

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

REGULACIÓN DE MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL POR PROGESTERONA EN CÁNCER DE MAMA

Prieto Filice, María Victoria – LU: 10898833

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Salatino, Mariana, IBYME

Co-Tutor:

Ferrari Costa, Alejandro, UADE

8 de octubre de 2021



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Resumen

Regulación de mecanismos de escape tumoral por progesterona en cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia entre las mujeres de todo el mundo, afectando a una de cada ocho mujeres. Hay numerosas evidencias de que los tumores logran escapar del ataque del sistema inmune o bien son susceptibles en un principio, pero luego del primer reconocimiento se hacen resistentes y así logran seguir creciendo. Es por esta razón que el mayor desafío de la inmunoterapia hoy en día consiste en comprender estos mecanismos de escape tumoral, para luego modular dichos procesos, lograr que el tumor sea reconocido y que, en consecuencia, el sistema inmune lo destruya. Previamente en nuestro laboratorio demostramos que galectina-1 contribuye significativamente al potencial inmunosupresor de células tumorales. Por otro lado, se ha demostrado que los esteroides ováricos, los estrógenos y la progesterona, regulan diferencialmente la expresión de galectina-1 en útero. Sin embargo, no existe hasta el momento ningún reporte en el que se haya demostrado la regulación de galectina-1 por hormonas esteroideas en cáncer de mama. Por lo tanto, planteamos nuestro principal objetivo: evaluar la regulación de la expresión de galectina-1 por progesterona en cáncer de mama hormono dependiente y su impacto funcional en mecanismos de escape tumoral.

Utilizamos diversos abordajes experimentales y técnicas para evaluar esta regulación; un modelo animal de carcinogénesis mamaria inducida por MPA en ratones BALB/c hembras, cultivos celulares, western blots, citometría de flujo y herramientas bioinformáticas.

Se corrobora, por medio de herramientas bioinformáticas, la existencia de factores de transcripción en el promotor de galectina-1 y el de CCL22, que pueden ser activados mediante la presencia de progesterona. Asimismo, observamos algunas diferencias significativas y una tendencia hacia un ambiente más inmunosupresor en el grupo tratado con MPA en contraste con el grupo control, al analizar por citometría de flujo. A pesar de que no fue posible rechazar o probar la hipótesis presentada, los resultados obtenidos son un comienzo prometedor para el estudio de la regulación de la expresión de galectina-1 por progesterona en cáncer de mama y su impacto funcional en mecanismos de escape tumoral.

Abstract**Regulation of tumoral escape mechanisms by progesterone in breast cancer**

Breast cancer is the cancer with the highest incidence among women worldwide, affecting one in eight women. There are numerous evidences that tumors manage to escape the attack of the immune system or are susceptible at first, but after the first recognition they become resistant and thus continue to grow. This is why, today the greatest challenge of immunotherapy consists in understanding these tumor escape mechanisms, to then modulate these processes, achieve tumor recognition and that, consequently, the immune system can destroy it. Previously in our laboratory, we demonstrated that galectin-1 contributed significantly to the immunosuppressive potential of tumor cells. On the other hand, it has been shown that ovarian steroids, estrogens and progesterone, differentially regulate the expression of galectin-1 in utero. However, to date there is no report that has demonstrated the regulation of galectin-1 by steroid hormones in breast cancer. Therefore, we propose our main objective: to evaluate the regulation of galectin-1 expression by progesterone in hormone-dependent breast cancer and its functional impact on tumor escape mechanisms.

We use various experimental approaches and techniques to evaluate this regulation; an animal model of MPA-induced mammary carcinogenesis in female BALB/c mice, cell cultures, western blots, flow cytometry and bioinformatics tools.

The existence of transcription factors in the galectin-1 promoter and the CCL22 promoter, which can be activated by the presence of progesterone, was confirmed by means of bioinformatics tools. Likewise, we observed some significant differences and a trend towards a more immunosuppressive environment in the group treated with MPA in contrast with the control group, when analyzed by flow cytometry. Although it was not possible to reject or test the hypothesis presented, the results obtained are a promising start for the study of the regulation of galectin-1 expression by progesterone in breast cancer and its functional impact on tumor escape mechanisms.

Contenidos

Introducción	5
Objetivos	6
Objetivo General	6
Objetivos específicos	6
Estado del Arte	7
1. Cáncer de mama	7
1.1. Conceptos generales	7
1.2. Cáncer de mama hormono dependiente	8
2. Progesterona	9
2.1. Conceptos generales	9
2.2. Receptores hormonales	10
3. Microambiente tumoral	11
4. Galectina 1	11
Hipótesis	12
Materiales y Métodos	12
Animales	12
Crecimiento de tumores	13
Extracción de tumores y ganglios	13
Cultivos Celulares	15
Western Blot	15
Citometría de Flujo	17
Sitios de unión de factores de transcripción	19
Análisis estadísticos	19
Resultados y discusiones	19
Tumores y tratamiento in vivo	19
Western Blot	20
<i>WB1</i>	20
<i>WB2</i>	23
<i>WB3</i>	24
<i>WB4</i>	26
<i>WB5</i>	26
Citometría de Flujo	28
<i>Tumor</i>	28
<i>Ganglio</i>	32
Sitios de unión de factores de transcripción	33
Conclusiones	34
Bibliografía	36

Introducción

La teoría de vigilancia inmunológica sostiene que el sistema inmune debería cumplir un rol protector frente al desarrollo tumoral. Sin embargo, numerosas evidencias indican que, por varias razones, el tumor logra escapar del ataque del sistema inmune o bien es susceptible en un principio, pero luego del primer reconocimiento se hace resistente, al seleccionarse aquellos clones capaces de no ser reconocidos. El mayor desafío de la inmunoterapia consiste en comprender estos mecanismos de escape tumoral mediante los cuales el tumor crea un “escudo” que lo mantiene aislado del sistema inmune, para luego modular dichos procesos, lograr que el tumor sea reconocido y que, en consecuencia, el sistema inmune lo destruya.

Las galectinas constituyen una familia de proteínas capaces de ejercer sus funciones a través del reconocimiento de glicoconjugados específicos. En nuestro laboratorio demostramos que galectina-1 (Gal-1), un miembro de esta familia contribuye significativamente al potencial inmunosupresor de células tumorales inhibiendo la respuesta inmunológica antitumoral in vivo e induciendo apoptosis de células Th1 y Th17 activadas, promoviendo la diferenciación de células T regulatorias e induciendo la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas, entre otros mecanismos. El bloqueo de Gal-1 en el tumor revierte este estado de supresión inmunológica, disminuye el crecimiento tumoral, las metástasis y promueve un incremento en la sobrevivencia de los animales tratados, sugiriendo que la expresión de Gal-1 por células tumorales podría constituir un nuevo mecanismo de escape tumoral.

Se ha demostrado que Gal-1 se expresa en diversos tipos de tumores, tales como carcinoma de próstata, ovario, vejiga, melanoma, mama, tiroides, páncreas, pulmón, HNSCC (cabeza y cuello) y linfoma de Hodgkin en forma proporcional a la agresividad de estos tumores y de su potencial metastático. La asociación entre la actividad inmunosupresora de Gal-1 y su expresión incrementada en tumores con alto potencial metastático, sugirió que la producción de esta proteína podría contribuir también al establecimiento de metástasis, a través de diversos mecanismos asociados con la invasión tumoral.

Se ha demostrado que los esteroides ováricos, los estrógenos (Es) y la progesterona (Pg), regulan diferencialmente la expresión de Gal-1 en útero. El tratamiento con el antiprogestágeno RU486, logró bloquear la expresión de Gal-1 inducida por Pg mientras que el antiestrógeno

puro ICI182780 bloqueó, por su lado, la inducción de Gal-1 mediada por estrógenos. La regulación de la expresión de Gal-1 por los esteroides sexuales en útero se correlacionó con el proceso de implantación.

El cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia entre las mujeres de todo el mundo afectando a una de cada ocho mujeres. La participación de las hormonas sexuales en la inducción y la progresión del cáncer de mama ha sido ampliamente documentada, y en nuestros días no existe duda alguna de que el efecto que dichos esteroides ejercen sobre el epitelio mamario a lo largo de la vida determina que el mayor índice de cáncer de mama se observe en la post-menopausia. Sin embargo, y a pesar de que se ha encontrado regulación en útero, no existe hasta el momento ningún reporte en el que se haya demostrado la regulación de Gal-1 por hormonas esteroideas en cáncer de mama. Por lo tanto, sabiendo que la expresión de Gal-1 en distintos tipos de cáncer se correlaciona con la progresión tumoral, la metástasis y la inhibición de la respuesta inmune antitumoral, planteamos nuestro principal objetivo.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar, utilizando diversos abordajes experimentales, la regulación de la expresión de Gal-1 por Pg en cáncer de mama hormono dependiente y su impacto funcional en mecanismos de escape tumoral.

Objetivos específicos

1. Evaluar la regulación de la expresión de Gal-1 en cáncer de mama hormono dependiente.
 - 1.1. Analizar los niveles de expresión de Gal-1 en células de cáncer de mama humano hormono dependiente.
 - 1.2. Evaluar la co-expresión de receptores hormonales y Gal-1 en dichas líneas tumorales.
2. Evaluar la regulación de la expresión de Gal-1 por Pg.
 - 2.1. Evaluar la capacidad de la Pg de regular la expresión de Gal-1.
 - 2.2. Evaluar la capacidad de la Pg de inducir la liberación de Gal-1.
 - 2.3. Evaluar la existencia de elementos respondedores a esteroides en el promotor de Gal-1 con herramientas de Bioinformatica.

3. Evaluar la regulación por Pg de la calidad y de la cantidad de infiltrado inmune en los tumores y en los ganglios ratones portadores de tumores de mama hormono dependientes.
 - 3.1. Evaluar la frecuencia de linfocitos T CD4, CD8 y T regulatorios.
 - 3.2. Evaluar el estado de exhaustamiento de los linfocitos CD8 y el perfil inmunosupresor de los linfocitos T regulatorios.
 - 3.3. Evaluar el infiltrado de macrófagos y células dendríticas.

Estado del Arte

1. Cáncer de mama

1.1. Conceptos generales

El cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en las mujeres y la principal causa de muerte por cáncer mundialmente es el cáncer de mama, representando más de 1 de 10 nuevos diagnósticos de cáncer cada año (Bray *et al*, 2018). Solo en Argentina alrededor de 21.000 mujeres son diagnosticadas cada año, representado el 17% del total de los canceres y casi un tercio de que afectan a las mujeres. A pesar de que los tratamientos convencionales han aumentado significativamente la sobrevida de las pacientes, alrededor del 35% de mortalidad aún ocurre en nuestro país (Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

Las causas del cáncer de mama son diversas; como en otros tipos de tumores los daños en el ADN y las mutaciones genéticas son los primeros eventos o drivers de la transformación neoplásica. Salvo excepciones, en cáncer de mama estos factores no son hereditarios y están más relacionados a factores ambientales o predisposición del individuo. Sin embargo, se sabe que los factores hereditarios aumentan el riesgo de desarrollo del cáncer, lo cual está relacionado con la mayor predisposición a padecer cáncer de mama. Dentro de los factores familiares hereditarios se incluyen los antecedentes familiares de cáncer de mama o de ovario con mutaciones heredadas como los genes pro-cancerosos *BRCA1* y *BRCA2* (Bray *et al*, 2018). Alrededor del 5 al 10% de los cánceres de mama están relacionados con mutaciones genéticas heredadas de uno de los padres, comúnmente en los genes pro-cancerosos *BRCA1* y/o *BRCA2* (Feng *et al*, 2018). En ausencia de mutaciones genéticas igualmente el riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta mucho al tener un pariente de primer grado (madre, hermana o hija) diagnosticado con el mismo.

