Lyul Choi, Hyunji Lee, et al. 2008. "Modulatory Role of Phospholipase D in the Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3 by Thyroid Oncogenic Kinase RET/PTC." *BMC Cancer* 8:1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-144>.
- Kim, Yuri, Qun Lin, Daniel Zelterman, and Zhong Yun. 2009. "Hypoxia-Regulated Delta-like 1 Homologue Enhances Cancer Cell Stemness and Tumorigenicity." *Cancer Research* 69 (24): 9271–80. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1605>.
- Kir, Serkan, James P. White, Sandra Kleiner, Lawrence Kazak, Paul Cohen, Vickie E. Baracos, and Bruce M. Spiegelman. 2014. "Tumour-Derived PTH-Related Protein Triggers Adipose Tissue Browning and Cancer Cachexia." *Nature* 513 (7516): 100–104. <https://doi.org/10.1038/nature13528>.
- Klein, Pontus, Anne Kathrin Müller-Rischart, Elisa Motori, Cornelia Schönbauer, Frank Schnorrer, Konstanze F. Winklhofer, and Rüdiger Klein. 2014. "Ret Rescues Mitochondrial Morphology and Muscle Degeneration of Drosophila Pink1 Mutants." *The EMBO Journal* 33 (4): 341–55. <https://doi.org/10.1002/embj.201284290>.
- Klemm, D. J., J. W. Leitner, P. Watson, A. Nesterova, J. E. Reusch, M. L. Goalstone, and B. Draznin. 2001. "Insulin-Induced Adipocyte Differentiation. Activation of CREB Rescues Adipogenesis from the Arrest Caused by Inhibition of Prenylation." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (30): 28430–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103382200>.
- Knab, Vanessa Maria, Dagmar Gotthardt, Klara Klein, Reinhard Grausenburger, Gerwin Heller, Ingeborg Menzl, Daniela Prinz, et al. 2021. "Triple-Negative Breast Cancer Cells Rely on Kinase-Independent Functions of CDK8 to Evade NK-Cell-Mediated Tumor Surveillance."

- Cell Death & Disease* 12 (11): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04279-2>.
- Kohno, Takashi, Hitoshi Ichikawa, Yasushi Totoki, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nammo, Hiromi Sakamoto, et al. 2012. “KIF5B-RET Fusions in Lung Adenocarcinoma.” *Nature Medicine* 18 (3): 375–77. <https://doi.org/10.1038/nm.2644>.
- Kreuzaler, Peter A., Anna D. Staniszewska, Wenjing Li, Nader Omidvar, Blandine Kedjouar, James Turkson, Valeria Poli, Richard A. Flavell, Richard W.E. Clarkson, and Christine J. Watson. 2011. “Stat3 Controls Lysosomal-Mediated Cell Death in Vivo.” *Nature Cell Biology* 13 (3): 303–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2171>.
- Kritikou, E. A. 2003. “A Dual, Non-Redundant, Role for LIF as a Regulator of Development and STAT3-Mediated Cell Death in Mammary Gland.” *Development* 130 (15): 3459–68. <https://doi.org/10.1242/dev.00578>.
- Le Naour, Augustin, Yvonne Koffi, Mariane Diab, Delphine Le Guennec, Stéphanie Rougé, Sahar Aldekwer, Nicolas Goncalves-Mendes, et al. 2020. “EO771, the First Luminal B Mammary Cancer Cell Line from C57BL/6 Mice.” *Cancer Cell International* 20 (1): 328. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01418-1>.
- Le Naour, Augustin, Adrien Rossary, and Marie Paule Vasson. 2020. “EO771, Is It a Well-Characterized Cell Line for Mouse Mammary Cancer Model? Limit and Uncertainty.” *Cancer Medicine* 9 (21): 8074–85. <https://doi.org/10.1002/CAM4.3295>.
- Lee, Bonggi, and Jianhua Shao. 2014. “Adiponectin and Energy Homeostasis.” *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 15 (2): 149–56. <https://doi.org/10.1007/s11154-013-9283-3>.
- Levy, D. E., and G. Inghirami. 2006. “STAT3: A Multifaceted Oncogene.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (27): 10151–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604042103>.
- Li, Lin, Jinjing Tan, Ying Zhang, Naijun Han, Xuebing Di, Ting Xiao, Shujun Cheng, Yanning Gao, and Yu Liu. 2014. “DLK1 Promotes Lung Cancer Cell Invasion through Upregulation of MMP9 Expression Depending on Notch Signaling.” *PLOS ONE* 9 (3): e91509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091509>.
- Li, Minglin, Xiuwen Liu, Gertraud Ribinson, Ud Bar-Peled, Kay Uwe Wagner, W. Scott Young, Lothar Hennighausen, and Priscilla A. Furth. 1997. “Mammary-Derived Signals Activate Programmed Cell Death during the First Stage of Mammary Gland Involution.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (7): 3425–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3425>.
