

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**TESIS DOCTORAL**

**Células madre de la glándula mamaria: capacidad regenerativa e implicación en la formación de tumores**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Ángeles Lillo Osuna**

Director

José Alberto García Sanz

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DPTO. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**Células Madre de la Glándula Mamaria:  
Capacidad regenerativa e implicación  
en la formación de tumores**

TESIS DOCTORAL

M<sup>a</sup>Angeles Lillo Osuna

Madrid 2014





El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Dña. M<sup>a</sup>Angeles Lillo Osuna, bajo la dirección del Dr. José Alberto García Sanz, en el departamento de Medicina Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

## **Opta al grado de Doctor**

M<sup>a</sup>Angeles Lillo Osuna

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> Director de tesis

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> Tutor de tesis

Dr. José Alberto García Sanz

Dra. Cristina Sánchez García



*A mis padres  
y a mi hermano*

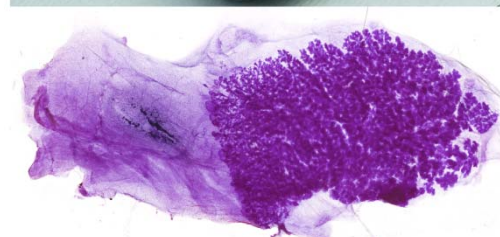
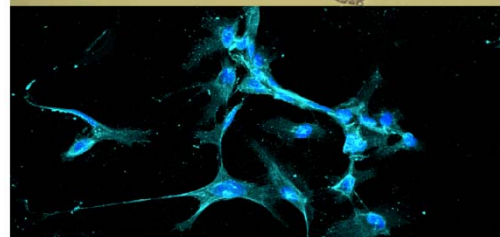
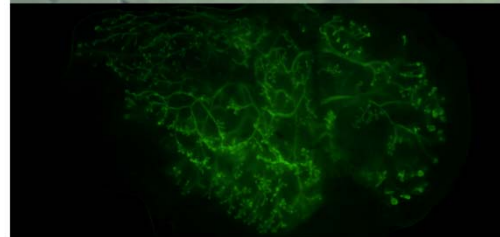
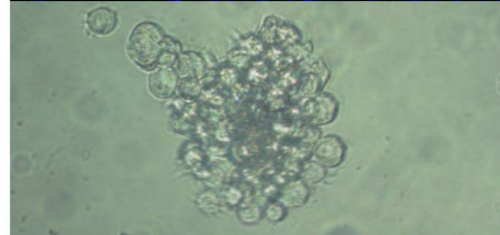
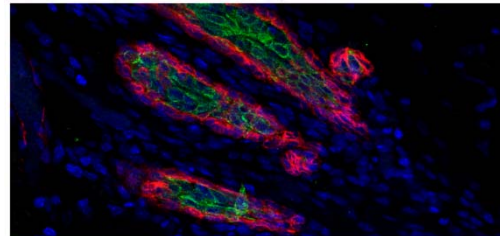
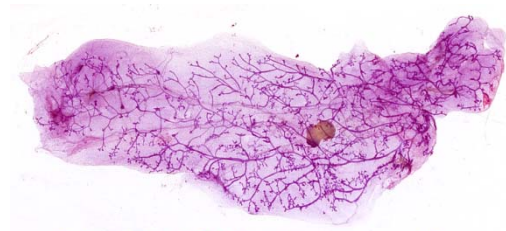


***" Vive como si fueras a morir mañana.  
Aprende como si fueras a vivir siempre "***

*Mahatma Gandhi*



**AGRADECIMIENTOS**



Durante la realización de la tesis he crecido científicamente, pero también, de forma intrínseca, he crecido como persona. Muchas son las personas a las que tengo que agradecer su aportación en ambos crecimientos:

José Alberto, muchísimas gracias por confiar en mí, a pesar de poseer sólo la experiencia científica que había adquirido en la universidad. Gracias por enseñarme a pensar, no sólo a diseñar experimentos, sino a plantearme por qué no hacerlos. Gracias por las tertulias de discusión científica, por ayudarme en busca del famoso "hilo conductor" y por la corrección de la escritura "rococo".

Gracias a todo el personal de los servicios que he utilizado en el CIB; citometría, confocal, lupa, animalario y fotografía. Gracias por vuestra disponibilidad y por ayudarme siempre que lo he necesitado. También quiero agradecer a la Dra. Marta Inés del ISCIII por enseñarme a realizar trasplantes de mama, técnica que ha sido fundamental para la realización de esta tesis. Gracias a la Dra. Leonor Kremmer del CNB-CSIS por ofrecermé su laboratorio cuando lo he necesitado. Gracias a la Dra. Cristina Clavería del CNIC por cedernos sus ratones y horas de citómetro con la finalidad de realizar una colaboración.

Gracias a mis compañeros del laboratorio 144 del CIB. Gracias a Rolando, Walter y Sara, que aunque he compartido poco tiempo con vosotros, éste ha sido muy intenso. Gracias Eva, por enseñarme todos tus conocimientos sobre la glándula mamaria y las MaSCs, por facilitarme todas las técnicas que habías puesto a punto, por colaborar contigo y compartir línea de investigación. Gracias por todos los momentos pasados en el laboratorio y fuera de él. Gracias Gema, eres una tía grande científicamente y como persona, valés muchísimo. Gracias por compartir conmigo tu día a día, por reírnos de la vida, por nuestro "reiky". Gracias Patri (Antonia), estupenda compañera y amiga. Eres peculiar, y eso te hace ser encantadora. Quiero tener una compañera como tu allá donde trabaje!

Gracias a todos los compañeros del ala oeste de la primera planta del CIB, sin duda, los mejores. Gracias a "Los Santiagos": Tamara, Agustín y Shzila (creativa sin límites). Gracias a "Los Gélis": Estefi

(tengo contigo tantos recuerdos divertidos que es imposible olvidarme de ti, nosamolao), Elvira (al mal tiempo... buena risa, gracias por ser tan buena organizadora), Irene (inolvidable el ruido de tus tacones y sorprendente tu caña de un trago, no desesperes con la eigencia), Emi (malagueña salá donde las haga, muy buena gente), Mónica II, y Mónica I (una de las científicas más "normales" que conozco, eres la caña). Gracias a "Los Texis": Rubén Álvaro Bartolomé (la persona con las aficiones más raras que conozco, y unas de las personas con las que más me río, mi ayudante a la hora de hacer el pino), Nohé (eterna juventud, se alegra sinceramente por el bien del otro, aprendiz del positivismo). Pablo (chico del mundo, y durante un día chico de los chupetones), David (aprendiz de murciano con puntazos increíbles), Georgina (sos la viuda alegre de una fiesta de Halloween), Ana (un gran corazón escondido en una fuerte personalidad, morruda después de cañas marchosas), Marta (la Hello Kitty del CLB, compañera de máster y de calles oscuras saliendo de clase), Solé (blogger de moda con bata blanca/verde), y Alicia (la sonrisa que tanto hace falta cruzarte por el pasillo). Gracias a "Los Messi Mazo": Sergio, Macarena, Juan de Dios, el Panam (me encantaba oír sus careajadas desde la otra punta del pasillo), y Miguel I (consejero médico de la franja de Gaza, compañero de algún que otro martes citoso). Gracias a Alberto, Marta, Irene y Roy, que aunque estén en la segunda planta, son de los nuestros. Gracias a Adela (la mujer más valiente que conozco).

Fuera del CLB son muchas las personas a las que le tengo que agradecer, porque ellas me han apoyado incondicionalmente en este proceso. Gracias a mis amigos del alma: Diego (mi hermano, mi confidente, mi compañero de aventuras), Belén (una risa preciosa convertida en lágrimas, mi acompañante de viajes, salidas y confesiones), Miriam (la alegría personificada, y la persona que me hace ver las cosas que son verdaderamente importantes, mi hermana pequeña), Pilar (mi amiga Pollo, con la que podría hacer el monólogo más divertido del mundo contando nuestras aventuras, persona con la que comparto mis méritos y mis fracasos), y Beatriz Alonso (mi hermana Bea, mi amiga desde que vi su foto haciendo la matricula en el colegio de Aranjuez, me encanta verte feliz). Gracias a mi familia:

Mis tios, mis primos y mis abuelos, un gran apoyo en los momentos buenos y malos. Somos una piña y compartimos todo, cosa que me encanta. En especial, agradecer a mi tío Jesús y a mi tía Mari Sol su emoción cada vez que les comunicaba un avance académico o les comentaba algún resultado. Gracias por compartir conmigo vuestras inquietudes científicas.