El cáncer de mama evoluciona de forma silenciosa y generalmente es identificado durante exámenes de rutina. También es común que los pacientes encuentren accidentalmente un bulto en la mama, que presenten cambios en la forma o tamaño del mismo, o secreciones por el pezón.

Particularmente, siendo la mama un órgano “no vital” el problema de esta enfermedad radica en las recurrencias o metástasis que pueden amenazar la vida de las pacientes muchos años después de que el tumor primario ha sido extirpado. En este sentido, la medicina ha avanzado y muchas mujeres son diagnosticadas tempranamente o a tiempo como para evitar la enfermedad metastásica. Sin embargo, se ha demostrado que existen mecanismos que promueven la diseminación temprana y que determinan la presencia de células tumorales diseminadas en otros órganos vitales hasta cuando el tumor es considerado “in-situ” o no invasivo (Hüsemann *et al*, 2008; Hosseini *et al*, 2016; Harper *et al*, 2016).

1.2. Cáncer de mama hormono dependiente

Hace más de un siglo y medio que se habla sobre la existencia de una relación entre el cáncer de mama humano y las glándulas endocrinas. En 1836, Sir Astley Cooper observó que existía una correlación entre el crecimiento tumoral y el ciclo menstrual (Cooper *et al*, 1836). *La era moderna de la terapia endocrina para el cáncer de mama comenzó en 1951 cuando Huggins demostró que ciertos cánceres de mama sufrirían una remisión después de la extirpación de los ovarios y las glándulas suprarrenales*, postulando que esta remisión se debía al detenimiento de la producción de Estrogenos (Huggins y Bergenstal, 1952; Block *et al*, 1975).

Hoy en día se ya se sabe que el 70% de los cánceres de mama son “hormono dependientes” y son tratados con terapia endocrinas en general con buenos resultados (Beatson, 1896; Huggins y Bergenstal, 1952; Narod, 2011). El cáncer de mama se regula principalmente por estrógenos y progesterona, que se unen a sus respectivos receptores hormonales nucleares (ER y PR) regulando genes a través de interacciones proteína-ADN específicas (McDonnell *et al*, 1995). Los ER y PR se analizan de forma rutinaria como marcadores clínicos para determinar la posibilidad de administrar terapia endócrina a un paciente. Las pacientes que presentan tumores hormono independientes tienen asimismo otras opciones terapéuticas (Wittliff, 1984; Jensen, 1996; García-Becerra *et al*, 2012). Los niveles de expresión y el estado

de ER, PR y HER2 (un receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGF), a pesar de ser predictores imperfecto de la evolución de la enfermedad en los pacientes, son de los únicos factores de pronóstico biológico con aceptación general para su uso en la práctica clínica, junto con el índice Ki-67 (Gupta *et al*, 2015; Kalinina *et al*, 2021).

2. Progesterona

2.1. Conceptos generales

Los andrógenos, los estrógenos y progestágenos son las hormonas esteroideas sexuales (derivadas del colesterol) producidas principalmente por las gónadas (Cooper, 2000). Al ser compuestos de señalización, estas hormonas coordinan una multiplicidad de actividades fisiológicas dentro de las células eucariotas superiores (Tsai y O'Malley, 1994). Particularmente las hormonas esteroideas femeninas (Es y Pg) son las encargadas de regular en otras cosas la función, desarrollo y arquitectura de la glándula mamaria normal (Joshi *et al*, 2010). Además, ejercen un control clave en procesos patológicos siendo impulsoras del desarrollo de tumores en varios cánceres ginecológicos.

A pesar de que el efecto pro-tumoral de los Es ha sido estudiado en profundidad a lo largo de los años y se encuentra definida su regulación positiva sobre la sobrevivencia de células tumorales de mama (Clemons y Goss, 2001; Gompel, 2019), el estudio del rol que cumple la Pg todavía requiere de una mayor investigación. Las terapias de reemplazo hormonal combinada (que contienen Es y progestágenos) resultaron en un aumento del 26% en el riesgo de cáncer de mama después de 5 años de uso (Rossouw *et al*, 2002), siendo mayor el impacto de las terapias combinadas que el de la aplicación de monoterapia estrogénica (Breast cancer and hormone replacement therapy, 1997). Además, hace años se conoce que los anticonceptivos combinados incrementan el riesgo de cáncer de mama pre-menopáusico (Busund *et al*, 2018). Con estos resultados en mente, el incremento en el uso de anticonceptivos que solo contienen progestágenos plantea más preguntas sobre el potencial impacto de los mismos en la tumorigénesis mamaria. Varios estudios encuentran una relación entre el uso de levonorgestrel (derivado de la Pg) y un aumento en el riesgo de cáncer de mama (Soini *et al*, 2015; Zolfaroli *et al*, 2018). No obstante, no todos los estudios coinciden en que el uso de anticonceptivos orales incrementa el riesgo de cáncer de mama (Marchbanks *et al*, 2002) y el impacto de estas

terapias sobre la agresividad del cáncer de mama y el riesgo de recurrencia ha sido pobremente explorada.

La Pg, además de ejercer funciones como hormona sexual, es un potente modulador del sistema inmunitario, desplegando acciones directas sobre diversas células inmunológicas e induciendo a otras moléculas inmunomoduladoras. Por medio de estos mecanismos la Pg regula procesos como inflamación, autoinmunidad y respuesta inmune adaptativas (Hughes, 2012). La inmunomodulación ejercida por parte de la Pg en la glándula mamaria podría también afectar la inmunovigilancia y la formación de tumores. Recientemente se ha demostrado que ratones que sobreexpresan el PR tiene mayor formación de tumores y una menor activación inmune en la glándula mamaria (Werner 2021). Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre el rol de los PR en la promoción del desarrollo del cáncer de mama a través de la inmunomodulación, sin embargo, se requieren mas experimentos para comprender en profundidad este mecanismo (Werner *et al*, 2021).

2.2. Receptores hormonales

La vía general de la transcripción de genes mediada por PR se encuentra bien caracterizada. Al ser una hormona hidrofóbica la Pg penetra fácilmente en la membrana celular y una vez dentro de la célula, se une a PR induciendo cambios conformacionales del mismo. Esto promueve la disociación de un complejo de chaperonas, la homodimerización y la unión a elementos de respuesta de progesterona dentro del promotor de un gen blanco, activando su transcripción. Mediante este mecanismo, la Pg puede inducir un cambio a gran escala en las propiedades bioquímicas de una célula (Brown, 2002; Edwards *et al*, 2002).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea dentro de la cual el estado de los receptores hormonales nos permite clasificar distintos subgrupos: ER + PR +, ER + PR-, ER- PR + y ER- PR-. La proporción de los primeros dos aumenta con el aumento de la edad, mientras que la proporción de los otros dos subgrupos disminuye al aumentar la edad (Dunnwald *et al*, 2007). Como mencionamos previamente el papel del PR en cáncer de mama sigue siendo controversial y no se observa un patrón con respecto a la tasa de PR+ en los grupos de edad (Chow y Ho, 2000).

3. Microambiente tumoral

Una gran cantidad de células trabajan en conjunto para mantener la fisiología normal en los tejidos. Las mismas poseen identidad posicional, lo que indica que su posición está definida y su número limitado. Las células tumorales pierden estas limitaciones espaciales y proliferativas a partir de mutaciones oncogénicas y de genes supresores de tumores. A pesar de que la proliferación anormal característica de las células tumorales subyace en estas mutaciones, los tumores surgen y progresan dentro de un microambiente que está repleto de células sanas no transformadas (Dranoff, 2004; Joyce y Pollard, 2009).

El microambiente tumoral es una ecología compleja de células que evoluciona con las células tumorales. Su composición está regida por la producción de factores inmunosupresores por parte del tumor y la actividad de células reguladoras, tanto mieloides como linfoides. El sistema inmunológico interactúa con los tumores a lo largo de su desarrollo pudiendo inhibir el crecimiento y la progresión del tumor, o caso contrario promoviendo el progreso por medio de inflamación crónica y factores que impulsan el crecimiento, la supervivencia y la angiogénesis del tumor (Dougan y Dranoff, 2009; Hodi y Dranoff, 2010). El infiltrado inmunológico en tumores con mejor pronóstico o en procesos de regresión se caracteriza por la presencia de linfocitos T CD8 citotóxicos, macrófagos activados de forma clásica y células dendríticas maduras, entre otras poblaciones celulares (Bianchini *et al*, 2016). Mientras que, en el infiltrado de aquellos tumores que logran evadir el reconocimiento del sistema inmune, se suelen observar linfocitos T regulatorios, células mieloides supresoras, macrófagos activados alternativamente y linfocitos T exhaustos (Jiang *et al*, 2015; Noy y Pollard, 2014; Rivera *et al*, 2015).

4. Galectina 1

Las lectinas son proteínas que poseen la capacidad de descifrar la información biológica contenida en los patrones de glicosilación (Cagnoni *et al*, 2016). Dentro de las lectinas, las galectinas han cobrado gran importancia debido a su abundancia en microambientes tumorales e inflamatorios. Numerosas evidencias asignan a Gal-1, un miembro “proto-tipo” de la familia de galectinas, una función crítica en la homeostasis de la respuesta inmune e inflamatoria (Rabinovich *et al*, 2002). Esta proteína es capaz de inhibir la proliferación y expansión clonal de linfocitos T activados, mediante mecanismos que involucran bloqueo de la activación,

arresto del ciclo celular (Rabinovich *et al*, 1997) e inducción de apoptosis (Rabinovich *et al*, 1998).

Gal-1 se une específicamente a residuos LacNAc presentes en N-y O-glicanos de glicoproteínas de superficie. Por lo tanto, la acción de Gal-1 en el microambiente tumoral está altamente influenciada por el perfil de glicosilación de las células tumorales y del microambiente, el cual es consecuencia de la actividad de las distintas glicosiltransferasas durante la progresión tumoral (Cagnoni *et al*, 2016).

Gal-1 se expresa en forma abundante en sitios inmunológicamente privilegiados tales como placenta, ojo y testículo (Iglesis *et al*, 1998; Dettin *et al*, 2003; Romero *et al*, 2006). Asimismo, se ha observado que Gal-1 se expresa en forma abundante en diversos tipos de tumores tales como próstata, melanoma, ovario, vejiga, mama y tiroides y que su expresión se correlaciona con la malignidad de dichos tumores (Liu y Rabinovich, 2005). En cáncer de mama existe una asociación entre los subtipos moleculares más agresivos y la expresión de un determinado set de galectinas (Grosset *et al*, 2016). En este sentido, podemos considerar que las galectinas tendrían utilidad clínica como indicadores de la progresión de la enfermedad o bien como blancos terapéuticos. No solo esto, sino que la asociación entre la actividad inmunosupresora de Gal-1 y su expresión incrementada en tumores con alto potencial metastásico, sugirió que la producción de esta proteína podría constituir un mecanismo de escape tumoral, favoreciendo el establecimiento de metástasis, a través de la inhibición de la respuesta inmunológica efectora.

Hipótesis

Existe una regulación de la expresión de Gal-1 por Pg en cáncer de mama hormono dependiente, impactando funcionalmente en diversos mecanismos de escape tumoral.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizó un modelo de carcinogénesis mamaria inducida por MPA (17-acetato de medroxiprogesterona) (C4HD+) en ratones BALB/c hembras de 8-12 semanas, criados en el

bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) con un régimen de 12 h luz y de acuerdo a las guías de cuidados de animales del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH).