- Li, Peng, Deepak Nijhawan, Imawati Budihardjo, Srinivasa M. Srinivasula, Manzoor Ahmad, Emad S. Alnemri, and Xiaodong Wang. 1997. “Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade.” *Cell* 91 (4): 479–89. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1).
- Li, S, and J M Rosen. 1995. “Nuclear Factor I and Mammary Gland Factor (STAT5) Play a Critical Role in Regulating Rat Whey Acidic Protein Gene Expression in Transgenic Mice.” *Molecular and Cellular Biology* 15 (4): 2063–70. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.4.2063>.
- Liberti, Maria V., and Jason W. Locasale. 2016. “The Warburg Effect: How Does It Benefit Cancer Cells?” *Trends in Biochemical Sciences* 41 (3): 211–18. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>.
- Liu, Xiuwen, Gertraud W. Robinson, Kay Uwe Wagner, Lisa Garrett, Anthony Wynshaw-Boris, and Lothar Hennighausen. 1997. “Stat5a Is Mandatory for Adult Mammary Gland Development and Lactogenesis.” *Genes and Development* 11 (2): 179–86. <https://doi.org/10.1101/gad.11.2.179>.
- López-Terrada, Dolores, Preethi H. Gunaratne, Adekunle M. Adesina, Joseph Pulliam, David M. Hoang, Yummy Nguyen, Toni-Ann Mistretta, Judith Margolin, and Milton J. Finegold. 2009. “Histologic Subtypes of Hepatoblastoma Are Characterized by Differential Canonical Wnt and Notch Pathway Activation in DLK+ Precursors.” *Human Pathology* 40

- (6): 783–94. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.07.022>.
- Lund, Leif R., John Rømer², Nicole Thomasset³, Helene Solberg², Charles Pyke², Mina J. Bissell, Keld Danø², and Zena Werb. 1996. “Two Distinct Phases of Apoptosis in Mammary Gland Involution: Proteinase-Independent and -Dependent Pathways.” *Development* 8 (9): 1385–95. <https://doi.org/10.2217/nm.12.167>.Gene.
- Lyons, Traci R., Jenean O’Brien, Virginia F. Borges, Matthew W. Conklin, Patricia J. Keely, Kevin W. Eliceiri, Andriy Marusyk, Aik Choon Tan, and Pepper Schedin. 2011. “Postpartum Mammary Gland Involution Drives Progression of Ductal Carcinoma in Situ through Collagen and COX-2.” *Nature Medicine* 17 (9): 1109–16. <https://doi.org/10.1038/nm.2416>.
- Martinson, Holly A., Sonali Jindal, Clarissa Durand-Rougely, Virginia F. Borges, and Pepper Schedin. 2015. “Wound Healing-like Immune Program Facilitates Postpartum Mammary Gland Involution and Tumor Progression.” *International Journal of Cancer* 136 (8): 1803–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.29181>.
- Matesanz, Nuria, Edgar Bernardo, Rebeca Acín-Pérez, Elisa Manieri, Sonia Pérez-Sieira, Lourdes Hernández-Cosido, Valle Montalvo-Romeral, et al. 2017. “MKK6 Controls T3-Mediated Browning of White Adipose Tissue.” *Nature Communications* 8 (1): 856. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00948-z>.
- McNally, Sara, and Torsten Stein. 2017. “Overview of Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1501:1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6475-8_1.
- Mei, Baisong, Ling Zhao, Li Chen, and Hei Sook Sul. 2002. “Only the Large Soluble Form of Preadipocyte Factor-1 (Pref-1), but Not the Small Soluble and Membrane Forms, Inhibits Adipocyte Differentiation: Role of Alternative Splicing.” *The Biochemical Journal* 364 (Pt 1): 137–44. <https://doi.org/10.1042/bj3640137>.
- Mendelson, Karen, Steven Swendeman, Paul Saftig, and Carl P. Blobel. 2010. “Stimulation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta (PDGFRbeta) Activates ADAM17 and Promotes Metalloproteinase-Dependent Cross-Talk between the PDGFRbeta and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Pathways.” *The Journal of Biological Chemistry* 285 (32): 25024–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102566>.
- Menendez, Javier A., and Ruth Lupu. 2007. “Fatty Acid Synthase and the Lipogenic Phenotype in Cancer Pathogenesis.” *Nature Reviews. Cancer* 7 (10): 763–77. <https://doi.org/10.1038/nrc2222>.
- Merrick, David, Alexander Sakers, Zhazira Irgebay, Chihiro Okada, Catherine Calvert, Michael P. Morley, Ivona Percec, and Patrick Seale. 2019. “Identification of a Mesenchymal Progenitor Cell Hierarchy in Adipose Tissue.” *Science (New York, N.Y.)* 364 (6438): eaav2501. <https://doi.org/10.1126/science.aav2501>.