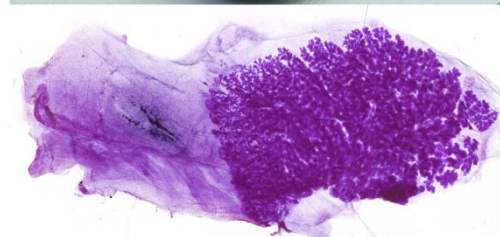
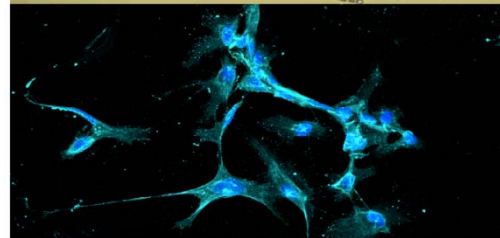
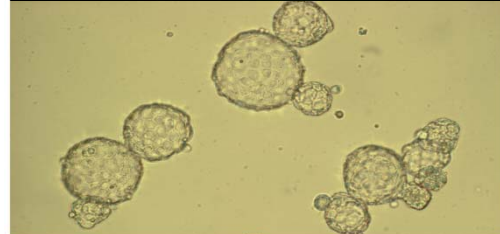
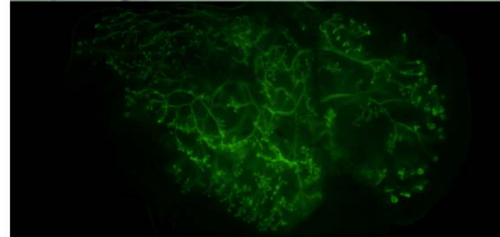
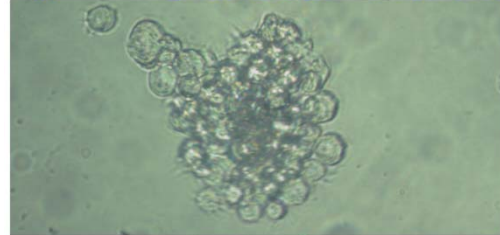
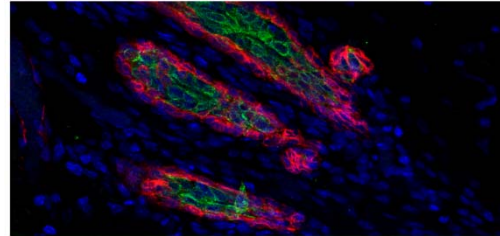
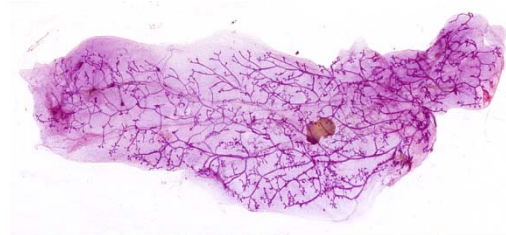
Muchas gracias Jesús, eres el mejor descubrimiento de esta tesis. Has sido una de las personas que más me ha insistido en que hiciera el doctorado, y me has dado el mejor consejo, que nadie que escribe la tesis lo tiene en cuenta; "disfruta al escribir la tesis, porque es muy bonito recopilar todo lo que has hecho durante estos 4 años". Soy muy feliz compartiendo todo contigo y creciendo juntos. Te quiero.

Gracias a mi hermano, Miguelito. Mutuamente queremos lo mejor el uno para el otro, aunque a veces no lo entendamos así. Gracias por estar ahí siempre. Sé, que teniendoos, lo bueno es más bueno y lo malo es menos malo. Te quiero mucho.

Gracias a mis PADRES. Gracias porque sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Gracias por obligarme de pequeña a estar una hora en mi habitación, por convencerme a los 6 años que el inglés era necesario a pesar de que yo no lo comprendiera, por apoyarme cuando decidí irme a estudiar a Aranjuez, por animarme a irme veranos a Inglaterra, por acompañarme a hacer la "famosa matricula" en la Universidad, por vuestra inmensa alegría cuando os dije que era bióloga, por la celebración de encontrar un trabajo en un laboratorio, por el apoyo que me disteis cuando os comunicué que iba a hacer la tesis. Gracias por confiar en mí. Gracias por animarme en los malos momentos y gracias por vuestro interés e ilusión cuando me ocurrían cosas buenas. La familia te toca, pero además, yo os elijo!! OS QUIERO.



**ABREVIATURAS**



- AREG:** Anfirregulina, del inglés amphiregulin
- AR:** Receptor de andrógeno, del inglés Androgen Receptor
- bFGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés Basic Fibroblast Growth Factor
- BSA:** Albúmina del suero bovino, fracción V, del inglés Bovine Serum Albumine
- CALLA:** Antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda, del inglés Acute Lymphocytic Leukemia Antigen
- CK:** Citoqueratina, del inglés Citokeratin
- CSC:** Célula madre del cáncer, del inglés Cancer Stem Cell
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-phenylindol
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DNA:** Ácido Desoxirribonucleico, del inglés DeoxyriboNucleic Acid
- EDTA:** Ácido etilendiaminetetracético, del inglés Ethylenediaminetetraacetic acid
- EGF:** Factor de crecimiento epidérmico, del inglés Epidermal Growth Factor
- EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico, del inglés Epidermal Growth Factor Receptor
- EMT:** transición epitelial-mesenquimal, del inglés epithelial-mesenchymal transition
- EpCAM:** Molécula de adhesión de células epiteliales, del inglés Epithelial Cell Adhesion Molecule
- ER:** Receptor de estrógeno, del inglés Estrogen Receptor
- ErbB2/Her2/Neu:** Proteína con actividad quinasa, receptor para el factor de crecimiento endodérmico
- ES:** Célula madre embrionaria, del inglés Embryonic Stem cell
- FCS:** Suero bovino fetal, del inglés Fetal Calf Serum
- FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés Fibroblas Growth Factor
- GF:** Factor de crecimiento, del inglés Growth Factor
- FITC:** Fluoresceína isotiocianato
- GFP:** Proteína fluorescente verde, del inglés Green Fluorescent Protein
- HSA:** Antígeno estable al calor, del inglés Heat Stable Antigen
- ICM:** Masa celular interna, del inglés Inner Cell Mass
- IGF:** Factor de crecimiento insulínico, del inglés Insulin Growth Factor
- iPS:** Células madre pluripotente inducida, del inglés induced Pluripotent Stem cell
- LDA:** Análisis por dilución límite, del inglés Limiting Dilution Analysis
- Lin:** Linaje de células linfoides

- LRC:** Célula que mantiene la tinción, del inglés Label Retaining Cell
- LTR:** Repetición terminal larga, del inglés Long Terminal Repeat.
- MaCSCs:** Células madre del cáncer de glándula mamaria, del inglés Mammary Cancer Stem Cell
- MaECs:** Células epiteliales de la glándula mamaria, del inglés Mammary Epithelial Cells
- MaSCs:** Células madre de glándula mamaria, del inglés Mammary Stem Cells
- MaTCs:** Células del tumor mamario, del inglés Mammary Tumor Cells
- MEC:** Matriz extracelular
- MMTV:** Virus del tumor mamario del ratón, del inglés Mouse Mammary Tumour Virus
- mRNA:** Ácido Ribonucleico mensajero, del inglés messenger RiboNucleic Acid
- MUC:** Mucina
- NMU:** N-Metil-nitrosourea, del inglés N-Nitroso-N-methylurea
- PBS:** Tampón fosfato salino, del inglés Phosphate Buffered Saline
- p.c:** Posterior al coito, del latín *Post Coitum*
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa, del inglés quantitative polymerase reaction
- PE:** Ficoeritrina, del inglés Phycoerythrin
- PFA:** Paraformaldehido
- pHEME:** Tratado con Poli (2-hydroxietil methacrilato)
- PI-MEC:** Célula inducida por la paridad, del inglés Parity-Induced Mammary Epithelial Cell
- PR:** Receptor de progesterona, del inglés Progesterone Receptor
- PI:** Ioduro de propidio, del inglés Propidium Iodide
- PrIR:** Receptor de la prolactina, del inglés Prolactin Receptor
- qPCR:** PCR cuantitativa
- RANK:** Receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B, del inglés Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand
- RANKL:** Ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B, del inglés Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand
- RNA:** Ácido Ribonucleico, del inglés RiboNucleic Acid
- RT:** Retrotranscripción
- RTK:** Receptor Tirosina Quinasa, del Inglés Receptor Tyrosine Kinase
- RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction

**Sca-1:** Antígeno de la célula madre, del inglés Stem Cell Antigen

**SDS:** Dodecil sulfato sódico, del inglés Sodium Dodecyl Sulfate

**SP:** Población lateral, del inglés Side Population

**TDLU:** Unidad lobular terminal de los ductos, del inglés Terminal Duct Lobular Unit

**TEB:** Yema terminal, del inglés Terminal End Bud

**THY-1:** Antígeno de diferenciación de timocitos

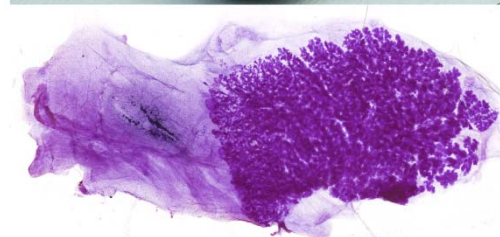
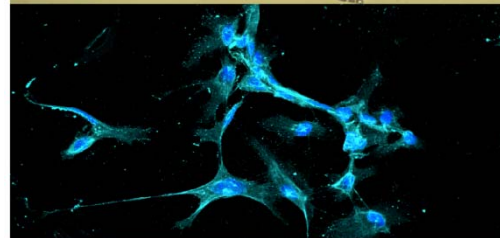
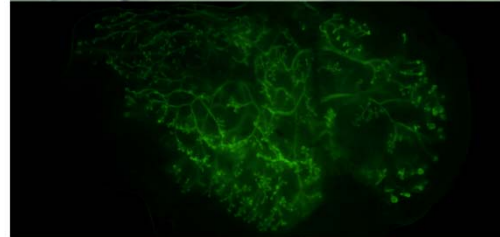
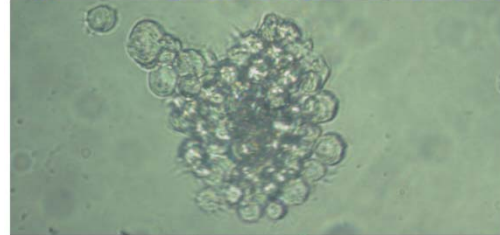
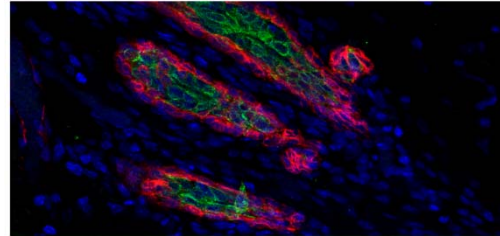
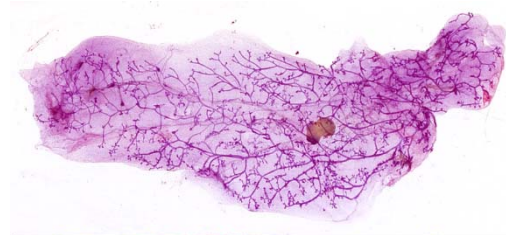
**TP:** Tapón vaginal