Crecimiento de tumores

Ratones hembras BALB/c fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilazina 5:1. Se inocularon fragmentos de tumores C4HD+ de manera subcutánea en la línea de las mamas con agujas de 25G.

El MPA se inoculó en forma de depot inyectando 100µl de una suspensión conteniendo 15mg de hormona. Los pellets de progesterona, norgestrel o mifepristona (Ru486) se prepararon pesando 15mg de hormona o 6mg de Ru486 cada 33mg de Fastix según descrito (Giulianelli et al., 2008; Lanari et al., 1986). Las drogas y el Fastix se mezclaron hasta obtener una pasta homogénea la cual fue colocada en un molde cuadrado calculando pellets cilindricos de 2mm de ancho x 1cm de alto x 2mm de espesor. La pasta se dejó secar durante la noche. Se cortaron los pellets de la medida necesaria utilizando una hoja de bisturí estéril. Los pellets fueron colocados en la región dorsal de los animales de manera subcutánea mediante el uso de un trocar de 10G.

Extracción de tumores y ganglios

Todos los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical a los 28 días. Se corto la piel de los mismos exponiendo los tumores y los ganglios axilares para su extracción.

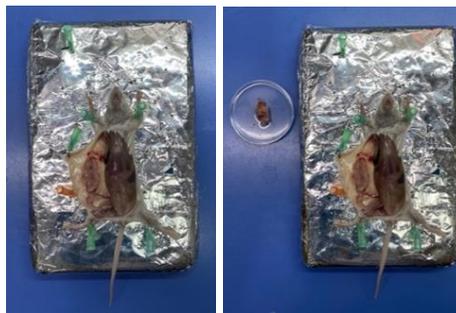


Figura 1. Ratón previa y posteriormente a la extracción tumoral. En la imagen de la derecha se observa el tumor en la placa de Petri con solución fisiológica (SF).

Disgregado de Tumores

Los tumores se colocaron en placas de Petri con SF. Se los corto en pedazos iguales, la mitad se llevo al freezer -70 °C para la posterior extracción de proteínas. La otra mitad se colocó en gentleMACS C Tubes con 1ml de solución enzimática (Colagenasa D 10X, DNAsa 1) para analizar el infiltrado tumoral, siguiendo el protocolo del gentleMACS dissociator para tumores de mama de ratones descripto a continuación.

1. Iniciar la disociación de los tumores ejecutando el programa gentleMACSm_impTumor_02 (2x).
2. Finalizado el programa, desconectar el tubo C del disociador gentleMACS.
3. Incubar la muestra durante 40 minutos a 37 °C en rotación continua utilizando el rotador de tubos MACSmixTM.
4. Colocar el tubo C en el disociador y correr el programa m_impTumor_04 (2x).
5. Terminado el programa, desconectar el tubo C del disociador y realizar una centrifugación corta para recolectar el material de muestra en la parte inferior del tubo.
6. Resuspender la muestra y pasarla por un MACS SmartStrainer (30 µm o 70 µm) colocado sobre un tubo de 15ml.
7. Lavar el MACS SmartStrainer con 10ml de DMEM.
8. Centrifugar la suspensión de células a 300 rpm durante 7 minutos. Aspirar el sobrenadante completamente.
9. Resuspender en 1 ml o 500 µl de PBS según pellet.
10. Pasar 400 µl de la resuspensión al tubo eppendorf correspondiente (previamente rotulado).
11. Centrifugar a 1000 rpm durante 8 minutos. Aspirar el sobrenadante completamente.
12. Resuspender en 400 µl de zombie. Pasados 15 minutos agregar 200 µl de buffer de citometría.
13. Proceder con la citometría de flujo.

Ganglios

Los ganglios se colocaron en tubos eppendorf con SF, donde fueron aplastados. Luego de la decantación de los fragmentos, se tomó el sobrenadante y se paso a otro tubo eppendorf.

Se centrifugó durante 8 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1ml de PBS 1X.

Cultivos Celulares

Las células T47D fueron adquiridas en ATCC. Se mantuvieron en DMEM F12 10% suero fetal bovino (SFB) (GIBCO). Los repiques fueron hechos con TrypLEExpress (GIBCO). Las células se lavaron con PBS o SF y luego se incubaron con TrypLEExpress durante 4 min a 37°C. Se diluyó la solución con medio completo.

Tratamiento

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y se dejaron adherir de la noche a la mañana. Al día siguiente se rotularon los pocillos; 2 pocillos control, MPA -7, MPA -8, Pg -7 y Pg -8, se retiró el medio de todos los pocillos, se lavaron con SF y a cada uno se le agregaron 2ml del medio correspondiente DMEM F12 10% SFB sin rojo fenol. Se trataron las células durante 24hs.

Western Blot

Extractos proteicos

Los extractos proteicos a partir de tumores fueron realizados homogenizando los mismos en tubos con buffer de lisis para proteínas (Tris-HCl pH 7,5 50mM, NaCl 150mM, EDTA 10mM, NP40 1%), sobre hielo. Los extractos se pasaron a tubos eppendorf, se vortexearon y dejaron reposar durante 10min y se centrifugaron a 14rpm, 4°C durante 15min. Se pasaron los sobrenadantes a nuevos tubos eppendorf.

Los extractos proteicos a partir de células en cultivo fueron preparados lisando las células en buffer de lisis de proteínas, agregado directamente en la placa de cultivo previamente lavada 2 veces con SF. Las placas se colocaron sobre hielo y las células se levantaron utilizando un rastrillo para células o scrapper. Los extractos se pasaron a tubos eppendorf, se vortexearon y dejaron reposar durante 10min. Luego se centrifugaron a 14rpm, 4°C durante 15min. Se pasaron los sobrenadantes a nuevos tubos eppendorf.

Cuantificación de proteínas

Se cuantificó la concentración de proteínas en los mismos mediante un ensayo comercial de MicroBCA con curva estándar de BSA según las instrucciones de fabricante (ThermoScientific). Las lecturas se hicieron a una λ de 595nm en un espectrofotómetro de placa Multiskan MS Microplatereader (Thermo). Los valores de concentración se calcularon intrapolando las absorbancias de las muestras en la curva de calibración.

Corrida electroforética

Los extractos proteicos obtenidos se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). Para ello se sembraron entre 20 μ g-50 μ g de proteína por muestra previamente desnaturalizada con buffer de siembra 2x (BIO-RAD) por 5min a 100°C. Se procuró que los volúmenes de siembra fueran iguales para todas las muestras. Se utilizó Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker - Full range como marcador de peso molecular de 12kDa-225kDa.

Gel de resolución 12%: Acrilamida 30%/N'N'-Bis-Acrilamida 0,8% 4ml, Buffer Resolución (Tris 1,5M, SDS 0,2%p/v pH 8.8) 2,5ml, Agua 3,3ml, SDS 10% 100 μ l, TEMED 10 μ l, APS 10% 70 μ l.

Gel de resolución 15%: Acrilamida 30%/N'N'-Bis-Acrilamida 0,8% 5ml, Buffer de Resolución 2,5ml, Agua 2,3ml, SDS 10% 100 μ l, TEMED 10 μ l, APS 10% 70 μ l.

Gel de concentración: Acrilamida 30%/N'N'-Bis-Acrilamida 0,8% 650 μ l, Buffer de concentración (Tris 0,5M, SDS 0,4%p/v pH 6.8) 1,25ml, Agua 3ml, SDS 10% 50 μ l, TEMED 10 μ l, APS 10% 50 μ l.

La corrida electroforética se realizó a 150V constantes durante 60-90 minutos en buffer de corrida (Tris 25mM, Glicina 195mM, 0,1% SDS). Las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) en buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 195mM, 20% Metanol) a 100V constantes durante 60-90 minutos. La transferencia fue monitoreada por tinción de las membranas con Rojo Ponceau. Luego se lavaron las membranas

en TBS Tween (NaCl 150mM, Tris 50mM pH 7,4, Tween 20 0,1% v/v) y se conservaron en heladera o se utilizaron inmediatamente.

Expresión proteica por quimioluminiscencia

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Origen	Anticuerpo primario (dilución)	Anticuerpo Secundario (dilución)
Anti-Gal-1	Conejo	PBST 2h TA (1/1000)	PBST 1h TA (1/2000)
Anti-CCL21	Conejo	PBST 2h TA (1/1000)	PBST 1h TA (1/2000)
Anti- α -tubulina	Ratón	PBST 2h TA (1/1000)	PBST 1h TA (1/2000)
Anti- α -actina	Conejo	PBST 2h TA (1/2000)	PBST 1h TA (1/2000)
Anti-Progesterone Receptor (PR)	Ratón	PBST 2h TA (1/200)	PBST 1h TA (1/2000)
Anti- β -actina	Ratón	PBST 2h TA (1/2000)	PBST 1h TA (1/2000)

Tabla 1. Detalle de los anticuerpos y protocolos utilizados para el Western blot.

Las diluciones fueron realizadas respecto a su concentración de almacenamiento.

TA: Temperatura ambiente

Se utilizó PBST, 5% leche descremada para el bloqueo de las membranas overnight en frío. Previo a la incubación con el anticuerpo primario se realizó un lavado con PBST, luego de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados con PBST y luego de la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron dos lavados con PBST y uno con PBS. Las membranas fueron reveladas utilizando sustrato quimioluminiscente (Millipore) en G-box. Las imágenes se analizaron en ImageJ.

Citometría de Flujo

Se utilizaron 3 placas de cultivo celular de 96 wells con v-bottom. Una para los macrófagos de tumor, otra para las células dendríticas y CD8 de tumor y la última para las células T regulatorias (Tregs) de tumor y de ganglio. Los anticuerpos fueron preparados 1/200 en buffer de citometria (PBS-BSA 0,5%), con excepción de anti-FOXP3 que se utilizó 1/100.

Se pipetearon 140 μ l de infiltrado tumoral o suspensión de ganglios según correspondía en cada well. Se centrifugaron las tres placas y se descartó el sobrenadante por volcado.

Tregs: Cada well de la placa de Tregs se resuspendió en 50 μ l de la dilución de anticuerpos anti-CD8 y anti-CD45 para tumor y solo anti-CD8 para ganglio. Se incubó en heladera durante 25 minutos, se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió en 100 μ l de 1+3 DILUENT, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 μ l de permeabilizante durante 15 minutos. Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 50 μ l de permeabilizante 10X con anticuerpos anti-CD4, anti-FOXP3 y anti-CTLA4. Se incubó en heladera durante 30 minutos. Se centrifugó una vez más, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en buffer de citometría.

CD y CD8: Para marcar células dendríticas (CD) y CD8 cada well de la placa se resuspendió en 50 μ l de los anticuerpos correspondientes. Para CD8 se utilizaron: anti-CD45, anti-CD8, anti-PD1 y anti-TIM3. Para las dendríticas se utilizaron: anti-CD45, anti-CD11c, anti-1Ab, anti-CD103, anti-CD4 y anti-CD8. Además, se realizó un negativo de anti-1Ab y anti-CD103 (well con los demás anticuerpos excepto estos dos).

Macrófagos; Cada well de la placa para macrófagos se resuspendió en 50 μ l de anti-CD45, anti-CD11b, anti-F480, anti-1Ab, anti-CD206, anti-CD86. Además, se realizó un negativo de anti-CD206, anti-CD86 y anti-1Ab (well con los demás anticuerpos excepto estos tres).