- Micallef, Peter, Yanling Wu, Marco Bauzá-Thorbrügge, Belén Chanclón, Milica Vujičić, Eduard Peris, C. Joakim Ek, and Ingrid Wernstedt Asterholm. 2021. “Adipose Tissue-Breast Cancer Crosstalk Leads to Increased Tumor Lipogenesis Associated with Enhanced Tumor Growth.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (21): 11881. <https://doi.org/10.3390/ijms222111881>.
- Moody, Susan E., Christopher J. Sarkisian, Kristina T. Hahn, Edward J. Gunther, Steven Pickup, Katherine D. Dugan, Nathalie Innocent, Robert D. Cardiff, Mitchell D. Schnall, and Lewis A. Chodosh. 2002. “Conditional Activation of Neu in the Mammary Epithelium of Transgenic Mice Results in Reversible Pulmonary Metastasis.” *Cancer Cell* 2 (6): 451–61. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00212-X](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00212-X).
- Morandi, Andrea, Lesley-ann Martin, Qiong Gao, Sunil Pancholi, Alan Mackay, David Robertson, Marketa Zvelebil, Mitch Dowsett, Ivan Plaza-menacho, and Clare M Isacke. 2013. “GDNF – RET Signaling in ER-Positive Breast Cancers Is a Key Determinant of Response and Resistance to Aromatase Inhibitors.” *Cancer Research* 73 (7): 3783–96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4265>.

- Morrone, Manrico, Antonio Giordano, Maria Cristina Zingaretti, Romina Boiani, Rita De Matteis, Barbara B Kahn, Enzo Nisoli, et al. 2004. "Reversible Transdifferentiation of Secretory Epithelial Cells into Adipocytes in the Mammary Gland." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (48): 16801–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407647101>.
- Mortensen, Sussi B., Charlotte H. Jensen, Mikael Schneider, Mads Thomassen, Torben A. Kruse, Jorge Laborda, Søren P. Sheikh, and Ditte C. Andersen. 2012. "Membrane-Tethered Delta-like 1 Homolog (DLK1) Restricts Adipose Tissue Size by Inhibiting Preadipocyte Proliferation." *Diabetes* 61 (11): 2814–22. <https://doi.org/10.2337/db12-0176>.
- Mulligan, Lois M. 2014. "RET Revisited: Expanding the Oncogenic Portfolio." *Nature Reviews Cancer* 14 (3): 173–86. <https://doi.org/10.1038/nrc3680>.
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. The National Academies Collection: Reports Funded by National Institutes of Health. Washington (DC): National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>.
- Nguyen, Andrew V., and Jeffrey W. Pollard. 2000. "Transforming Growth Factor B3 Induces Cell Death during the First Stage of Mammary Gland Involution." *Development* 127 (14): 3107–18.
- Nieman, Kristin M., Hilary A. Kenny, Carla V. Penicka, Andras Ladanyi, Rebecca Buell-Gutbrod, Marion R. Zillhardt, Iris L. Romero, et al. 2011. "Adipocytes Promote Ovarian Cancer Metastasis and Provide Energy for Rapid Tumor Growth." *Nature Medicine* 17 (11): 1498–1503. <https://doi.org/10.1038/nm.2492>.
- Nigro, Cristiana Lo, Marta Rusmini, and Isabella Ceccherini. 2019. "RET in Breast Cancer: Pathogenic Implications and Mechanisms of Drug Resistance." *Cancer Drug Resistance* 2 (4): 1136–52. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.66>.
- Nueda, María-Luisa, Victoriano Baladrón, Beatriz Sánchez-Solana, María-Angeles Ballesteros, and Jorge Laborda. 2007. "The EGF-like Protein Dlk1 Inhibits Notch Signaling and Potentiates Adipogenesis of Mesenchymal Cells." *Journal of Molecular Biology* 367 (5): 1281–93. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.043>.
- Nueda, María-Luisa, Ana-Isabel Naranjo, Victoriano Baladrón, and Jorge Laborda. 2017. "Different Expression Levels of DLK1 Inversely Modulate the Oncogenic Potential of Human MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Inhibition of NOTCH1 Signaling." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31 (8): 3484–96. <https://doi.org/10.1096/fj.201601341RRR>.
- O'Brien, Jenean, Traci Lyons, Jenifer Monks, M. Scott Lucia, R. Storey Wilson, Lisa Hines, Yan Gao Man, Virginia Borges, and Pepper Schedin. 2010. "Alternatively Activated Macrophages and Collagen Remodeling Characterize the Postpartum Involuting Mammary Gland across Species." *American Journal of Pathology* 176 (3): 1241–55. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090735>.
- Osathanon, Thanaphum, Keskanya Subbalekha, Panunn Sastravaha, and Prasit Pavasant. 2012. "Notch Signalling Inhibits the Adipogenic Differentiation of Single-Cell-Derived Mesenchymal Stem Cell Clones Isolated from Human Adipose Tissue." *Cell Biology International* 36 (12): 1161–70. <https://doi.org/10.1042/CBI20120288>.