**WT:** Ratón silvestre, del inglés Wild Type

**$\alpha$ -SMA:** Actina alfa del músculo liso, del inglés Smooth Muscle  $\alpha$  Actin



# ÍNDICE



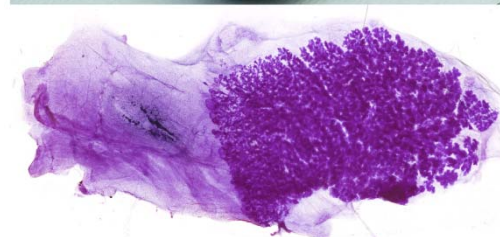
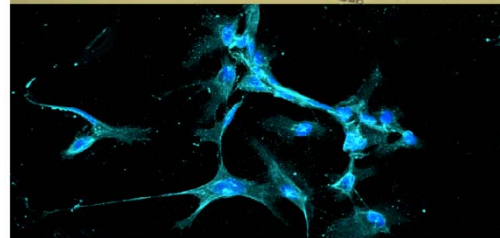
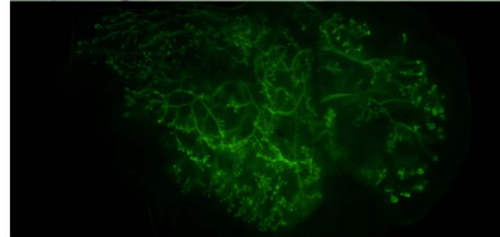
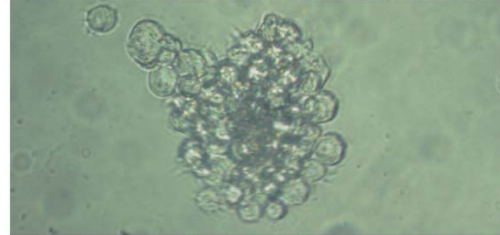
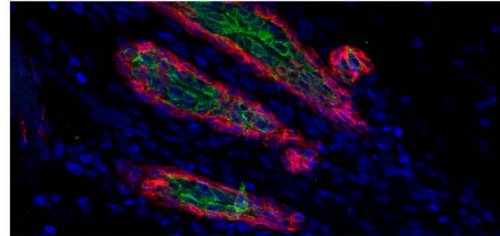
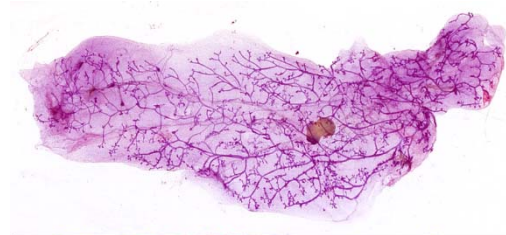
<b>SUMMARY</b>	<b>21</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>33</b>
Desarrollo embrionario de la glándula mamaria	33
Morfología de la glándula mamaria	35
Desarrollo post-embrionario de la glándula mamaria	36
Pubertad	36
Ciclo estral	38
Gestación y lactancia	39
Involución	40
Función de las hormonas sexuales en el desarrollo de la glándula mamaria	41
Estrógeno	41
Progesterona	43
Prolactina	44
Células Madre	44
Células Madre de la glándula mamaria	46
Jerarquía del epitelio mamario	48
Cultivo <i>in vitro</i> de las MaECs	52
Nicho	53
Células Madre del cáncer	55
Célula de origen del cáncer	57
Terapias contra el cáncer	59
Cáncer de mama	60
Origen de los tumores mamarios	61
Papel de las hormonas en la tumorigénesis y el crecimiento de tumores mamarios	63
<b>OBJETIVOS</b>	<b>65</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>67</b>
Animales	67
Obtención de células epiteliales de glándula mamaria (MaECs) y células de tumores mamarios (MaTCs)	67
Cultivo <i>in vitro</i> : Formación de mamosferas o de tumorosferas	69
Diferenciación de las células que conforman la mamosfera	70
Análisis por dilución límite (LDA) de células formadoras de mamosferas o	

tumorosferas	71
Análisis de marcadores celulares mediante citometría de flujo	71
Separación de poblaciones celulares mediante Sorting	73
Inmunocitoquímica de células diferenciadas	73
Inmunocitoquímica de mamosferas o de tumorosferas	73
Tinción de la glándula mamaria con Alumbre Carmín	74
Inmunohistoquímica	75
Trasplantes de glándula mamaria	75
Trasplantes de suspensión celular	77
Trasplantes con una fracción de tejido mamario	77
Trasplantes en hembras receptoras adultas	77
Trasplantes de una mamosfera o una tumorosfera	77
Ovariectomías y castraciones	77
Extracción de RNA de la glándula mamaria	78
Retrotranscripción (RT)	79
PCR-Cuantitativa (qPCR)	80
Análisis estadístico	82
<b>RESULTADOS</b>	<b>85</b>
Reconstitución de la glándula mamaria a partir de MaECs y MaSCs	85
Reconstitución de la glándula mamaria en una ratona adulta	88
Una única mamosfera es capaz de reconstituir una glándula mamaria funcional	89
Los machos contienen una población de MaSC capaz de regenerar una glándula mamaria	90
Análisis de las MaSCs más aptas para regenerar una glándula mamaria	93
Papel de las hormonas sexuales en la expansión de las MaSCs	94
Papel de las hormonas sexuales en la aparición de tumores	98
Factores implicados en la formación de tumores	101
Características de las células que componen los tumores que se desarrollan en las ratonas FVB MMTV-Neu (MMTV-Neu MaTCs)	102
Tumorosferas: Fenotipo y capacidad de generar tumores	104
Identificación de las MaCSCs	106
Biología de la glándula mamaria en machos	109
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>115</b>

Células madre adultas de la glándula mamaria (MaSCs)	115
Tumorigénesis en la glándula mamaria	118
Células tumorales mamarias (MaTCs) y células madre del cáncer de mama (MaCSCs)	124
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>127</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>149</b>



**SUMMARY/RESUMEN**



The mouse mammary gland is composed by the stroma and the mammary epithelia, which forms the ductal tree. A subset of mammary epithelial cells (MaECs) are mammary stem cells (MaSCs), which are important for maintaining the mammary gland homeostasis, and are able to reconstitute the entire mammary ductal tree upon transplantation into a de-epithelialized mammary fat pad from prepubertal females.

We regenerated mammary glands by transplanting different concentrations of MaECs from adult females, and the analysis of these reconstituted mammary glands allowed us to estimate that 1 out of 669 MaECs could reconstitute a functional mammary gland. In addition, we regenerated mammary glands on serial transplants, which demonstrated the self-renewal and differentiation capacity of the cells able to regenerate the mammary gland. Therefore, these cells represented bona-fide MaSCs. We also made mammary transplants with different concentrations cells from the CD24<sup>+</sup>CD29<sup>high</sup> subpopulation of MaECs, since it was described that the MaSCs are CD24<sup>+</sup>CD29<sup>high</sup>. The analysis of these regenerated mammary glands allowed us to estimate that 1 out of 18.5 cells from this population gave rise to complete mammary glands, even with alveolar structures during pregnancy. These data, together with the data that 1 of 669 MaECs is a MaSC, showed that the CD24<sup>+</sup>CD29<sup>high</sup> population was enriched, at least, 36 fold on MaSCs, as compared to the total MaEC population.

In general, the recipients of mammary transplants are pre-pubertal females, so that the peak of estrogen released during puberty in the recipients (that is the responsible for ductal elongation) is used for the regeneration of the mammary glands. However, we were able to regenerate mammary glands when the recipients were adult females. In this case the estrogen released during the sequential estrous cycles was sufficient for the reconstitution of the mammary gland, regardless of whether the transplanted cells had previously been exposed to estrogen or not. By contrast, males, in which the ductal elongation is not observed because they do not have the adequate hormonal signals, were not able to reconstitute mammary glands when MaECs were transplanted on their fat pads. Despite this, male MaECs transplanted into females were capable of regenerating mammary glands. Even, upon serial transplants, they were able to generate mammary glands with alveolar structures that were able to secrete milk at the end of the gestation of the recipient female. Our data showed that male MaECs contained a population of MaSCs with self-renewal and differentiation ability in a female hormonal context.