Posteriormente, la placa para CD8 y dendríticas y la placa para macrófagos, fueron fijadas en solución de fijación 4x (PFA 4%) diluyendo en PBS. Se incubó durante 15 minutos, se centrifugó y se resuspendió en buffer de citometría.

El citómetro de flujo utilizado fue BD FACSCanto II. Se pipeteó el contenido cada well en un tubo de citometría y se pasaron las muestras por el citómetro. Los resultados fueron analizados con el programa FlowJo (10.7.2) BD Company.

Sitios de unión de factores de transcripción

Se utilizó la herramienta de MatInspector del Genomix Software Suite y el database de TRANSFAC para hacer un análisis de los sitios de unión de factores de transcripción en el promotor del gen que codifica para Gal-1 en humanos (LGALS1) y en ratón (lgals1), y CCL22 en humanos.

Análisis estadísticos

Se utilizó el programa Prism 10.

Resultados y discusiones

Tumores y tratamiento in vivo

Para comenzar con nuestros experimentos inoculamos los tumores C4HD+ de manera subcutánea en la línea de las mamas en ratones hembras BALB/c, además de MPA en forma de depot en la región dorsal de manera subcutánea. A los 28 días se realizó el sacrificio de los mismos para la extracción de los tumores y de los ganglios axilares. Se procedió con la extracción de proteínas de los tumores, para ser analizadas mediante los WB descritos a continuación. Además, parte de los tumores fueron sometidos al protocolo para análisis del infiltrado tumoral por citometría de flujo. Los ganglios también fueron procesados para su análisis correspondiente por citometría de flujo.

En la figura 2 podemos observar el crecimiento tumoral durante el tratamiento, idealmente se hubieran tomado mediciones de los mismos a lo largo del tiempo, sin embargo, por limitaciones en la asistencia al laboratorio por la situación de la pandemia esto no fue posible. En la figura 3 observamos el peso tumoral de los grupos control y MPA al momento de extracción. Observamos que los tumores del grupo MPA tienden a ser más pesados que los del control. Por tratarse de un tumor hormono dependiente, al extirpar el pellet de hormona la ausencia de MPA circulante provoca una detención en el crecimiento tumoral de los ratones del grupo control.

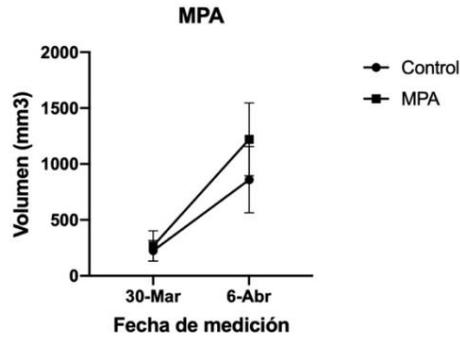


Figura 2. Gráfico generado en Prism 10 con el volumen tumoral (mm³) de los ratones control y tratados con MPA. Se observa la media y el desvío standard.

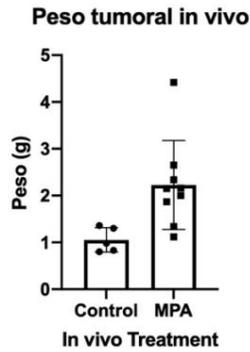


Figura 3. Gráfico generado en Prism 10 con el peso tumoral (g) al momento de extracción, de los ratones control y tratados con MPA. Se observa la media y el desvío standard.

Western Blot

WBI

La siguiente curva de calibración fue utilizada para cuantificar la concentración de los extractos de proteínas de los tumores C4HD.

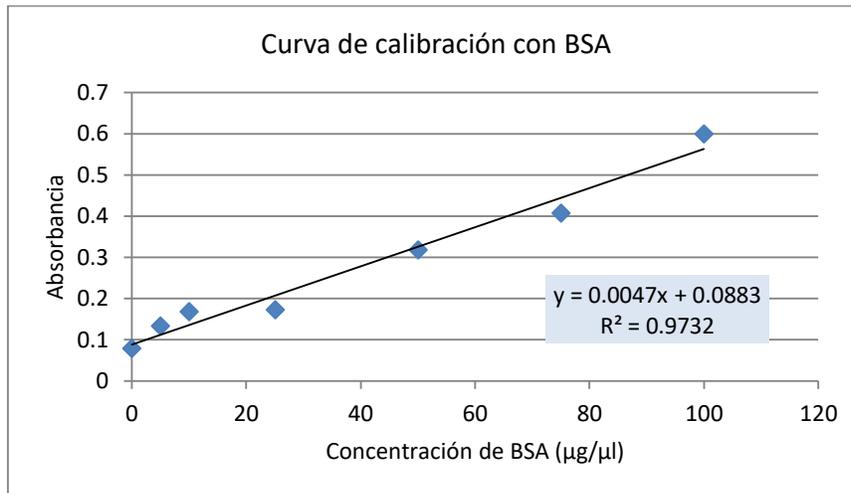


Figura 4. Curva de calibración para la cuantificación de extracto de proteínas de tumores C4HD.

Muestra	Abs	(µg/µl)	20µg (µl)	a 10µl con LB2X (µl)
Control 1	0,803	30,6	0,7	9,3
Control 2	0,480	16,9	1,2	8,8
Control 3	0,426	14,6	1,4	8,6
Control 4	0,486	17,1	1,2	8,8
Control 5	0,682	25,5	0,8	9,2
MPA 1	0,395	13,3	1,5	8,5
MPA 2	0,471	16,5	1,2	8,8
MPA 3	0,494	17,5	1,1	8,9
MPA 4	0,414	14,1	1,4	8,6

Tabla 2. Resultados de la cuantificación de proteínas. Se calcula el volumen necesario para sembrar 20µg de proteína por columna y llevar el volumen a 10µl con loading buffer 2X.

Se realizan electroforesis en geles de poliacrilamida y se transfiere a membrana, se bloquea overnight con leche y luego se incuba con los anticuerpos según la tabla de Mat y Met. Los resultados, luego del revelado en Gbox, del Western Blot realizado con los datos de la tabla anterior se observan a continuación. En los mismos, evaluamos la expresión de Gal-1 y CCL21,

una quimocina relevante en cáncer de mama, en extractos de proteínas de tumores C4HD, en condiciones control y de tratamiento con MPA. En la figura 5 observamos que las bandas correspondientes a CCL21 son muy tenues, hay mucho *background noise* y una de las bandas esta dando mucha señal. Suponemos que el anticuerpo utilizado no se encontraba en buenas condiciones. Por lo tanto, no se realizó el análisis estadístico del mismo.

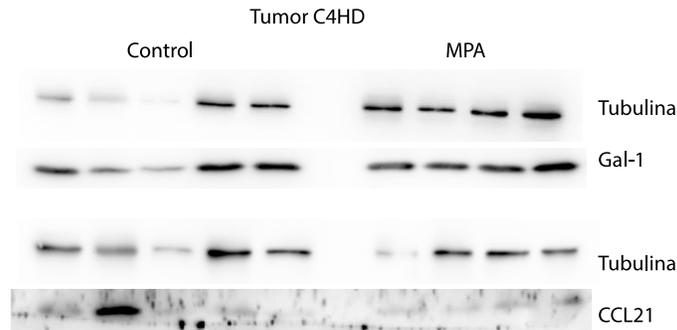


Figura 5. Western Blot para Gal-1 y CCL21, realizado con extracto de proteínas de tumores C4HD. Se utiliza Tubulina como control de carga. Las primeras 5 columnas corresponden a los tumores de ratones control mientras que las ultimas 4 columnas corresponden a los tumores de ratones tratados con MPA.

En la figura 6 donde cuantificamos los niveles de expresión de Gal-1 determinados por Western Blot en los extractos de proteínas de tumores C4HD observamos que los mismos son mayores en el control en comparación con el de los ratones tratados con MPA. Este resultado no fue el esperado, siendo que nosotros proponemos que existe una regulación positiva de la expresión de Gal-1 por Pg en cáncer de mama hormono dependiente y experimentos previos de nuestro laboratorio lo corroboraron, impactando funcionalmente a mecanismos de escape tumoral por la actividad inmunosupresora de Gal-1. Cabe mencionar que estos resultados no son significativos, debido a la falta de repeticiones.

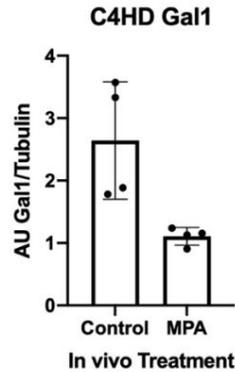


Figura 6. Gráfico generado en Prism 10 con los datos de la densitometría del WB1 para Gal-1. Se observa la media y el desvío standard.

WB2

Luego repetimos el Western Blot de Gal-1 y además (Fig. 7) evaluamos la expresión de PR en los mismos extractos de proteína de tumores C4HD, en condiciones control y de tratamiento con MPA. Observamos que Gal-1 nuevamente cuenta con bandas nítidas, mientras que PR tiene algo de *background noise* y las columnas 8 y 9 no se observan, debido probablemente a la presencia de una burbuja en el momento de la transferencia.

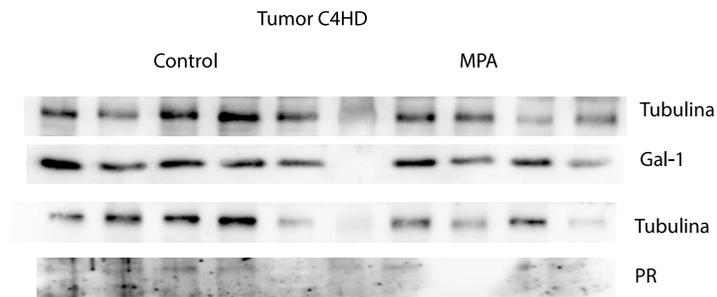


Figura 7. Western Blot para Gal-1 y PR, realizado con extracto de proteínas de tumores C4HD. Se utiliza Tubulina como control de carga. Las primeras 5 columnas corresponden a los tumores de ratones control mientras que las ultimas 4 columnas corresponden a los tumores de ratones tratados con MPA.

En los gráficos de la cuantificación de bandas luego del análisis estadístico realizado con Prism 10 (Fig. 8) observamos que, los niveles de Gal-1 en los extractos de proteínas de

tumores C4HD son levemente mayores en el caso del tratamiento con MPA, en comparación con el control del tratamiento in vivo. En el caso de PR, los niveles del mismo son menores en los extractos de proteínas de ratones tratados con MPA, en contraste con los del control. Esto concuerda con lo esperado, ya que al tratar a las células que expresan PR con su hormona correspondiente (en este caso utilizamos MPA), esperaríamos que el receptor se regule negativamente al activarse. La calidad de las bandas del PR no fue la mejor y se debería volver a realizar el WB para obtener resultados más confiables, además de llevar a cabo repeticiones para poder contar con datos significativos.

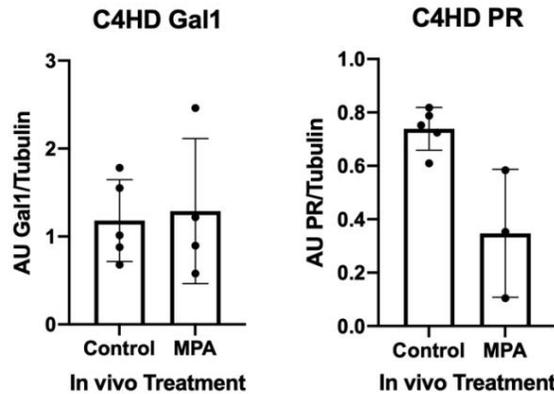


Figura 8. Gráficos generados en Prism 10 con los datos de la densitometría del WB2 para Gal-1 y PR. Se observa la media y el desvío standard.