- Pagnotta, Priscila, Mariana Gantov, Sabrina Fletcher, Antonella Lombardi, María Lujan Crosbie, Natalia Santiso, Anabela Ursino, et al. 2023. "Peritumoral Adipose Tissue Promotes Lipolysis and White Adipocytes Browning by Paracrine Action." *Frontiers in Endocrinology* 14. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1144016>.
- Paulauskis, J. D., and H. S. Sul. 1988. "Cloning and Expression of Mouse Fatty Acid Synthase and Other Specific mRNAs. Developmental and Hormonal Regulation in 3T3-L1 Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 263 (15): 7049–54.
- Pecar, Geoffrey, Simeng Liu, Jagmohan Hooda, Jennifer M. Atkinson, Steffi Oesterreich, and

- Adrian V. Lee. 2023. "RET Signaling in Breast Cancer Therapeutic Resistance and Metastasis." *Breast Cancer Research* 25 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/s13058-023-01622-7>.
- Pennock, Nathan D., Holly A. Martinson, Qiuchen Guo, Courtney B. Betts, Sonali Jindal, Takahiro Tsujikawa, Lisa M. Coussens, Virginia F. Borges, and Pepper Schedin. 2018. "Ibuprofen Supports Macrophage Differentiation, T Cell Recruitment, and Tumor Suppression in a Model of Postpartum Breast Cancer." *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 6 (1): 98. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0406-y>.
- Pensa, Sara, Christine J. Watson, and Valeria Poli. 2009. "Stat3 and the Inflammation/Acute Phase Response in Involution and Breast Cancer." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 14 (2): 121–29. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9124-x>.
- Perou, C. M., T. Sørli, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, et al. 2000. "Molecular Portraits of Human Breast Tumours." *Nature* 406 (6797): 747–52. <https://doi.org/10.1038/35021093>.
- Pike Winer, Lisa S., and Min Wu. 2014. "Rapid Analysis of Glycolytic and Oxidative Substrate Flux of Cancer Cells in a Microplate." *PLoS ONE* 9 (10): e109916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109916>.
- Pittaway, James F. H., Constantinos Lipsos, Katia Mariniello, and Leonardo Guasti. 2021. "The Role of Delta-like Non-Canonical Notch Ligand 1 (DLK1) in Cancer," December. <https://doi.org/10.1530/ERC-21-0208>.
- Plaza-Menacho, I., A. Morandi, D. Robertson, S. Pancholi, S. Drury, M. Dowsett, L. A. Martin, and C. M. Isacke. 2010. "Targeting the Receptor Tyrosine Kinase RET Sensitizes Breast Cancer Cells to Tamoxifen Treatment and Reveals a Role for RET in Endocrine Resistance." *Oncogene* 29 (33): 4648–57. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.209>.
- Plaza-Menacho, Iván, Andrea Morandi, Luca Mologni, Piet Boender, Carlo Gambacorti-Passerini, Anthony I. Magee, Robert M.W. Hofstra, Phillip Knowles, Neil Q. McDonald, and Clare M. Isacke. 2011. "Focal Adhesion Kinase (FAK) Binds RET Kinase via Its FERM Domain, Priming a Direct and Reciprocal RET-FAK Transactivation Mechanism." *Journal of Biological Chemistry* 286 (19): 17292–302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168500>.
- Qian, Shuwen, Chenyang Zhang, Yan Tang, Mengyuan Dai, Zhihui He, Hong Ma, Linyuan Wang, et al. 2024. "A Single-Cell Sequence Analysis of Mouse Subcutaneous White Adipose Tissue Reveals Dynamic Changes during Weaning." *Communications Biology* 7 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06448-3>.
- Rahal, Rosemar Mac Edo Sousa, Ruffo De Freitas-Júnior, Luiz Carlos Da Cunha, Marise Amaral Rebouças Moreira, Victor Domingos Lisita Rosa, and Délio Marques Conde. 2011. "Mammary Duct Ectasia: An Overview." *Breast Journal* 17 (6): 694–95. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2011.01166.x>.
- Ramírez-Zacaría, J. L., F. Castro-Muñozledo, and W. Kuri-Harcuch. 1992. "Quantitation of Adipose Conversion and Triglycerides by Staining Intracytoplasmic Lipids with Oil Red O." *Histochemistry* 97 (6): 493–97. <https://doi.org/10.1007/BF00316069>.
- Reggiani, Francesca, Valentina Labanca, Patrizia Mancuso, Cristina Rabascio, Giovanna Talarico, Stefania Orecchioni, Andrea Manconi, and Francesco Bertolini. 2017. "Adipose Progenitor Cell Secretion of GM-CSF and MMP9 Promotes a Stromal and Immunological Microenvironment That Supports Breast Cancer Progression." *Cancer Research* 5 (2).