Knowing that female or male MaSCs were able to reconstitute an entire mammary gland when transplanted in females, we evaluated which cells were more effective (female or male MaSCs) in regenerating the mammary gland. Analyses of regenerated mammary glands from transplants with a mixture of male and female MaECs, showed that the regenerated mammary glands contain mostly female

MaECs, suggesting that there might be cell competition between the female and male MaSCs. These data were confirmed by increasing the ratio of male MaECs as compared to female MaECs, where even in a 3:1 ratio, most of the reconstituted mammary gland were from female-derived cells, indicating that there was an advantage on female cells *versus* male cells on their ability to regenerate.

Female and male MaECs, besides being able to regenerate mammary glands, are able to generate mammospheres *in vitro*. In addition, in our laboratory it has been shown that, only the CD24<sup>+</sup>CD29<sup>high</sup> population is able to generate mammospheres, and each mammosphere has a single cell able to generate a new mammosphere. The cells within the mammosphere retained their stem cell potential, since a mammary gland could be reconstituted following transplantation with a single mammosphere (frequency 2/20  $\pm$ 2SD 1/78,5-1/5,39). The ability of single mammospheres to reconstitute a mammary gland seemed to indicate the presence of a MaSC within the mammosphere, rather than to the progenitors present in them, since these cells were able to reconstitute in serial transplantation experiments, as we demonstrated in secondary, tertiary and quaternary transplant experiments. Taken together, these data suggested that the frequency of mammosphere-generating cells could be used to estimate MaSC number in mammary epithelial samples.

By quantifying mammospheres, it has been described that in females, during puberty, there is a 20-fold increase on MaSCs, and the data from our laboratory implicate sexual hormones as responsible for this expansion. In order to demonstrate whether the expansion detected during puberty was due to estrogen-derived signals, since there is a high peak of estrogen during this stage, we determined the number of MaSCs before and after puberty in AREG<sup>-/-</sup> mice, which are deficient in the synthesis of the growth factor amphiregulin (downstream factor in estrogen signaling pathway). Our data demonstrated that there were not significant differences in the number of MaSCs between pre-pubertal and adult AREG<sup>-/-</sup> females, confirming that estrogen, but not other sexual hormones, was the responsible for the control of the MaSC expansion during puberty.

Amphiregulin synthesis is necessary for the MaSC expansion and the consequent ductal elongation, since AREG<sup>-/-</sup> females do not present ductal elongation in their mammary glands and wild type mammary glands transplanted with cells derived from AREG<sup>-/-</sup> female were not reconstituted, despite there was estrogen synthesis during puberty. However, is not necessary that all the ER<sup>+</sup> cells secrete amphiregulin; the mammary glands transplanted with a mixture of wild type and AREG<sup>-/-</sup> MaECs were reconstituted, demonstrating that blocking MaSC expansion due to the absence of amphiregulin could be *bypassed* by the amphiregulin secreted by wild type cells in response to the estrogens synthesized during puberty. The amphiregulin would act indirectly in AREG<sup>-/-</sup> MaSCs as well in wild type MaSCs, allowing for the expansion required to regenerate the mammary

gland. In addition, in AREG<sup>+/-</sup> females, the amount of amphiregulin was sufficient for MaSC expansion, since these females presented a mammary gland development similar to wild type females.

Besides the estrogen synthesized during puberty, it has also been described that steroid hormones released during pregnancy have an effect on MaSC expansion. Indeed, with each pregnancy there is a transient 3-fold increase on MaSCs as compared with adult females. In addition, in wild type females, during involution there is a reduction in MaSC number, reaching levels similar to adult, non-pregnant females. In mammary glands from AREG<sup>-/-</sup> females, where there has not been ductal elongation during puberty, it is observed side branching and alveolar structures being able to secrete milk at parturition. All these changes were accompanied by a 18.8-fold increase on MaSCs. However, unlike what is seen in wild type females, AREG<sup>-/-</sup> mammary glands after involution did not present a similar epithelium tree than virgin adult AREG<sup>-/-</sup> females. In addition, was observed a 9.5-fold increase on MaSCs compared with the amount of MaSCs in adult female. By contrast, with the second and successive pregnancies, there was a transient 2-fold increase on MaSCs that completely decrease with each involution.

The estrogen lead to a substantial increase in MaSC number and a concomitant increase in organ cellularity. Such mechanism might turn potentially relevant to understand mammary tumorigenesis, since it provides a cellular basis for the 100-fold decreased mammary cancer frequency in males, as well as in prepubertal females, as compared to adult females, which might be related to the lack or hormone-driven MaSC expansion. We studied whether the MaSC expansion could have an effect on tumor development in MMTV-Neu mice. Decreasing the exposure time of mice to the estrogen signals during puberty, by ovariectomy at different ages, the breast tumor frequency decreased, and the time required for the onset of the tumors increased. We could not rule out a role of steroid hormones produced during estrous cycles, because not all ovariectomized females at 8 weeks developed tumors, although the kinetics of their appearance was similar to that controls mice showed. However, with this mouse model we could not analyze the effect of increase expansion of MMTV-Neu MaSCs by serial transplants, so that with every transplant, the MaSCs would be subject to a new expansion. The syngenic mammary glands transplanted with MMTV-Neu MaECs were regenerated, but they did not develop tumors. Moreover, FVB female mammary glands transplanted with a piece of pre-neoplastic MMTV-Neu mammary gland, and MMTV-Neu female mammary glands transplanted with wild type MaECs neither developed tumors. These data demonstrated that the Neu transgene expression in the mammary epithelium was necessary, although not sufficient, for tumor development in mouse. Additionally, the mice background also was crucial for tumor development in the MMTV-Neu mouse model used, while the Neu transgene expression in homozygosis or heterozygosis was not; whereas all the FVB females that expressed

MMTV-Neu transgene in heterozygosis developed mammary tumors, heterozygous MMTV-Neu females that were 50% FVB and 50% C57Bl/6 were not able.

Unlike the MMTV-Neu MaECs, the cells that compose the mammary MMTV-Neu tumors (MMTV-Neu MaTCs) were able to develop tumors when were transplanted in female wild type mammary stroma, epithelium-free or completely filled with ducts. In addition, they also generated tumors when were transplanted in male mammary stroma. All the secondary tumors were similar to primary tumors, regardless of the receptor hormonal context. MMTV-Neu MaTCs presented phenotypes different from those observed in FVB MaECs. MMTV-Neu MaTCs lost the highest population for CD29 and CD6, and dramatically reduced the high population for Sca-1. Conversely, in MMTV-Neu MaTCs, the high population for CD24 y C-kit increased, and in the case of C-kit, even appeared a new population with higher antigen expression.

The MaTCs with stem cells and progenitors properties are maintained *in vitro*, under the same conditions that stem and progenitor cells from the mammary gland, as non-adherent spheres. Single-cell suspensions from tumors developed in MMTV-Neu mice were grown in conditions that do not allow adherence to a substratum, and after 7 days, two different floating spherical types of colonies were generated; a large number of spherical and compact structures, apparently bounded by a cell layer, which we named tumorospheres, and a smaller proportion of structures similar to mammospheres generated from MaECs. All cells that comprise the spheres were CD24<sup>+</sup>, while the expression of the antigen CD29 was restricted to one or two cells in the tumorosphere, and a group of cells located at one end in the "mammosphere", similar distribution to MaECs-mammospheres show. In addition, mammary glands transplanted with only one "mammosphere" cultured from MaTCs did not develop tumors, however, 34 of the 44 mammary glands transplanted with only one tumorosphere developed tumors 2 months after the transplant, demonstrating that the tumorosphere contained at least one MaCSC, and it maintained its characteristics. Moreover, as from a single tumorosphere we could generate a tumor with a frequency of 1/1,29 (1/1,29 ±2SD 1/1,13-1/1,56), the cell capable of forming the tumorosphere probably represented a MaCSC. We could use the property to form tumorospheres as a surrogate measure for quantifying MaCSCs, and in this way we determined that 1 of 105 MaTCs from a tumor developed in a MMTV-Neu female was a MaCSC.

In order to identify the MaCSCs that originate the tumorospheres, we proceeded to determine the tumorosphere forming ability from different MaTC populations. The CD24<sup>med</sup>, CD24<sup>high</sup> and CD29<sup>high</sup> populations were enriched in tumorosphere formation in comparison with the total population of the MaTCs, whereas C-kit<sup>high</sup> population generated tumorospheres with a similar frequency to the total population (MaTCs). Because different populations were enriched in tumorospheres formation, and each of them represented a high percentage within

MaTCs, we combined antibodies in order to obtain a smaller enriched MaCSCs population. The CD24<sup>+</sup>CD29<sup>high</sup> and CD24<sup>+</sup>C-kit<sup>high</sup> populations, representing 5.2% and 1.71% of the total MaTCs population respectively, were highly enriched in MaCSC. Furthermore, the remaining of populations derived from the combination of antibodies did not generate any tumorosphere *in vitro*. However, using a triple labeling, CD24/CD29/C-Kit, we failed to isolate a population enriched in MaCSCs; CD24<sup>+</sup>C-kit<sup>high</sup>CD29<sup>med</sup> and CD24<sup>+</sup>C-kit<sup>high</sup>CD29<sup>high</sup> subpopulations generated tumorospheres. The combination of antibodies CD29/C-kit did not isolate a population enriched in MaSCs neither; all the resulting populations generated tumors when are transplanted in fat pads.