WB3

Posteriormente realizamos cultivos de líneas MCF-7, las cuales tratamos in vitro con MPA en distintas concentraciones. El western Blot 3 (Fig. 9) fue realizado con extracto de proteínas de cultivo celular MCF-7, para evaluar la expresión de Gal-1 y CCL21 en condiciones control y de distinta concentración de MPA o Pg.

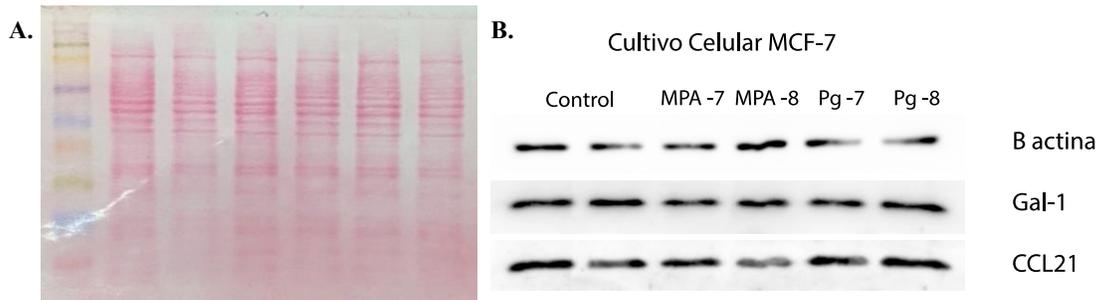


Figura 9. **A.** Control de transferencia del Western Blot con Rojo Ponceau. **B.** Western Blot para Gal-1 y CCL21, realizado con extracto de proteínas de cultivo celular MCF-7. Se utiliza B actina como control de carga. Las primeras dos columnas corresponden a los pocillos control, las demás corresponden a las células tratadas con distintas concentraciones de MPA o Pg.

Observando la cuantificación de los WB (Fig. 10) vemos que, el mayor nivel de expresión de Gal-1 se encuentra en condiciones de exposición del cultivo a Pg -8M, seguido del control, MPA -7M, Pg -7M y siendo el nivel más bajo en presencia de MPA -8M. En el gráfico correspondiente a CCL21 observamos el mayor nivel del mismo en presencia de Pg -8M y el menor con MPA -7M, como fue el caso de Gal-1. CCL21 Chemokine (C-C motif) ligand 21 pertenece a una familia de quimiocinas cuyo receptor es el CCR7 y posee con relevancia en cáncer de mama debido a su capacidad de modular el tráfico linfocitario al tumor o bien dirigir a las células tumorales al ganglio metastásico (Tutunea-Fatan *et al*, 2015).

Tanto para Gal-1 como para CCL21, esperaríamos encontrar niveles más altos en presencia de MPA o Pg en relación con el control. Una vez más, es necesario realizar repeticiones de este experimento para obtener datos significativos y poder hacer un buen análisis.

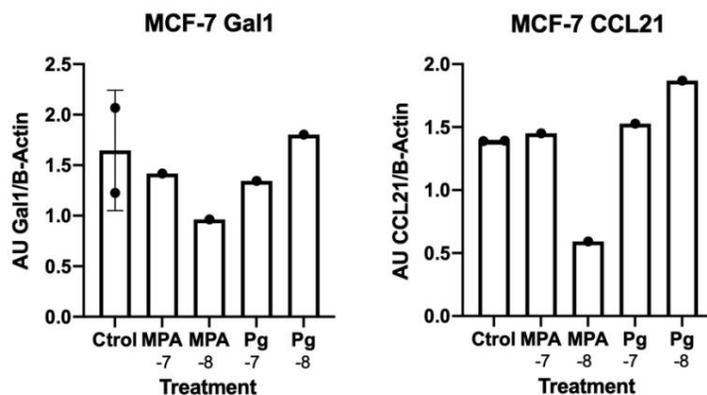


Figura 10. Gráfico generado en Prism 10 con los datos de la densitometría del WB3 para Gal-1 y CCL21. Se observa la media y el desvío standard.

WB4

Luego realizamos un cultivo de células T47D. El Western Blot numero 4 con extracto de proteínas de cultivo celular T47D fue realizado para evaluar la expresión de Gal-1, utilizando en este caso B-actina como control de carga. El mismo se realizó por duplicado, ambas veces no se observaron bandas debido a problemas técnicos.

WB5

El último Western Blot fue llevado a cabo para medir nuevamente la expresión de Gal-1 y CCL21 en extracto de proteínas de tumores C4HD. En este caso se repitió tratamiento in vivo de los ratones portando tumores C4HD pero se trató un numero mayor de ratones con MPA para aumenta el n del experimento. Los ratones de este experimento fueron divididos en dos grupos: control (n=5) y tratamiento con MPA (n=9).

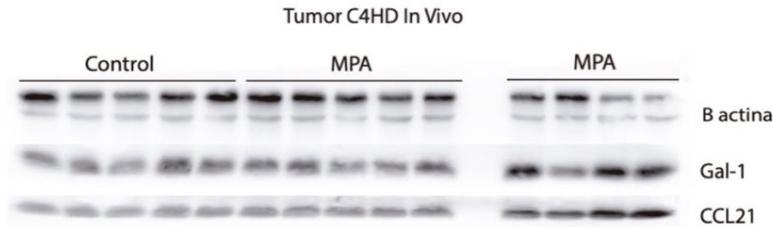


Figura 11. Western Blot para Gal-1 y CCL21, realizado con extracto de proteínas de tumores C4HD. Se utiliza B actina como control de carga. Las primeras 5 columnas corresponden a los tumores de ratones control, las siguientes 9 columnas corresponden a los tumores de ratones tratados con MPA.

En la figura 12 observamos que, los niveles de CCL21 en los extractos de proteínas de tumores C4HD son significativamente mayores en el tratamiento con MPA en contraste con el control. En el caso de Gal-1, aunque no se observa una diferencia significativa, vemos que hay una tendencia de mayor nivel de Gal-1 en los ratones tratados. Nuevamente es necesario realizar repeticiones del mismo experimento para así poder definir si esta diferencia es solo una tendencia o si es significativa (como pensamos que debería ser en base a la bibliografía y a experimentos previos realizados en nuestro laboratorio).

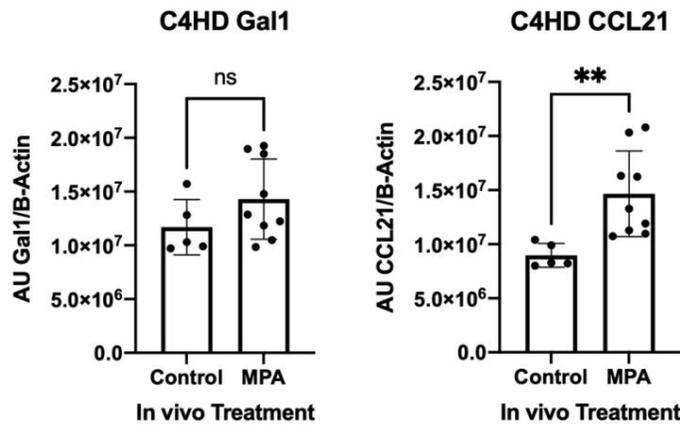


Figura 12. Gráficos generados en Prism 10 con los datos de la densitometría del WB5 para Gal-1 y CCL21. Se observa la media y el desvío standard.

Citometría de Flujo

Debido a que nuestro objetivo era determinar si la administración de MPA modificaba el microambiente tumoral, comenzamos a estudiar el infiltrado más relevante en respuesta inmune antitumoral. Los resultados se observan a continuación.

Tumor

Primero determinamos el infiltrado inmune en disgregados de los tumores tratados o no con MPA tal como se describió en Materiales y Métodos.

CD8

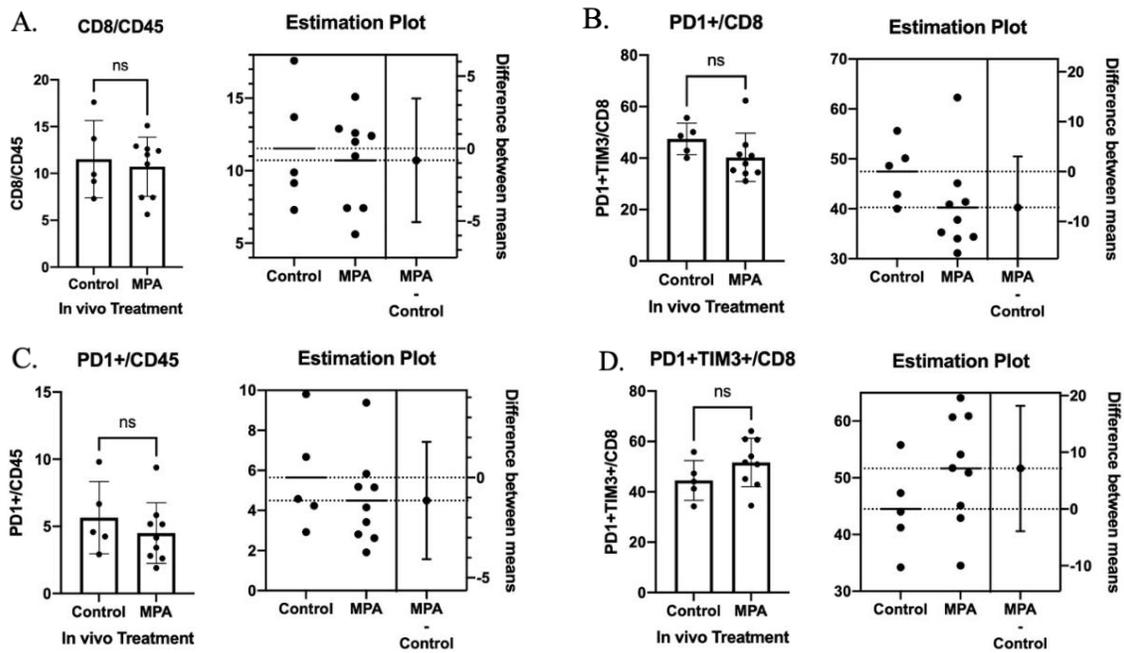


Figura 13. Gráficos generados en Prism 10 con los datos de salida del citómetro de flujo, al pasar la placa para las CD8 de tumor. Se observa la media y el desvío standard.

Primero evaluamos el % de células CD8+ citotóxicas que infiltran a tumor. Observamos que en la figura 13 ninguna de las diferencias es significativa. El número de células CD8+ infiltrantes de tumor no se vio modificado con el MPA (Fig. 13A). Así mismo, el número de las CD8+ que además eran PD1+ TIM3+ tampoco se vio modificado (Fig. 13D), si bien se

observa una tendencia a que aumenten en el grupo tratado. Este subgrupo de CD8 se trata de los CD8 exhaustos los cuales se encuentran normalmente en el microambiente tumoral y son incapaces de ejercer su actividad citotóxica.