- Reichardt, Holger M., Jan P. Tuckermann, Martin G??ttlicher, Maja Vujic, Falk Weih, Peter Angel, Peter Herrlich, and G??nther Sch??tz. 2001. "Repression of Inflammatory Responses in the Absence of DNA Binding by the Glucocorticoid Receptor." *EMBO Journal* 20 (24): 7168–73. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7168>.
- Resemann, Henrike K., Christine J. Watson, and Bethan Lloyd-Lewis. 2014. "The Stat3 Paradox: A Killer and an Oncogene." *Molecular and Cellular Endocrinology* 382 (1): 603–11. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.029>.
- Ribeiro, Ricardo, Cátia Monteiro, Virgínia Cunha, Maria José Oliveira, Mariana Freitas, Avelino

- Fraga, Paulo Príncipe, et al. 2012. "Human Periprostatic Adipose Tissue Promotes Prostate Cancer Aggressiveness in Vitro." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 31 (1): 32. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-32>.
- Richert, Monica M., Kathryn L. Schwertfeger, Ryder John W., and Anderson Steven M. 2000. "An Atlas of Mouse Mammary Gland Development." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5 (May 2000): 36–43. <https://doi.org/10.1023/A>.
- Ricquier, D. 1999. "Uncoupling Protein-2 (UCP2): Molecular and Genetic Studies." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 23 Suppl 6 (June):S38-42. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800942>.
- Rivera-Gonzalez, Guillermo C., Brett A. Shook, Johanna Andrae, Brandon Holtrup, Katherine Bollag, Christer Betsholtz, Matthew S. Rodeheffer, and Valerie Horsley. 2016. "Skin Adipocyte Stem Cell Self-Renewal Is Regulated by a Pdgfa/Akt Signaling Axis." *Cell Stem Cell* 19 (6): 738–51. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.09.002>.
- Rolle, Anne-france Le, Thang K Chiu, Zhaoshi Zeng, Jinru Shia, R Martin, Philip B Paty, and Vi K Chiu. 2015. "Oncogenic KRAS Activates an Embryonic Stem Cell-like Program in Human Colon Cancer Initiation." *Oncotarget* 7 (3): 2159–74. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6818>.
- Rosen, E. D., P. Sarraf, A. E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D. S. Milstone, B. M. Spiegelman, and R. M. Mortensen. 1999. "PPAR Gamma Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue in Vivo and in Vitro." *Molecular Cell* 4 (4): 611–17. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80211-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80211-7).
- Rosen, E. D., and B. M. Spiegelman. 2001. "PPARgamma : A Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 37731–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100034200>.
- Sanjana, Neville E., Ophir Shalem, and Feng Zhang. 2014. "Improved Vectors and Genome-Wide Libraries for CRISPR Screening." *Nature Methods* 11 (8): 783. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3047>.
- Schedin, Pepper. 2006. "Pregnancy-Associated Breast Cancer and Metastasis." *Nature Reviews Cancer* 6 (4): 281–91. <https://doi.org/10.1038/nrc1839>.
- Schere-Levy, Carolina, Valeria Buggiano, Ana Quaglino, Albana Gattelli, Maria Cecilia Cirio, Isabel Piazzon, Silvia Vanzulli, and Edith C. Kordon. 2003. "Leukemia Inhibitory Factor Induces Apoptosis of the Mammary Epithelial Cells and Participates in Mouse Mammary Gland Involution." *Experimental Cell Research* 282 (1): 35–47. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5666>.
- Schindler, Christian, David E. Levy, and Thomas Decker. 2007. "JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines." *Journal of Biological Chemistry* 282 (28): 20059–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700016200>.
- Schmidt, Cameron A., Kelsey H. Fisher-Wellman, and P. Darrell Neuffer. 2021. "From OCR and ECAR to Energy: Perspectives on the Design and Interpretation of Bioenergetics Studies." *Journal of Biological Chemistry* 297 (4). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101140>.
- Schwalie, Petra C., Hua Dong, Magda Zachara, Julie Russeil, Daniel Alpern, Nassila Akchiche, Christian Caprara, et al. 2018. "A Stromal Cell Population That Inhibits Adipogenesis in Mammalian Fat Depots." *Nature* 559 (7712): 103–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0226-8>.
- Sentmanat, Monica F., Samuel T. Peters, Colin P. Florian, Jon P. Connelly, and Shondra M. Pruett-Miller. 2018. "A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing." *Scientific Reports* 8 (1): 888. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>.
- Sethi, Jaswinder K., and Antonio J. Vidal-Puig. 2007. "Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipose Tissue Function and Plasticity Orchestrate Nutritional Adaptation." *Journal of Lipid Research* 48 (6): 1253–62. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700005-JLR200>.