In addition, we studied male mammary gland biology, since they do not develop mammary tumors despite expressing the MMTV-Neu transgene, and yet, male mammary glands transplanted with MaTCs generated tumors with the same frequency and kinetics than in females. In males, the mammary epithelial structure remains rudimentary, although it grows isometrically with the rest of the body throughout the life of the mouse. In addition, the adult male ducts (11 weeks) were composed of ductal cells, that some of them expressed ER, surrounded by a layer of myoepithelial cells, similarly to female ducts of the same age. However, in 16-week-old males, the marker (TROMA-I) of the ductal cells decreased, and it is completely lost at week 23, without this affecting the duct structure. This blocking of luminal differentiation was not observed in the females. In contrast, the 24 weeks old males castrated at 3 and 8 weeks of age, had ducts similar to females ducts. In addition, adult females ovariectomized at 3 weeks of age did not change the composition of their mammary ducts. These results suggested that the absence, or low levels, of estrogen did not affect the blocking of luminal differentiation, being the androgens, synthesized during puberty in males the responsible for the blockade on ductal cell differentiation. However, such blocking was reversible when the cells were in a female hormone context, given the fact that when male MaECs, devoid of TROMA-I expression, were transplanted in de-epithelialized female stromas, the reconstituted mammary glands presented ducts similar to female ducts. *In vitro*, the results were different; the cells comprising the mammospheres generated from 19 weeks male and adult male castrated at 3 weeks old MaECs were unable to differentiate into cells of the luminal lineage; ductal and alveolar cells, regardless of the cells had been, or not, exposed to androgens.

We also studied differential expression of many genes in; i) adult females, ii) adult males and, iii) adult males castrated at 3 weeks old, in order to analyze if these could be candidates involved in the blocking of luminal differentiation in males by androgens. However, any of the studied genes, even genes implicated in luminal differentiation in the development of the mammary gland in females, were implicated in this blockade.



En el ratón, la glándula mamaria está compuesta por el estroma y por el tejido epitelial mamario, que presenta una estructura ductal. Dentro de las células epiteliales mamarias (MaECs) se encuentra una población de células madre (MaSCs), encargadas de mantener la homeostasis del órgano, y capaces de regenerar glándulas mamarias completas cuando se trasplantan en estromas mamarios libres de epitelio de hembras receptoras prepúberes.

Regeneramos glándulas mamarias trasplantando diferentes concentraciones de MaECs de hembras adultas, y el análisis de estas glándulas mamarias reconstituidas a nos permitió estimar que 1 célula, de cada 669 MaECs, era capaz de reconstituir una glándula mamaria completa. Además, la reconstitución de glándulas mamarias a partir de trasplantes seriados demostró que las células capaces de regenerar la glándula mamaria tenían capacidad de autorrenovación y de diferenciación, y que por tanto, dichas células eran células madre mamarias (MaSCs). También realizamos trasplantes a partir de distintas concentraciones de la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> de las MaECs, ya que está descrito que las MaSCs tienen el fenotipo CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup>. El análisis de las glándulas mamarias regeneradas nos permitió estimar que 1 célula, de cada 18,5 células de esta población desarrolla una glándula mamaria completa, incluso con estructuras alveolares durante la gestación. Estos datos, junto con el dato de que 1 de cada 166 MaECs es una MaSC, mostraron que la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> estaba enriquecida, al menos, 36 veces en MaSCs, en comparación con la población total de MaECs.

En general, los receptores de los trasplantes mamarios son hembras prepúberes, de manera que el pico de estrógeno liberado durante la pubertad en las hembras receptoras (que es el responsable de la elongación ductal) es usado para la regeneración de las glándulas mamarias. Sin embargo, nosotros pudimos regenerar glándulas mamarias utilizando hembras adultas como receptores. En este caso, el estrógeno liberado durante los sucesivos ciclos estrales fue suficiente para la reconstitución de la glándula mamaria, independientemente de que las células trasplantadas hubieran estado anteriormente expuestas al estrógeno o no. Por el contrario, los machos, en los que no se observa elongación ductal porque no presentan las señales hormonales adecuadas, no fueron capaces de reconstituir glándulas mamarias cuando se trasplantaron MaECs en sus estromas. A pesar de esto, las MaECs de macho trasplantadas en hembras fueron capaces de regenerar glándulas mamarias. Incluso, mediante trasplantes seriados a partir de las mamas regeneradas reconstituyen glándulas mamarias con estructuras alveolares capaces de secretar leche al final de la gestación de la hembra receptora. Nuestros resultados mostraron que las MaECs de los machos contenían una población de MaSCs con capacidad de autorrenovación y diferenciación en un contexto hormonal de hembra.

Sabiendo que las MaSCs de macho o de hembra eran capaces de reconstituir una glándula mamaria completa cuando se trasplantaban en hembras, evaluamos que células eran más aptas (las MaSCs de macho o de hembra) a la hora de regenerar una glándula mamaria. Los análisis de reconstituciones mamarias generadas a partir del trasplante de una mezcla de MaECs de macho y de hembra mostraron que las

glándulas mamarias regeneradas contenían mayor cantidad de MaECs de hembra, sugiriendo que podría haber competencia entre las MaSCs de hembra y macho. Estos resultados se confirmaron aumentando la proporción MaECs de macho respecto a las MaECs de hembra (3:1), ya que con estas proporciones, la mayoría de las glándulas mamarias regeneradas estaban compuestas por células procedentes de la hembra, indicando que las células de la hembra tenían ventaja en la regeneración de glándulas mamarias *versus* las células del macho.

Las MaECs de hembra y de macho, además de ser capaces de regenerar glándulas mamarias, generan mamosferas *in vitro*. Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado que sólo la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> es capaz de generar mamosferas *in vitro*, y que en cada mamosfera hay una única célula capaz de generar nuevas mamosferas. Las células de la mamosfera retenían su potencial de célula madre, ya que una sola mamosfera trasplantada en una hembra receptora era capaz de regenerar una glándula mamaria completa (frecuencia 1/20  $\pm$ 2SD 78,5-5,39). La capacidad de que una única mamosfera regenere una glándula mamaria parecía indicar la presencia de una MaSC dentro de la mamosfera, no sólo progenitores, ya que la mamosfera era capaz de reconstituir en trasplantes seriados, como demostramos en los experimentos de trasplantes secundarios, terciarios y cuaternarios. Estos datos sugirieron que la frecuencia de células que forman mamosferas podría ser usada para estimar el número de MaSCs en muestras epiteliales mamarias.

Mediante la cuantificación de mamosferas, se ha demostrado que en las hembras, durante la pubertad hay una expansión de las MaSCs de 20 veces, y los datos de nuestro laboratorio implican a las hormonas sexuales como las responsables de dicha expansión. Con la finalidad de demostrar si la expansión detectada durante la pubertad se debía a la señalización del estrógeno, ya que hay un pico de estrógeno durante este estado, determinamos el número de MaSCs antes y después de la pubertad en ratonas AREG<sup>-/-</sup>, que son deficientes en la síntesis del factor de crecimiento anfirregulina (factor implicado en la ruta de señalización del estrógeno). Nuestros resultados demostraron que no habían diferencias significativas en el número de MaSCs entre ratonas AREG<sup>-/-</sup> prepúberes y adultas, confirmando que el estrógeno, y no otras hormonas sexuales, era el responsables de controlar la expansión de las MaSCs durante la pubertad.

La síntesis de anfirregulina es necesaria para la expansión de las MaSCs y la consecuente elongación ductal, ya que las ratonas AREG<sup>-/-</sup> no presentan elongación ductal en las glándulas mamarias y las glándulas mamarias de las ratonas silvestres trasplantadas con MaECs de ratonas AREG<sup>-/-</sup> no se regeneraron, a pesar de que hubo síntesis de estrógeno durante la pubertad. Sin embargo, no es necesario que todas las células ER<sup>+</sup> secreten anfirregulina; las glándulas mamarias trasplantadas con una mezcla de MaECs de ratona AREG<sup>-/-</sup> y MaECs de ratona silvestre fueron reconstituidas, demostrando así, que el bloqueo en la expansión de las MaSCs debido a la ausencia de anfirregulina se podía *bypassear* mediante la anfirregulina secretada por las células silvestres en respuesta al estrógeno sintetizado durante la pubertad. La anfirregulina

actuaría directamente en las MaSCs silvestres como en las AREG<sup>-/-</sup>, permitiendo la expansión necesaria para regenerar la glándula mamaria. Además, en las hembras AREG<sup>+/-</sup>, la cantidad de anfirregulina era suficiente para la expansión de las MaSCs, ya que estas hembras presentan un desarrollo de la glándula mamaria similar al de las hembras silvestres.

Además del estrógeno sintetizado durante la pubertad, también está descrito que las hormonas sexuales secretadas durante la gestación tienen un efecto en la expansión de las MaSCs. Con cada gestación se observa un aumento de 3 veces de las MaSCs. Adicionalmente, en las hembras silvestres, durante la involución de la glándula mamaria hay una reducción de las MaSCs, volviendo a los niveles presentes en las hembras adultas no gestantes.