CD4

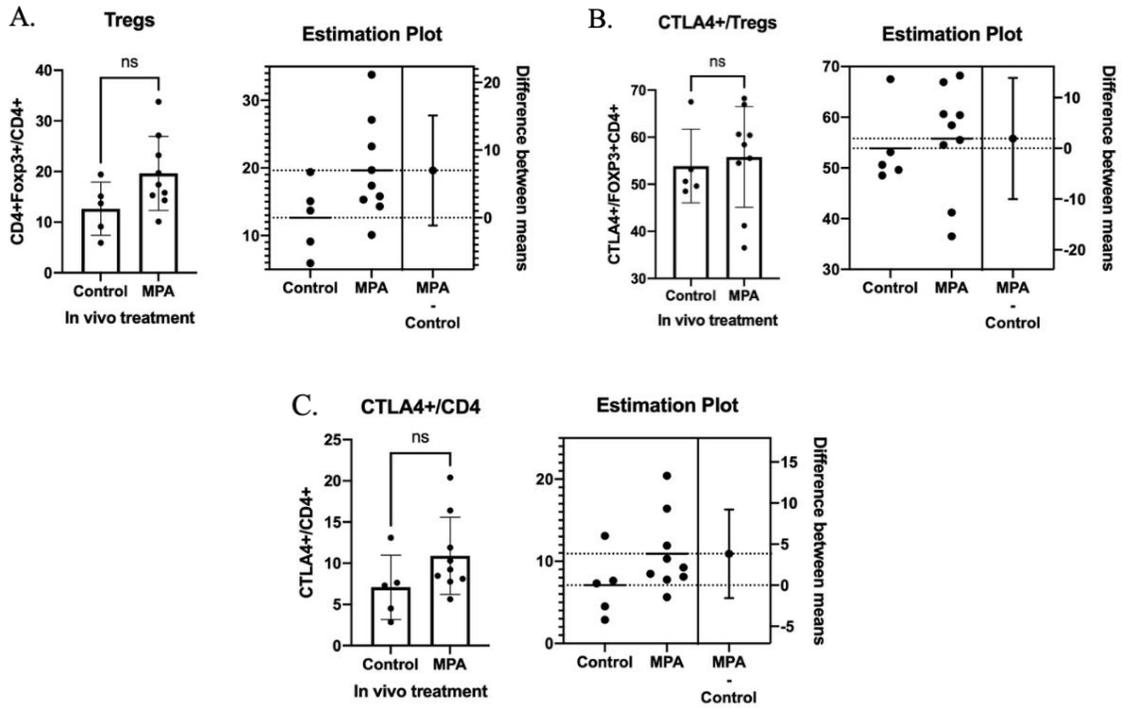


Figura 14. Gráficos generados en Prism 10 con los datos de salida del citómetro de flujo, al pasar la placa para las Tregs de tumor. Se observa la media y el desvío standard.

Luego proseguimos con las células CD4+Foxp3+ que son las T regulatorias (Tregs), un grupo de linfocitos T altamente supresores con relevancia en cáncer de mama que expresan el factor de transcripción distintivo Foxp3. Las diferencias entre los infiltrados de Tregs de los tumores control y los tratados con MPA no dieron significativas. Sin embargo, observamos una tendencia de aumento de Tregs y de CTLA4+ dentro de los Tregs y de los CD4, en el grupo tratado con MPA. CTLA4 es una proteína expresada en la membrana celular de los Tregs que produce una señal de co-estimulación negativa, inhibiendo la activación de los linfocitos T (tanto CD8 como CD4). Con lo cual una mayor expresión de CTLA4 se correlaciona con un

ambiente más inhibitorio. Cabe mencionar que en experimentos previos de nuestro laboratorio, observamos diferencias significativas en las Tregs entre los grupos control y tratado con MPA.

Células dendríticas

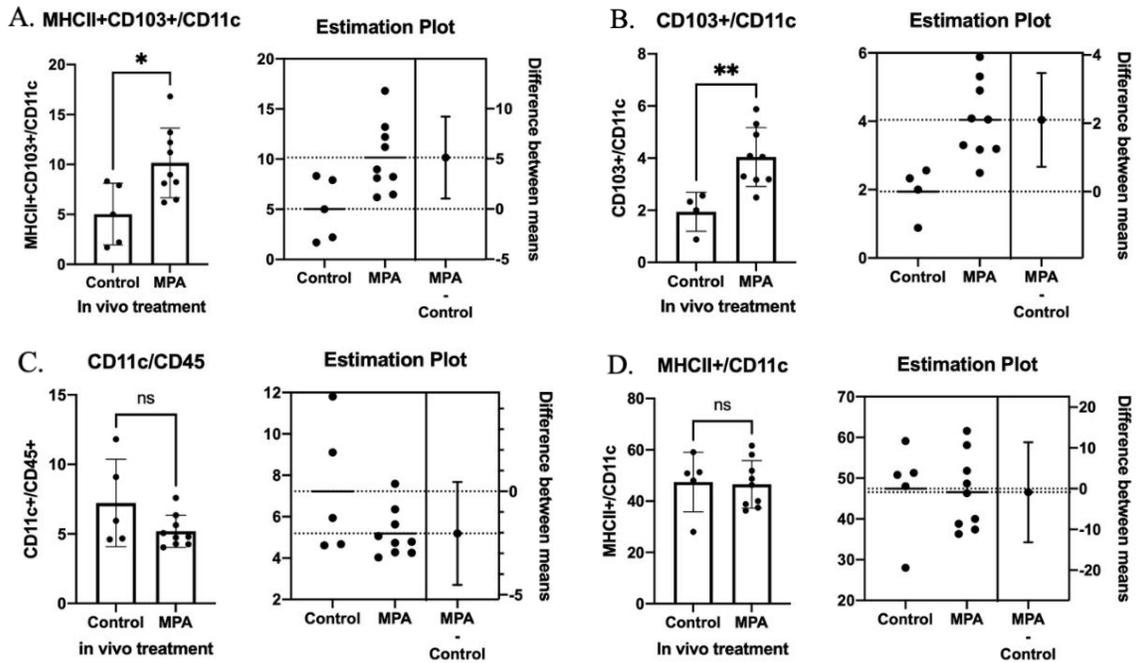


Figura 15. Gráficos generados en Prism 10 con los datos de salida del citómetro de flujo, al pasar la placa para las células dendríticas de tumor. Se observa la media y el desvío standard.

Luego pasamos al análisis de la población mieloide infiltrante de tumor comenzando con las células dendríticas (CD) o células presentadoras de antígenos profesionales. No observamos diferencias significativas en el infiltrado de células dendríticas totales pero si en el caso de las CD que son CD11c CD103+, tanto viendo solo la expresión de CD103+ (Fig. 15B) como la del MHCII+ y CD103+ (Fig. 15A). El marcador MHCII+ es el complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 y marca una subpoblación de CD maduras que están listas para la presentación de antígenos a las CD4+ naive. CD103+ se encuentra involucrado en la cross-presentación de antígenos, el cual es un tipo de presentación antigénica que ocurre en el microambiente tumoral e involucra la presentación de antígenos endocitados a linfocitos T naive CD8+ y es necesaria para activar la respuesta inmune contra la mayoría de los tumores. Si bien el aumento de CD103+ en los ratones tratados no correspondería con la idea de la

inmunosupresión generada por la presencia de MPA, se debe considerar que el crecimiento tumoral exacerbado en presencia de esta hormona generaría una situación más propicia para presentación antigénica.

Macrófagos

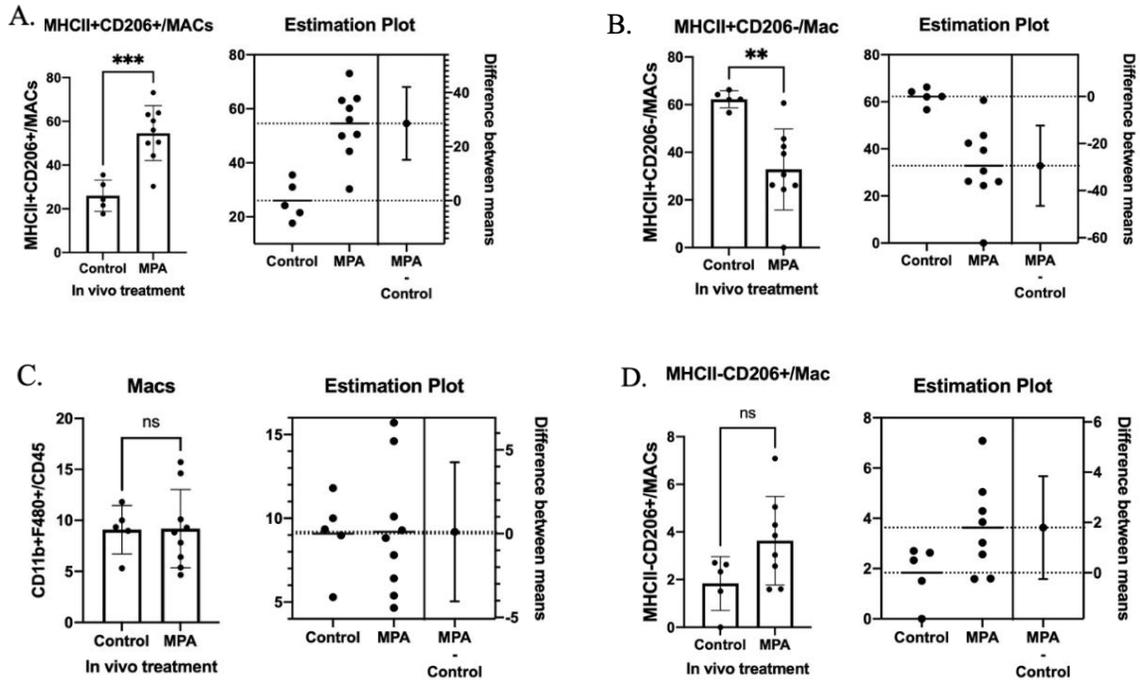


Figura 16. Gráficos generados en Prism 10 con los datos de salida del citómetro de flujo, al pasar la placa para los macrófagos de tumor. Se observa la media y el desvío standard.

Finalmente evaluamos el infiltrado de macrófagos los cuales, dependiendo de su perfil, han sido involucrados en la progresión tumoral en cáncer de mama por favorecer las metástasis. En la figura 16 no observamos diferencias significativas en la cantidad de macrófagos totales de los tumores control y tratados con MPA, pero sí encontramos diferencias en las subpoblaciones de macrófagos MHCII+ CD206+, los cuales son los macrófagos pro-tumorales (TAM: asociados a tumor) o de Tipo 2. Es decir que, observamos un aumento significativo de los macrófagos tipo 2 dentro de la población total de los macrófagos que infiltra los tumores tratados con MPA (Fig. 14A).