- Shalem, Ophir, Neville E. Sanjana, Ella Hartenian, Xi Shi, David A. Scott, Tarjei Mikkelsen, Dirk Heckl, et al. 2014. "Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells." *Science (New York, N.Y.)* 343 (6166): 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1247005>.
- Silberstein, Gary B, and Charles W Daniel. 1987. "Reversible Inhibition of Mammary Gland Growth by Transforming Growth Factor-." *Science*, 291–93.
- Smas, C. M., L. Chen, and H. S. Sul. 1997. "Cleavage of Membrane-Associated Pref-1 Generates a Soluble Inhibitor of Adipocyte Differentiation." *Molecular and Cellular Biology* 17 (2): 977–88. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.2.977>.
- Smas, C. M., L. Chen, L. Zhao, M. J. Latasa, and H. S. Sul. 1999. "Transcriptional Repression of Pref-1 by Glucocorticoids Promotes 3T3-L1 Adipocyte Differentiation." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (18): 12632–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12632>.
- Smas, C. M., D. Green, and H. S. Sul. 1994. "Structural Characterization and Alternate Splicing of the Gene Encoding the Preadipocyte EGF-like Protein Pref-1." *Biochemistry* 33 (31): 9257–65. <https://doi.org/10.1021/bi00197a029>.
- Smas, C. M., and H. S. Sul. 1993. "Pref-1, a Protein Containing EGF-like Repeats, Inhibits Adipocyte Differentiation." *Cell* 73 (4): 725–34. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90252-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90252-I).
- Soond, Surinder M., Bethany Everson, David W. H. Riches, and Gillian Murphy. 2005. "ERK-Mediated Phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-Converting Enzyme and Its Potential Role in TACE Protein Trafficking." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 11): 2371–80. <https://doi.org/10.1242/jcs.02357>.
- Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, et al. 2003. "Repeated Observation of Breast Tumor Subtypes in Independent Gene Expression Data Sets." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (14): 8418–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>.
- Sørli, Therese. 2007. "Molecular Classification of Breast Tumors: Toward Improved Diagnostics and Treatments." *Target Discovery and Validation Reviews and Protocols* 360:91–114. <https://doi.org/10.1385/1-59745-165-7:91>.
- Spiegelman, B. M., M. Frank, and H. Green. 1983. "Molecular Cloning of mRNA from 3T3 Adipocytes. Regulation of mRNA Content for Glycerophosphate Dehydrogenase and Other Differentiation-Dependent Proteins during Adipocyte Development." *The Journal of Biological Chemistry* 258 (16): 10083–89.
- Stein, Torsten, Joanna S Morris, Claire R Davies, Stephen J Weber-Hall, Marie-Anne Duffy, Victoria J Heath, Alexandra K Bell, Roderick K Ferrier, Gavin P Sandilands, and Barry A Gusterson. 2004. "Involution of the Mouse Mammary Gland Is Associated with an Immune Cascade and an Acute-Phase Response, Involving LBP, CD14 and STAT3." *Breast Cancer Research* 6 (2): R75–91.
- Stransky, Nicolas, Ethan Cerami, Stefanie Schalm, Joseph L. Kim, and Christoph Lengauer. 2014. "The Landscape of Kinase Fusions in Cancer." *Nature Communications* 5:1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms5846>.
- Subbiah, Vivek, Justin F. Gainor, Rami Rahal, Jason D. Brubaker, Joseph L. Kim, Michelle Maynard, Wei Hu, et al. 2018. "Precision Targeted Therapy with BLU-667 for RET-Driven Cancers." *Cancer Discovery* 8 (7): 836–49. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0338>.
- Sul, Hei Sook. 2009. "Minireview: Pref-1: Role in Adipogenesis and Mesenchymal Cell Fate." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 23 (11): 1717–25. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0160>.
- Sun, Chengyi, Hiromi Sakashita, Jang Kim, Zifeng Tang, G. Michael Upchurch, Longbiao Yao, William L. Berry, Timothy M. Griffin, and Lorin E. Olson. 2020. "Mosaic Mutant Analysis Identifies PDGFR α /PDGFR β as Negative Regulators of Adipogenesis." *Cell Stem Cell* 26 (5): 707-721.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.03.004>.
- Sun, Yingchao, Lei Yue, Pengfu Xu, and Weiling Hu. 2022. "An Overview of Agents and

- Treatments for PDGFRA-Mutated Gastrointestinal Stromal Tumors." *Frontiers in Oncology* 12 (August). <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.927587>.
- Tarrado-Castellarnau, Míriam, Pedro de Atauri, and Marta Cascante. 2016. "Oncogenic Regulation of Tumor Metabolic Reprogramming." *Oncotarget* 7 (38): 62726–53. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10911>.
- Thein, Kyaw Z., Vamsidhar Velcheti, Blaine H.M. Mooers, Jie Wu, and Vivek Subbiah. 2021. "Precision Therapy for RET-Altered Cancers with RET Inhibitors." *Trends in Cancer* 7 (12): 1074–88. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2021.07.003>.