En las glándulas mamarias de hembras AREG<sup>-/-</sup>, en las que no ha habido elongación ductal durante la pubertad, se observó, después del parto, ramificación ductal y la formación de estructuras alveolares capaces de secretar leche. Todos estos cambios estaban acompañados por un aumento de 18,8 veces de las MaSCs. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en las hembras silvestres, las glándulas mamarias AREG<sup>-/-</sup> después de la involución no presentaban una estructura epitelial similar a la de las mamas de hembras adultas AREG<sup>-/-</sup>. Además, observamos un aumento de 9,5 veces en el número de MaSCs con respecto a las presentes en hembras adultas. Por el contrario, con la segunda y sucesivas gestaciones, había una expansión de las MaSCs de 2 veces, que se retraía completamente con la involución.

El estrógeno permite un aumento en el número de las MaSCs y el consecuente aumento en la celularidad del órgano. Este mecanismo podría ser potencialmente relevante para entender la tumorigénesis mamaria, ya que proporciona una base celular en la disminución de 100 veces de la frecuencia de tumores mamarios en hombres, así como en mujeres prepúberes, comparada con las mujeres adultas, que podría estar relacionado con la falta de expansión de las MaSCs impulsada por hormonas. Estudiamos si la expansión de las MaSCs podría tener un efecto en el desarrollo de tumores en ratones MMTV-Neu. Disminuyendo el tiempo de exposición de las ratonas al estrógeno sintetizado durante la pubertad, mediante ovariectomías a distintas edades, decreció la frecuencia de tumores de mama, y el tiempo requerido para la aparición del tumor aumentó. No pudimos descartar un papel de las hormonas sexuales sintetizadas durante los ciclos estrales, ya que no todas las hembras ovariectomizadas a las 8 semanas desarrollan tumores, aunque la cinética de aparición de los mismos es similar a la de las ratonas control. Sin embargo, con este modelo de ratón no pudimos analizar el efecto de aumentar la expansión de las MMTV-Neu MaSCs realizando trasplantes seriados, de manera que con cada trasplante, las MaSCs estarían sometidas a una nueva expansión. Las glándulas mamarias de ratonas singénicas trasplantadas con MMTV-Neu MaECs en estromas de hembras FVB se regeneraron, pero no desarrollaron tumores. Tampoco desarrollaron tumores las glándulas mamarias de hembras FVB reconstituidas con epitelio mamario pre-neoplásico de una hembra MMTV-Neu, ni las glándulas mamarias de hembras MMTV-Neu reconstituidas con MaECs de hembras salvajes. Estos datos demostraron

que la expresión del transgén Neu en el epitelio mamario era necesaria, aunque no suficiente, para el desarrollo de tumores en ratón. Adicionalmente, el fondo genético de ratón FVB también era determinante en el desarrollo de tumores en el modelo MMTV-Neu, mientras que la expresión del transgén Neu en homocigosis o heterocigosis no; mientras que todas las ratonas FVB que expresaban el transgén Neu en heterocigosis desarrollaban tumores mamarios, las ratonas heterocigotas MMTV-Neu que eran 50% FVB y 50% C57Bl/6 no desarrollaban tumores.

Al contrario que las MMTV-Neu MaECs, las células que componen los tumores mamarios desarrollados en ratonas MMTV-Neu (MMTV-Neu MaTCs) eran capaces de desarrollar tumores al ser trasplantadas en estromas, libres de epitelio ó completamente rellenos de ductos, de hembras receptoras silvestres, o en estromas de machos. Los tumores secundarios eran similares a los tumores primarios, sin importar el contexto hormonal de los receptores. Las MMTV-Neu MaTCs presentaban fenotipos diferentes a los observados en FVB MaECs. Las MMTV-Neu MaTCs perdieron las poblaciones con expresión más alta de CD29 y CD61, y redujeron dramáticamente la población que expresaba altos niveles de Sca-1. Por el contrario, en las MMTV-Neu MaTCs, aumenta la población con alta expresión en CD24 y C-kit, y en el caso de C-kit, incluso aparece una nueva población con mayor expresión del antígeno.

Las MaTCs con propiedades de células madre y progenitores se mantienen *in vitro*, en las mismas condiciones que se mantienen las células madre y progenitores de glándula mamaria, en forma de esferas no adherentes. Células aisladas de tumores desarrollados en hembras MMTV-Neu se sembraron en condiciones en las que estaba impidiendo la adherencia al plástico, y después de 7 días, se generaron dos tipos de colonias esféricas flotantes; una gran cantidad de estructuras esféricas, compactas, y aparentemente delimitadas por una capa celular, a las que denominamos tumorosferas, y una pequeña proporción de estructuras similares a las mamosferas generadas a partir de MaECs. Todas las células que componen las esferas eran CD24<sup>+</sup>, mientras que la expresión del antígeno CD29 estaba restringida a una o dos células en la tumorosfera, y a un conjunto de células localizadas en un extremo en la "mamosfera", distribución similar a la que presentan las mamosferas procedentes de MaECs. Las glándulas mamarias trasplantadas con una "mamosfera" del cultivo de MaTCs no desarrollaron tumores, sin embargo, 34 de las 44 mamas trasplantadas con una tumorosfera desarrollaron tumores a partir de los 2 meses del trasplante, demostrando que la tumorosfera contenía al menos una MaCSC, y que ésta mantenía sus características. Además, como a partir de una sola tumorosfera se podía generar un tumor con una frecuencia de 1/1.29 (1/1,29 ±2SD 1,13-1,56), la célula capaz de formar la tumorosfera probablemente representaba una MaCSC. Estos datos nos permitieron utilizar la capacidad de formación de tumorosferas como medida de cuantificación de las MaCSCs, y de ésta forma determinamos que 1 de cada 105 células de un tumor desarrollado en una hembra MMTV-Neu era una MaCSC.

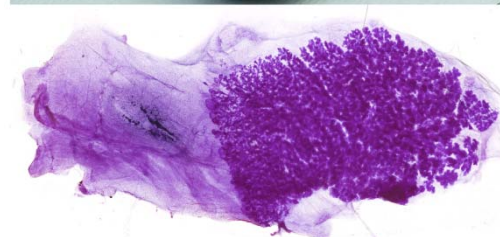
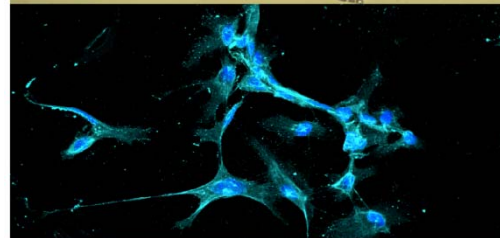
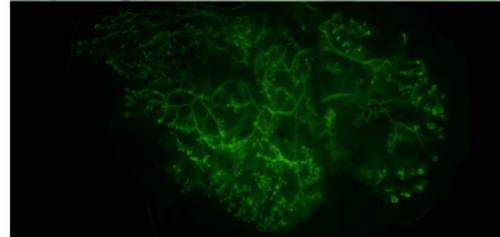
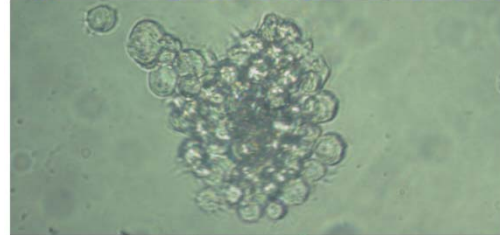
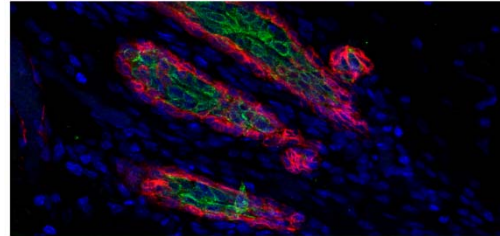
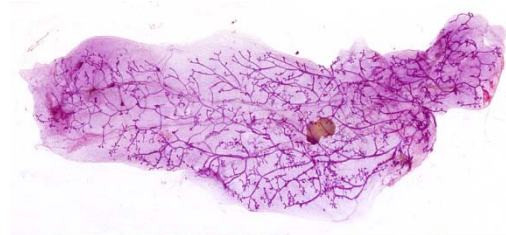
Con la finalidad de identificar las MaCSCs que originan las tumorosferas, procedimos a determinar la capacidad de formación de tumorosferas de distintas poblaciones de las MaTCs. Las poblaciones CD24<sup>baja</sup>, CD24<sup>alta</sup> y CD29<sup>alta</sup> estaban enriquecidas en la

formación de tumorosferas en comparación con la población total de MaTCs, mientras que la población c-kit<sup>alta</sup> generaba tumorosferas con una frecuencia similar a la población total (MaTCs). Debido a que distintas poblaciones estaban enriquecidas en la formación de tumorosferas, y que cada una de ellas representaba un porcentaje alto dentro de las MaTCs, combinamos anticuerpos con el objetivo de obtener una población más pequeña enriquecida en MaCSCs. Las poblaciones de MaTCs CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> y CD24<sup>+</sup>C-kit<sup>alta</sup>, que representaban el 5,2% y 1.71% de la población de MaTCs respectivamente, estaban altamente enriquecidas en MaCSC. Además, el resto de las poblaciones resultantes de la combinación de anticuerpos no generaron ninguna tumorosfera *in vitro*. Sin embargo, mediante un triple marcaje, CD24/CD29/C-Kit, no conseguimos aislar una población enriquecida en MaCSCs; las subpoblaciones CD24<sup>+</sup>C-kit<sup>alta</sup>CD29<sup>media</sup> y CD24<sup>+</sup>C-kit<sup>alta</sup>CD29<sup>alta</sup> generaron tumorosferas. La combinación de anticuerpos CD29/C-kit tampoco aisló la población enriquecida en MaCSCs; todas las poblaciones resultantes generaron tumores cuando fueron trasplantadas en estromas mamarios.