Ganglio

Tregs

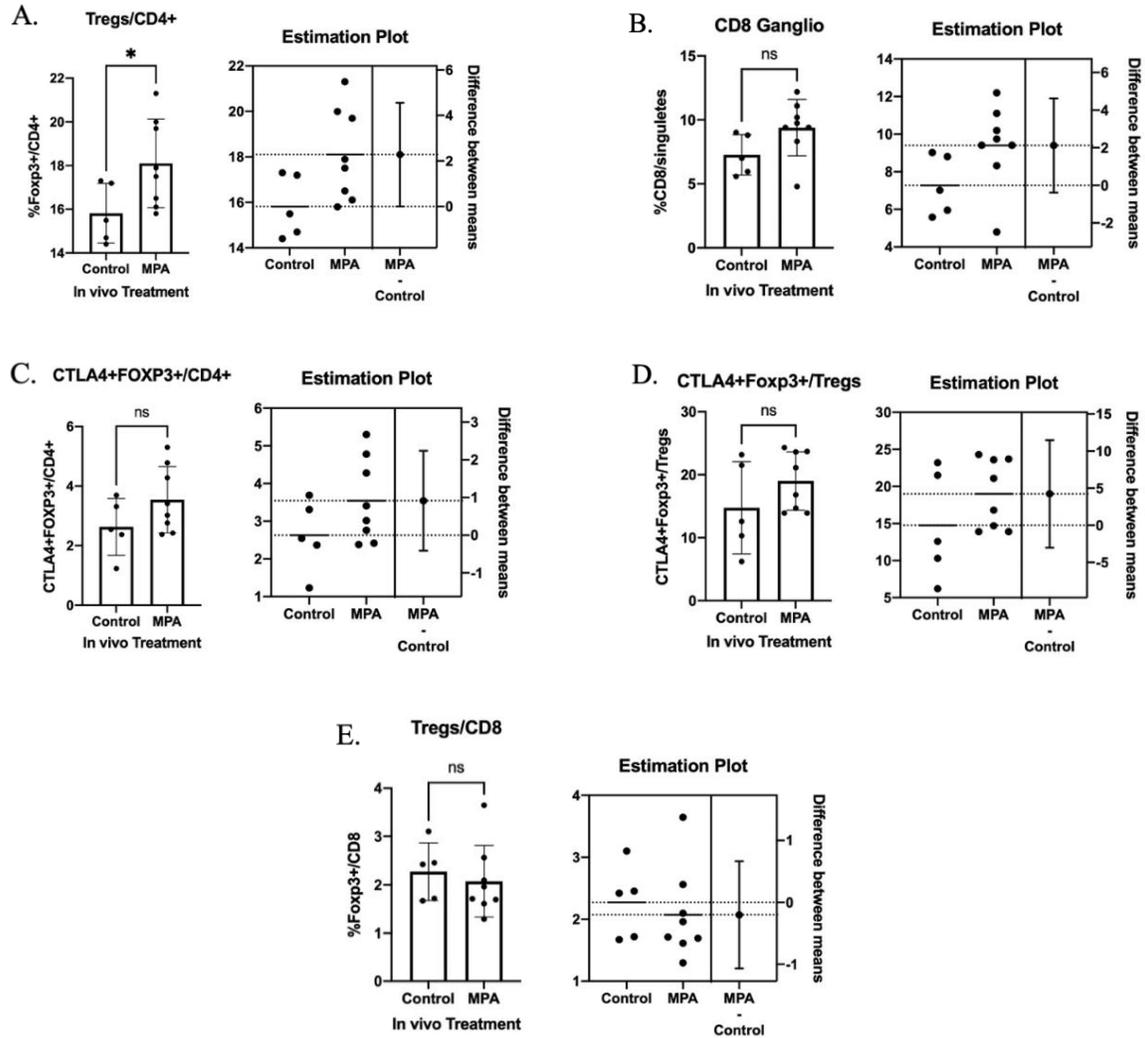


Figura 17. Gráficos generados en Prism 10 con los datos de salida del citómetro de flujo, al pasar la placa para las Tregs de ganglio. Se observa la media y el desvío standard.

Luego analizamos las poblaciones inmunes en ganglio drenante, el cual es el sitio inmunológico donde se observan más cambios influenciados por el microambiente tumoral. En este caso, al analizar las Tregs en el ganglio observamos un aumento significativo en las Tregs considerando la población de CD4+ totales como la población parental. Observamos una

tendencia de aumento de las CTLA4+ Foxp3+ principalmente dentro del grupo de las CD4+ (Fig. 17C). Sin embargo, no hay diferencias significativas en el número de CD8 (Fig. 17B) ni en el ratio de Tregs con CD8 (Fig. 17E), siendo este ultimo dato muy relevante para dilucidar si tenemos un ambiente inmunosupresor. Las células Tregs son muy importantes en cáncer de mama y se ha demostrado que el aumento en su frecuencia se corresponde con un pronostico negativo o con la presencia de células tumorales diseminadas en el ganglio drenante (Núñez *et al.*, 2020).

Sitios de unión de factores de transcripción

Inspecting sequence GXP_58332(LGALS1/human) [GXP_58332] (1 - 1126):

[LGALS1, GXL_47726, Gene ID: 3956, Homo sapiens chr. 22, galectin 1]

436 matches found in this sequence

Hint: Sort the matches by #evidences to get the most relevant matches.

Matrix Family	Detailed Family Information	Matrix	Detailed Matrix Information	Position	Strand	Matrix sim.	Additional lines of evidence	Sequence
				from to	anchor		#	Evidence
VSSREB	Sterol regulatory element binding proteins	VSSREBP.04	Sterol regulatory element binding transcription factor	189 203	196 (+)	0.977	0	agaTCACgccaactgc
VSSREB	Sterol regulatory element binding proteins	VSSREBP.02	Sterol regulatory element binding protein	874 888	881 (-)	0.838	0	cccTCACcccgccgc

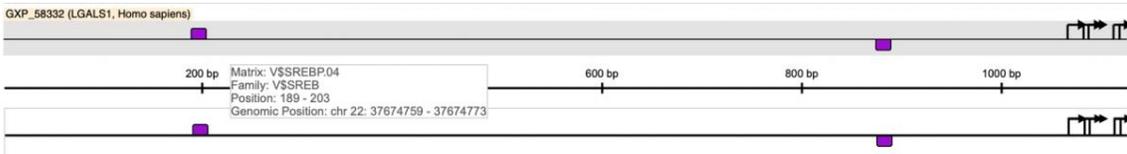


Figura 18. Salida del análisis de los sitios de unión de factores de transcripción en el promotor del gen que codifica para Gal-1 en humanos, en MatInspector.

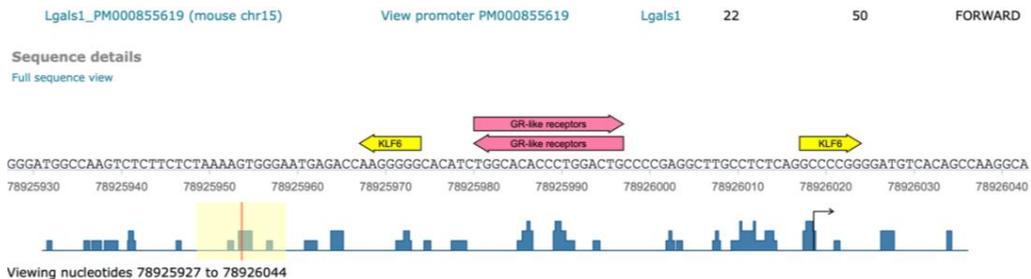


Figura 19. Salida del análisis de los sitios de unión de factores de transcripción en el promotor del gen que codifica para Gal-1 en ratones, en TRANSFAC.

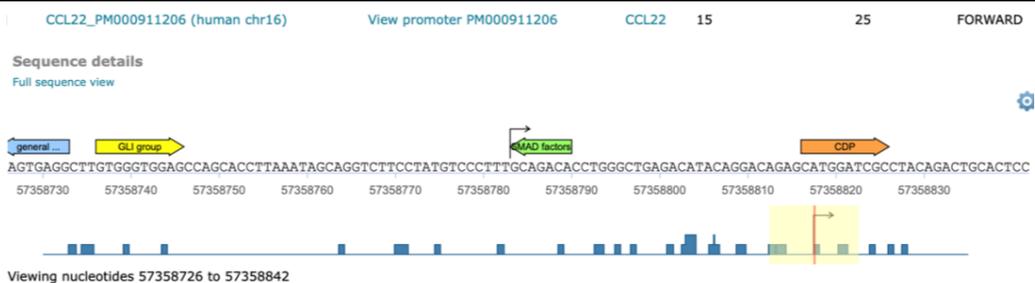


Figura 20. Salida del análisis de los sitios de unión de factores de transcripción en el promotor del gen que codifica para CCL22 en humanos, en TRANSFAC.

Por último, analizamos la presencia de elementos respondedores en los promotores de los genes de Gal-1 y CCL22 para ver si esta hormona tenía la capacidad teórica de modelar la expresión por el pegado de su receptor a los mismo. Observamos que, dentro de los factores de transcripción en el promotor del gen que codifica para Gal-1 en humanos (Fig. 18), se encuentra el factor de transcripción del elemento regulador de esteroides con un score de 0.977 en similitud de matiz (siendo un buen match a la matriz una similitud > 0.80). Con respecto a los factores de transcripción en el promotor del gen que codifica para Gal-1 en ratones (Fig. 19), se encuentra el GR-like receptors (receptores de glucocorticoides). Por último, dentro de los factores de transcripción en el promotor del gen que codifica para CCL22 en humanos (Fig. 20), se encuentran SMAD factors. Se ha demostrado que la quimiocina CCL22 al igual que la CCL21, atrae Tregs al tejido tumoral, es por esto que decidimos evaluar si la progesterona es capaz de modular este mecanismo (Curiel *et al*, 2004).

Conclusiones

Debido a la situación de pandemia ampliamente conocida; siendo que nos encontrábamos limitados a la concurrencia al laboratorio y al tiempo, a la adquisición de nuevos reactivos, la disponibilidad de animales, células de cultivo y demás insumos necesarios para llevar a cabo el proyecto, no fue posible llegar a rechazar o probar la hipótesis presentada.

Idealmente se hubieran realizado al menos tres repeticiones de cada WB y de la citometría de flujo, para poder contar con datos contundentes y poder sacar conclusiones con

un sustento estadístico. También se hubieran repetido aquellos experimentos que fallaron, como el WB4 con nuevos extractos proteicos.

Dado que corroboramos, por medio de herramientas bioinformáticas, la existencia de factores de transcripción en el promotor de Gal-1 y el de CCL22, que pueden ser activados mediante la presencia de Pg, esta hormona es capaz de regular su expresión. Además, logramos encontrar una regulación positiva en la quimiocina CCL21 y una tendencia al aumento en la Gal1 de los tumores C4HD tratados con MPA. En los resultados obtenidos de la citometría de flujo observamos algunas diferencias significativas en determinadas poblaciones relevantes con Tregs y macrófagos tipo 2 y una tendencia hacia un ambiente más inmunosupresor en el grupo tratado con MPA en contraste con el grupo control. Además, en experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio observamos diferencias significativas que corroboran estos resultados. Aunque no se pudo probar o rechazar la hipótesis inicial, los resultados obtenidos son un comienzo prometedor para el estudio de la regulación de la expresión de Gal-1 por Pg en cáncer de mama y su impacto funcional en mecanismos de escape tumoral.

Perspectivas futuras

Cabe mencionar algunas de las perspectivas futuras de este proyecto de investigación. Para comenzar, se buscaría profundizar en el entendimiento de los mecanismos mediante los cuales la Pg produce una inmunosupresión en el microambiente tumoral. Posteriormente, realizaría ensayos de tratamiento con un anti-progestágeno con el fin de evaluar si de esta manera se logra revertir la inmunosupresión. Por consiguiente, determinar si al revertir la inmunosupresión mejoran por ejemplo las respuestas a inmunoterapias en cáncer de mama. Este tipo de ensayos se están realizando hoy en día en IBYME; se combinan los anti-progestágenos con inmunoterapias con inhibidores de checkpoints inmunológicos, en cáncer de mama del tipo luminal. Esto abriría un panorama muy interesante para el tratamiento del cáncer de mama mas frecuente que hoy no responde a inmunoterapia.

Bibliografía

Alkabban FM, Ferguson T. Breast Cancer. 2020 Nov 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 29493913.

Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Nov;13(11):674-690. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.66. Epub 2016 May 17. PMID: 27184417; PMCID: PMC5461122.