- Thies, Katie A., Anisha M. Hammer, Blake E. Hildreth, Sarah A. Steck, Jonathan M. Spehar, Raleigh D. Kladney, Jennifer A. Geisler, et al. 2021. "Stromal Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Signaling Promotes Breast Cancer Metastasis in the Brain." *Cancer Research* 81 (3): 606–18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3731>.
- Timchenko, N. A., M. Wilde, M. Nakanishi, J. R. Smith, and G. J. Darlington. 1996. "CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha (C/EBP Alpha) Inhibits Cell Proliferation through the P21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) Protein." *Genes & Development* 10 (7): 804–15. <https://doi.org/10.1101/gad.10.7.804>.
- Topper, Y J, and C S Freeman. 1980. "Multiple Hormone Interactions in the Developmental Biology of the Mammary Gland." *Physiological Reviews* 60 (4): 1049–1106. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.4.1049>.
- Tozlu, S., I. Girault, S. Vacher, J. Vendrell, C. Andrieu, F. Spyrtos, P. Cohen, R. Lidereau, and I. Bieche. 2006. "Identification of Novel Genes That Co-Cluster with Estrogen Receptor Alpha in Breast Tumor Biopsy Specimens, Using a Large-Scale Real-Time Reverse Transcription-PCR Approach." *Endocrine-Related Cancer* 13 (4): 1109–20. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01120>.
- Traustadottir, Gunnhildur Asta, Rok Kosmina, Søren P. Sheikh, Charlotte H. Jensen, and Ditte C. Andersen. 2013. "Preadipocytes Proliferate and Differentiate under the Guidance of Delta-like 1 Homolog (DLK1)." *Adipocyte* 2 (4): 272–75. <https://doi.org/10.4161/adip.24994>.
- Turley, Shannon J., Viviana Cremasco, and Jillian L. Astarita. 2015. "Immunological Hallmarks of Stromal Cells in the Tumour Microenvironment." *Nature Reviews. Immunology* 15 (11): 669–82. <https://doi.org/10.1038/nri3902>.
- Twigger, Alecia-Jane, Lisa K. Engelbrecht, Karsten Bach, Isabel Schultz-Pernice, Sara Pensa, Jack Stenning, Stefania Petricca, Christina H. Scheel, and Walid T. Khaled. 2022. "Transcriptional Changes in the Mammary Gland during Lactation Revealed by Single Cell Sequencing of Cells from Human Milk." *Nature Communications* 13 (1): 562. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27895-0>.
- Umek, R. M., A. D. Friedman, and S. L. McKnight. 1991. "CCAAT-Enhancer Binding Protein: A Component of a Differentiation Switch." *Science (New York, N.Y.)* 251 (4991): 288–92. <https://doi.org/10.1126/science.1987644>.
- Vallone, Sabrina A, Martín García Solá, Carolina Schere-Levy, Roberto P Meiss, Gladys N Hermida, Lewis A Chodosh, Edith C Kordon, Nancy E Hynes, and Albana Gattelli. 2022. "Aberrant RET Expression Impacts on Normal Mammary Gland Post-Lactation Transition Enhancing Cancer Potential." *Disease Models and Mechanisms* 15 (3).
- Varešlija, Damir, Nolan Priedigkeit, Ailís Fagan, Siobhan Purcell, Nicola Cosgrove, Philip J. O'Halloran, Elspeth Ward, et al. 2019. "Transcriptome Characterization of Matched Primary Breast and Brain Metastatic Tumors to Detect Novel Actionable Targets." *Journal of the National Cancer Institute* 111 (4): 388–98. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy110>.
- Wang, Changyu, Jianjun Lv, Chengxu Xue, Jiawen Li, Yanqing Liu, Danni Xu, Yuting Jiang, et al. 2022. "Novel Role of COX6c in the Regulation of Oxidative Phosphorylation and Diseases." *Cell Death Discovery* 8 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01130-1>.

- Wang, Qiong A, Anying Song, Wanze Chen, Rana K Gupta, Bart Deplancke, Philipp E Scherer, Qiong A Wang, et al. 2018. "Reversible De-Differentiation of Mature White Adipocytes into Preadipocyte-like Precursors during Short Article Reversible De-Differentiation of Mature White Adipocytes into Preadipocyte-like Precursors during Lactation." *Cell Metabolism*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.022>.
- Wang, Yuan Yuan, Philippe Valet, Catherine Muller, Yuan Yuan Wang, Camille Attané, Delphine Milhas, Béatrice Dirat, et al. 2017. "Mammary Adipocytes Stimulate Breast Cancer Invasion through Metabolic Remodeling of Tumor Cells Find the Latest Version : Mammary Adipocytes Stimulate Breast Cancer Invasion through Metabolic Remodeling of Tumor Cells." *JCI Insight* 2 (4): 1–21.