Por otra parte, estudiamos la biología de las glándulas mamarias de los machos, ya que éstos no desarrollan tumores mamarios a pesar de expresar el transgén MMTV-Neu, y sin embargo, los trasplantes de MaTCs en machos generan tumores con la misma frecuencia y cinética que en hembras. En los machos se mantiene la estructura epitelial mamaria rudimentaria, aunque ésta crece isométricamente con el resto del cuerpo a lo largo de la vida del ratón. Además, los ductos de machos adultos (11 semanas) estaban compuestos por células ductales, algunas de ellas con expresión de ERs, rodeadas de una capa de células mioepiteliales, composición similar a la que presentan los ductos de las hembras de la misma edad. Sin embargo, en los machos, a partir de las 16 semanas de edad se observaba un descenso en la expresión del marcaje (TROMA-I) de las células ductales, perdiéndose completamente en la semana 23, sin que esto afectara a la propia estructura del ducto. Dicho bloqueo de la diferenciación luminal no se observaba en las hembras. En contraposición, los machos de 24 semanas de edad castrados a las 3 y 8 semanas de edad, presentaban ductos similares a los de las hembras. Además, las hembras adultas ovariectomizadas a las 3 semanas de edad no variaban la composición de sus ductos mamarios. Estos resultados sugirieron que la ausencia o los bajos niveles de estrógeno no afectaban al bloqueo de la diferenciación luminal, siendo los andrógenos, no sólo los sintetizados durante la pubertad por los machos, los responsables de que el bloqueo de la diferenciación ductal. Sin embargo, dicho bloqueo era reversible cuando las células se encontraban en un contexto hormonal de hembra, ya que cuando se trasplantaron MaECs de machos, que no expresaban el marcador ductal (TROMA-I), en estromas de hembras, se observaron glándulas mamarias reconstituidas con ductos similares a los presentes en las mamas de hembras silvestres. *In vitro*, los resultados eran distintos; las células que componían las mamíferas generadas a partir de MaECs de machos de 19 semanas y de machos adultos castrados a las 3 semanas de edad, eran incapaces de diferenciarse a células del linaje luminal; células ductales y alveolares, sin importar que las MaECs hubieran estado, o no, expuestas a los andrógenos.

También estudiamos la expresión diferencial de algunos genes en; i) hembras adultas, ii) machos adultos, y iii) machos adultos castrados a las 3 semanas de edad, para analizar si podrían ser candidatos implicados en el bloqueo de la diferenciación luminal en los machos por los andrógenos. Sin embargo, ninguno de los genes estudiados, incluso los genes implicados en la diferenciación luminal en el desarrollo de la glándula mamaria en hembras, estaban implicados en este bloqueo.

# **INTRODUCCIÓN**

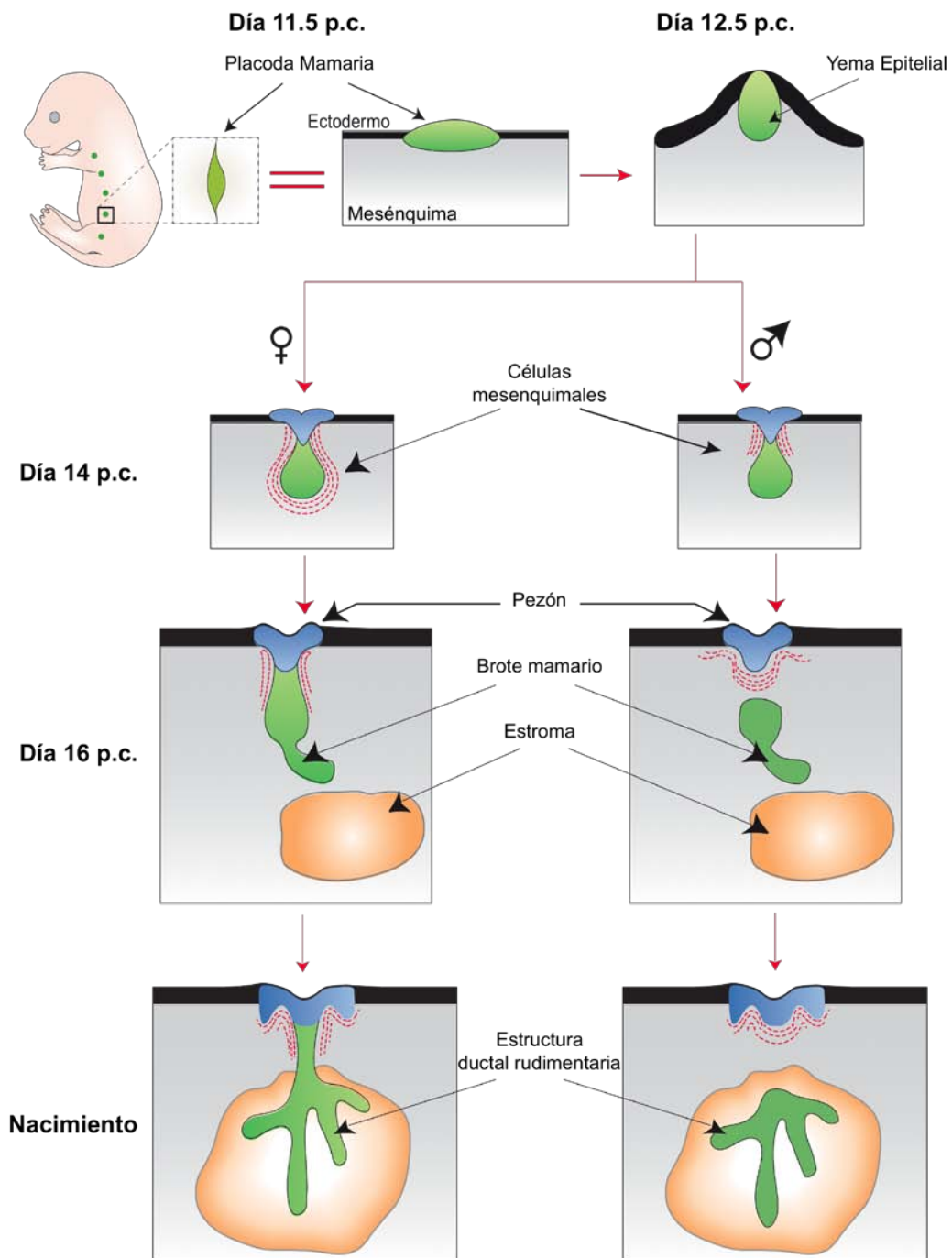


La glándula mamaria es un órgano característico de los mamíferos, que tiene como función principal producir leche para alimentar a las crías después del nacimiento (Ofstedal, 2002). Aunque su desarrollo comienza en el embrión, la glándula mamaria continúa desarrollándose después del nacimiento, durante la pubertad y la gestación, encontrándose completamente desarrollada en los últimos días de la gestación (Daniel et al., 1987).

### **Desarrollo embrionario de la glándula mamaria**

En el ratón, la formación de las glándulas mamarias comienza en el embrión, con la formación de las líneas lactíferas en la parte ventral a partir del engrosamiento del ectodermo (Hens and Wysolmerski, 2005; Veltmaat et al., 2003). A día 11.5 p.c. (post coito) se observan cinco pares de placodas (Chu et al., 2004; Veltmaat et al., 2004), y cada una de ellas crece y se invagina en el mesénquima subyacente formando una yema epitelial en forma de bulbo, que se detecta hasta el día 14 p.c. (Sakakura et al., 1987) (Figura 1). A partir de este día, existe dimorfismo sexual entre hembras y machos. En las hembras, a día 16 p.c. la yema epitelial crece, denominándose brote mamario, y desciende por el mesénquima hasta alcanzar el estroma, donde comienza a bifurcarse formando una estructura ductal ramificada (Cowin and Wysolmerski, 2010) (Figura 1). Sin embargo, en machos, y como consecuencia de la acción de los andrógenos que se secretan vía testicular a partir del día 13 p.c. (Kratowil and Schwartz, 1976), a día 14 p.c. las células mesenquimales situadas alrededor de la yema epitelial se condensan alrededor del cuello de ésta hasta romper la conexión con la estructura de la epidermis que dará lugar al pezón (Heuberger et al., 1982; Kratowil and Schwartz, 1976; Veltmaat et al., 2003), observándose apoptosis de células epiteliales (Dunbar et al., 1999). Asimismo, a pesar de que la yema pierde la conexión con la epidermis, ésta crece (brote mamario) hasta alcanzar el estroma, donde comienza a bifurcarse formándose una estructura ductal ramificada (Figura 1). A partir del día 16 p.c. la piel que cubre el mesénquima primario se remodela, estructurándose en forma de pezón (Foley et al., 2001) (Figura 1), aunque en algunas cepas de ratón, los andrógenos impiden la formación de éste (Durnberger and Kratowil, 1980). En el momento del nacimiento, las glándulas mamarias están compuestas por una estructura epitelial rudimentaria, unida al pezón en las hembras y aislada dentro del estroma en los machos, y un estroma completamente desarrollado (Russo, 1989; Topper and Freeman, 1980)(Figura 1).