Block GE, Jensen EV, Polley TZ. The prediction of hormonal dependency of mammary cancer. *Ann Surg*. 1975 Sep;182(3):342-52. doi: 10.1097/0000658-197509000-00017. PMID: 169754; PMCID: PMC1343952.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.

Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*. 1997 Oct 11;350(9084):1047-59. Erratum in: *Lancet* 1997 Nov 15;350(9089):1484. PMID: 10213546.

Brown TA. *Genomes*. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss; 2002. Chapter 12, Regulation of Genome Activity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21127/>

Busund M, Bugge NS, Braaten T, Waaseth M, Rylander C, Lund E. Progestin-only and combined oral contraceptives and receptor-defined premenopausal breast cancer risk: The Norwegian Women and Cancer Study. *Int J Cancer*. 2018 Jun 1;142(11):2293-2302. doi: 10.1002/ijc.31266. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29349773; PMCID: PMC5893363.

Cagnoni AJ, Pérez Sáez JM, Rabinovich GA, Mariño KV. Turning-Off Signaling by Siglecs, Selectins, and Galectins: Chemical Inhibition of Glycan-Dependent Interactions in Cancer.

Front Oncol. 2016 May 13;6:109. doi: 10.3389/fonc.2016.00109. PMID: 27242953; PMCID: PMC4865499.

Chow LW, Ho P. Hormonal receptor determination of 1,052 Chinese breast cancers. *J Surg Oncol.* 2000 Nov;75(3):172-5. doi: 10.1002/1096-9098(200011)75:3<172::aid-jso4>3.0.co;2-a. PMID: 11088048.

Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2001 Jan 25;344(4):276-85. doi: 10.1056/NEJM200101253440407. Erratum in: *N Engl J Med* 2001 Jun 7;344(23):1804. PMID: 11172156.

Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Signaling Molecules and Their Receptors. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9924/>

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):942-9. doi: 10.1038/nm1093. Epub 2004 Aug 22. PMID: 15322536.

Dettin L, Rubinstein N, Aoki A, Rabinovich GA, Maldonado CA. Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biol Reprod.* 2003 Jan;68(1):51-9. doi: 10.1095/biolreprod.102.006361. PMID: 12493695.

Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:83-117. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132544. PMID: 19007331.

Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jan;4(1):11-22. doi: 10.1038/nrc1252. PMID: 14708024.

Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007;9(1):R6. doi: 10.1186/bcr1639. PMID: 17239243; PMCID: PMC1851385.

Edwards DP, Wardell SE, Boonyaratanakornkit V. Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Dec;83(1-5):173-86. doi: 10.1016/s0960-0760(02)00265-0. PMID: 12650714.

Estadísticas de incidencia y mortalidad del Instituto Nacional del Cáncer, 2018. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>

Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W, Liu B, Lei Y, Du S, Vuppalapati A, Luu HH, Haydon RC, He TC, Ren G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* 2018 May 12;5(2):77-106. doi: 10.1016/j.gendis.2018.05.001. PMID: 30258937; PMCID: PMC6147049.

García-Becerra R, Santos N, Díaz L, Camacho J. Mechanisms of resistance to endocrine therapy in breast cancer: focus on signaling pathways, miRNAs and genetically based resistance. *Int J Mol Sci.* 2012 Dec 20;14(1):108-45. doi: 10.3390/ijms14010108. PMID: 23344024; PMCID: PMC3565254.

Gompel A. Hormones et cancers du sein [Hormone and breast cancer]. *Presse Med.* 2019 Oct;48(10):1085-1091. French. doi: 10.1016/j.lpm.2019.09.021. Epub 2019 Oct 26. PMID: 31662219.

Grosset AA, Labrie M, Vladoiu MC, Yousef EM, Gaboury L, St-Pierre Y. Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget.* 2016 Apr 5;7(14):18183-203. doi: 10.18632/oncotarget.7784. PMID: 26933916; PMCID: PMC4951281.

Gupta D, Gupta V, Marwah N, Gill M, Gupta S, Gupta G, Jain P, Sen R. Correlation of Hormone Receptor Expression with Histologic Parameters in Benign and Malignant Breast Tumors. *Iran J Pathol.* 2015 Winter;10(1):23-34. PMID: 26516322; PMCID: PMC4539786.

Harper KL, Sosa MS, Entenberg D, Hosseini H, Cheung JF, Nobre R, Avivar-Valderas A, Nagi C, Girmius N, Davis RJ, Farias EF, Condeelis J, Klein CA, Aguirre-Ghiso JA. Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2⁺ mammary cancer. *Nature*. 2016 Dec 22;540(7634):588-592. doi: 10.1038/nature20609. Epub 2016 Dec 14. Erratum in: *Nature*. 2017 Dec 13;: PMID: 27974798; PMCID: PMC5471138.

Hodi FS, Dranoff G. The biologic importance of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Cutan Pathol*. 2010 Apr;37 Suppl 1(0 1):48-53. doi: 10.1111/j.1600-0560.2010.01506.x. PMID: 20482675; PMCID: PMC3905324.

Hosseini H, Obradović MMS, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, Nanduri LK, Werno C, Ehrh C, Maneck M, Patwary N, Haunschild G, Gužvić M, Reimelt C, Grauvogl M, Eichner N, Weber F, Hartkopf AD, Taran FA, Brucker SY, Fehm T, Rack B, Buchholz S, Spang R, Meister G, Aguirre-Ghiso JA, Klein CA. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*. 2016 Dec 22;540(7634):552-558. doi: 10.1038/nature20785. Epub 2016 Dec 14. PMID: 27974799; PMCID: PMC5390864.

Huggins C, Bergenstal DM. Inhibition of human mammary and prostatic cancers by adrenalectomy. *Cancer Res*. 1952 Feb;12(2):134-41. PMID: 14896409.

Hughes GC. Progesterone and autoimmune disease. *Autoimmun Rev*. 2012 May;11(6-7):A502-14. doi: 10.1016/j.autrev.2011.12.003. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22193289; PMCID: PMC3431799.

Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*. 2008 Jan;13(1):58-68. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.003. PMID: 18167340.

Iglesias MM, Rabinovich GA, Ivanovic V, Sotomayor C, Wolfenstein-Todel C. Galectin-1 from ovine placenta--amino-acid sequence, physicochemical properties and implications in T-cell death. *Eur J Biochem*. 1998 Mar 15;252(3):400-7. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2520400.x. PMID: 9546655.

Jensen EV. Steroid hormones, receptors, and antagonists. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Apr 30;784:1-17. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb16223.x. PMID: 8651563.

Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.* 2015 Jun 18;6(6):e1792. doi: 10.1038/cddis.2015.162. PMID: 26086965; PMCID: PMC4669840.

Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, Di Grappa MA, Mote PA, Clarke CL, Stingl J, Waterhouse PD, Khokha R. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature.* 2010 Jun 10;465(7299):803-7. doi: 10.1038/nature09091. PMID: 20445538.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009 Apr;9(4):239-52. doi: 10.1038/nrc2618. Epub 2008 Mar 12. PMID: 19279573; PMCID: PMC3251309.

Kalinina T, Kononchuk V, Alekseenok E, Obukhova D, Sidorov S, Strunkin D, Gulyaeva L. Expression of Estrogen Receptor- and Progesterone Receptor-Regulating MicroRNAs in Breast Cancer. *Genes (Basel).* 2021 Apr 16;12(4):582. doi: 10.3390/genes12040582. PMID: 33923732; PMCID: PMC8073827.

Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005 Jan;5(1):29-41. doi: 10.1038/nrc1527. PMID: 15630413.

Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Jun 27;346(26):2025-32. doi: 10.1056/NEJMoa013202. PMID: 12087137.

McDonnell DP, Dana SL, Hoener PA, Lieberman BA, Imhof MO, Stein RB. Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Jun 12;761:121-37. doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb31374.x. PMID: 7625716.

Narod SA. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011 Aug 2;8(11):669-76. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.110. PMID: 21808267.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):49-61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010. Erratum in: *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):866. PMID: 25035953; PMCID: PMC4137410.

Núñez NG, Tosello Boari J, Ramos RN, Richer W, Cagnard N, Anderfuhren CD, Niborski LL, Bigot J, Meseure D, De La Rochere P, Milder M, Viel S, Loirat D, Pérol L, Vincent-Salomon A, Sastre-Garau X, Burkhard B, Sedlik C, Lantz O, Amigorena S, Piaggio E. Tumor invasion in draining lymph nodes is associated with Treg accumulation in breast cancer patients. *Nat Commun*. 2020 Jun 29;11(1):3272. doi: 10.1038/s41467-020-17046-2. PMID: 32601304; PMCID: PMC7324591.

Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol*. 2002 Jun;23(6):313-20. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02232-9. PMID: 12072371.

Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol*. 1998 May 15;160(10):4831-40. PMID: 9590230.

Rabinovich GA, Modesti NM, Castagna LF, Landa CA, Riera CM, Sotomayor CE. Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-I, a beta-galactoside-binding lectin. *J Biochem*. 1997 Aug;122(2):365-73. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021762. PMID: 9378715.

Rivera LB, Meyronet D, Hervieu V, Frederick MJ, Bergsland E, Bergers G. Intratumoral myeloid cells regulate responsiveness and resistance to antiangiogenic therapy. *Cell Rep*. 2015 Apr 28;11(4):577-91. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.055. Epub 2015 Apr 16. PMID: 25892230; PMCID: PMC4438771.

Romero MD, Muiño JC, Bianco GA, Ferrero M, Juarez CP, Luna JD, Rabinovich GA. Circulating anti-galectin-1 antibodies are associated with the severity of ocular disease in autoimmune and infectious uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Apr;47(4):1550-6. doi: 10.1167/iovs.05-1234. PMID: 16565391.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Jul 17;288(3):321-33. doi: 10.1001/jama.288.3.321. PMID: 12117397.

Soini T, Hurskainen R, Grénman S, Mäenpää J, Paavonen J, Joensuu H, Pukkala E. Levonorgestrel-releasing intrauterine system and the risk of breast cancer: A nationwide cohort study. *Acta Oncol*. 2016;55(2):188-92. doi: 10.3109/0284186X.2015.1062538. Epub 2015 Aug 4. PMID: 26243443.

Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:451-86. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.002315. PMID: 7979245.

Tutunea-Fatan E, Majumder M, Xin X, Lala PK. The role of CCL21/CCR7 chemokine axis in breast cancer-induced lymphangiogenesis. *Mol Cancer*. 2015 Feb 10;14:35. doi: 10.1186/s12943-015-0306-4. PMID: 25744065; PMCID: PMC4339430.

Werner LR, Gibson KA, Goodman ML, Helm DE, Walter KR, Holloran SM, Trinca GM, Hastings RC, Yang HH, Hu Y, Wei J, Lei G, Yang XY, Madan R, Molinolo AA, Markiewicz MA, Chalise P, Axelrod ML, Balko JM, Hunter KW, Hartman ZC, Lange CA, Hagan CR. Progesterone promotes immunomodulation and tumor development in the murine mammary gland. *J Immunother Cancer*. 2021 May;9(5):e001710. doi: 10.1136/jitc-2020-001710. PMID: 33958486.

Wittliff JL. Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer*. 1984 Feb 1;53(3 Suppl):630-43. doi: 10.1002/1097-0142(19840201)53:3+<630::aid-cnrcr2820531308>3.0.co;2-3. PMID: 6692266.

Zolfaroli I, Tarín JJ, Cano A. Hormonal contraceptives and breast cancer: Clinical data. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018 Nov;230:212-216. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.03.058. Epub 2018 Mar 28. PMID: 29631794.