- Wang, Yuhui, and Hei Sook Sul. 2006. "Ectodomain Shedding of Preadipocyte Factor 1 (Pref-1) by Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme (TACE) and Inhibition of Adipocyte Differentiation." *Molecular and Cellular Biology* 26 (14): 5421–35. <https://doi.org/10.1128/MCB.02437-05>.
- . 2009. "Pref-1 Regulates Mesenchymal Cell Commitment and Differentiation through Sox9." *Cell Metabolism* 9 (3): 287–302. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.01.013>.
- Wang, Yuhui, Ling Zhao, Cynthia Smas, and Hei Sook Sul. 2010. "Pref-1 Interacts with Fibronectin to Inhibit Adipocyte Differentiation." *Molecular and Cellular Biology* 30 (14): 3480–92. <https://doi.org/10.1128/MCB.00057-10>.
- Watson, Christine J. 2006. "Post-Lactational Mammary Gland Regression: Molecular Basis and Implications for Breast Cancer." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 8 (32): 1–15. <https://doi.org/10.1017/S1462399406000196>.
- Watson, Christine J., and Walid T. Khaled. 2020. "Mammary Development in the Embryo and Adult: New Insights into the Journey of Morphogenesis and Commitment." *Development (Cambridge, England)* 147 (22): dev169862. <https://doi.org/10.1242/dev.169862>.
- Wu, Jie, and Vivek Subbiah. 2023. "RETooling the RET Inhibitor Pralsetinib for ESR1 Fusion–Positive Breast Cancer and Beyond." *Cancer Research* 83 (19): 3159–61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-1021>.
- Wu, Sunny Z., Ghamdan Al-Eryani, Daniel Lee Roden, Simon Junankar, Kate Harvey, Alma Andersson, Aatish Thennavan, et al. 2021. "A Single-Cell and Spatially Resolved Atlas of Human Breast Cancers." *Nature Genetics* 53 (9): 1334–47. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00911-1>.
- Xiong, Y., D. L. Russell, L. T. McDonald, L. A. Cowart, and A. C. LaRue. 2017. "Hematopoietic Stem Cell-Derived Adipocytes Promote Tumor Growth and Cancer Cell Migration." *International Journal of Cancer Research and Molecular Mechanisms* 3 (1). <https://doi.org/10.16966/2381-3318.130>.
- Yanai, Hiroyuki, Koji Nakamura, Susumu Hijioka, Akira Kamei, Takaaki Ikari, Yuichi Ishikawa, Eiji Shinozaki, Nobuyuki Mizunuma, Kiyohiko Hatake, and Atsushi Miyajima. 2010. "Dlk-1, a Cell Surface Antigen on Foetal Hepatic Stem/Progenitor Cells, Is Expressed in Hepatocellular, Colon, Pancreas and Breast Carcinomas at a High Frequency." *Journal of Biochemistry* 148 (1): 85–92. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq034>.
- Yin, D., D. Xie, S. Sakajiri, C. W. Miller, H. Zhu, M. L. Popoviciu, J. W. Said, K. L. Black, and H. P. Koeffler. 2006. "DLK1: Increased Expression in Gliomas and Associated with Oncogenic Activities." *Oncogene* 25 (13): 1852–61. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209219>.
- Yu, Hua, and Richard Jove. 2004. "The Stats of Cancer - New Molecular Targets Come of Age." *Nature Reviews Cancer* 4 (2): 97–105. <https://doi.org/10.1038/nrc1275>.
- Zebisch, Katja, Valerie Voigt, Martin Wabitsch, and Matthias Brandsch. 2012. "Protocol for Effective Differentiation of 3T3-L1 Cells to Adipocytes." *Analytical Biochemistry* 425 (1): 88–90. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.005>.
- Zhu, Qingzhang, Yi Zhu, Chelsea Hepler, Qianbin Zhang, Jiyoung Park, Christy Gliniak, Gervaise H. Henry, et al. 2022. "Adipocyte Mesenchymal Transition Contributes to Mammary

- Tumor Progression." *Cell Reports* 40 (11).
- Zou, Xiang, Xi-Yu Tang, Zhong-Yuan Qu, Zhi-Wei Sun, Chen-Feng Ji, Yan-Jie Li, and Shou-Dong Guo. 2022. "Targeting the PDGF/PDGFR Signaling Pathway for Cancer Therapy: A Review." *International Journal of Biological Macromolecules* 202 (March):539–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.113>.
- Zwick, Rachel K, Michael C Rudolph, Brett A Shook, Brandon Holtrup, Eve Roth, Vivian Lei, Alexandra Van Keymeulen, et al. 2018. "Adipocyte Hypertrophy and Lipid Dynamics Underlie Mammary Gland Remodeling after Lactation." *Nature Communications*, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05911-0>.