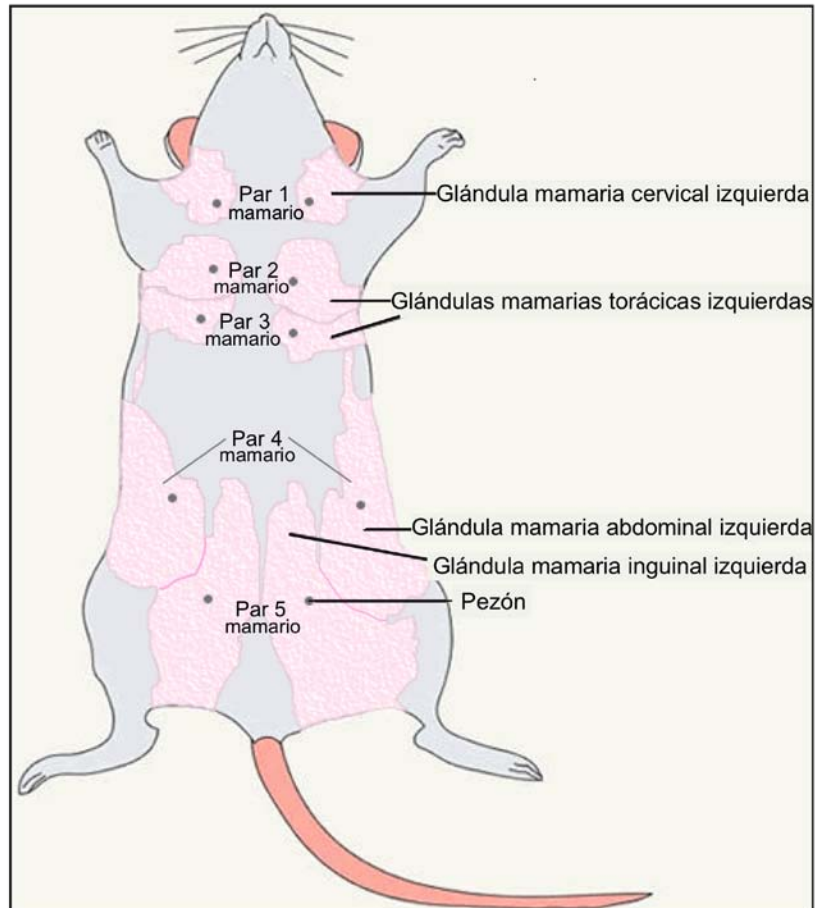
En humanos, a diferencia del ratón, el embrión sólo forma un par de placodas durante el primer trimestre de la gestación (Howard and Gusterson, 2000), las cuales se desarrollan de forma similar a las de los ratones hembra, sin que exista dimorfismo sexual (Raouf et al., 2012). En el momento del nacimiento, tanto las hembras como los machos, presentan glándulas mamarias compuestas por una estructura epitelial rudimentaria unida al pezón.



**Figura 1. Desarrollo embrionario de la glándula mamaria de ratón.** El engrosamiento del ectodermo genera las dos líneas lactíferas en la parte ventral del ratón, dividiéndose cada una de éstas en 5 placodas individuales. Cada placoda crece y se invagina el mesénquima formando una yema epitelial. A partir del día 14 p.c. existe dimorfismo sexual. En las hembras, la yema crece (brote mamario) hasta alcanzar el estroma mamario, donde comienza a bifurcarse. En los machos, a pesar de que la yema pierde la conexión con la epidermis, ésta crece (brote mamario) hasta alcanzar el estroma mamario, donde comienza a bifurcarse. Asimismo, en ambos casos, a partir de día 16 p.c. la epidermis se remodela, formándose el pezón. En el momento del nacimiento, en cada glándula mamaria del feto se observa una estructura ductal rudimentaria, unida al pezón en las hembras, y aislada dentro del estroma en los machos. Adaptado de (Cowin and Wysolmerski, 2010).

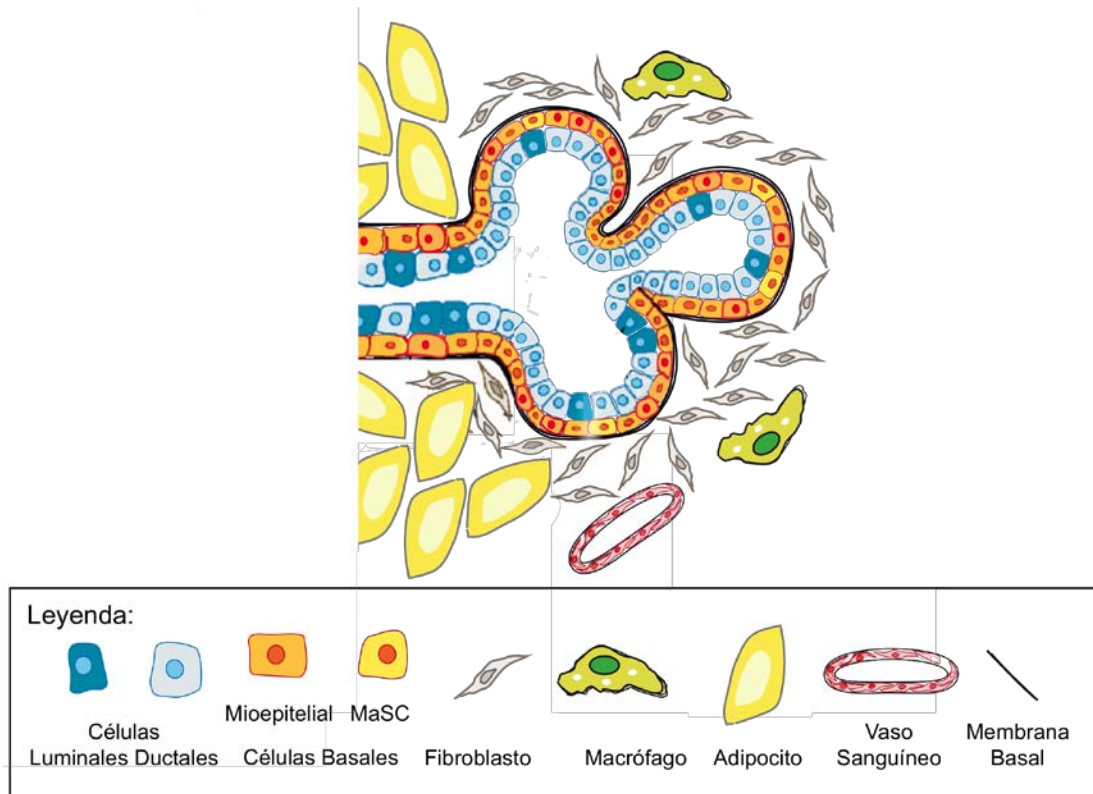
## Morfología de la glándula mamaria

En el ratón hay 5 pares de glándulas mamarias que se localizan justo por debajo de la piel y que se extienden desde la región torácica (tres pares) hasta la región inguinal (dos pares) del animal, a lo largo de la denominada línea lactífera (Richert et al., 2000) (Figura 2).



**Figura 2. Localización de las glándulas mamarias de ratón.** Existen 5 pares de glándulas mamarias en el ratón: par 1 (cervicales), par 2 y 3 (torácicas), par 4 (abdominales), y par 5 (inguinales).

La glándula mamaria está compuesta por el estroma mamario (formado por adipocitos, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales), y por el tejido epitelial mamario, que presenta una estructura ductal con una capa interna de células luminales ductales rodeada por una capa externa de células basales mioepiteliales (Richert et al., 2000) (Figura 3). Las células luminales ductales rodean a un lumen central, y al final de la gestación se diferencian a células luminales alveolares (Oakes et al., 2006), mientras que las células mioepiteliales rodean a las células luminales, separando las estructuras epiteliales propiamente dichas del compartimento estromal (Figura 3). Las células mioepiteliales son las responsables de secretar los componentes de la membrana basal (Williams and Daniel, 1983), y durante la lactancia tienen una función contráctil, encargándose de eyectar la leche desde los alvéolos a los ductos (Asch and Asch, 1985; Dulbecco et al., 1986; Richardson, 1949).



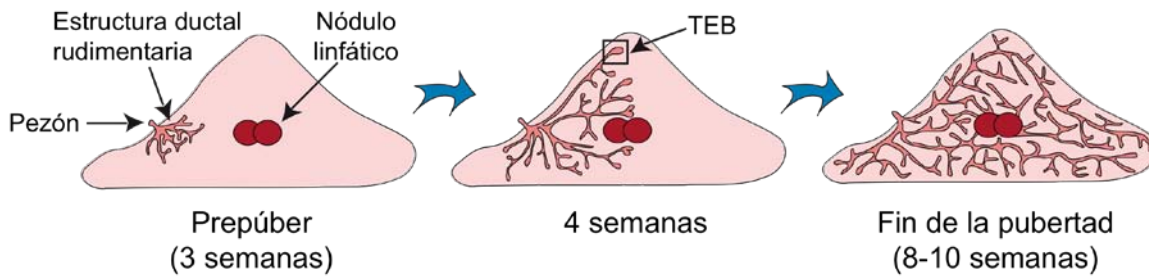
**Figura 3. Composición de la glándula mamaria.** La glándula mamaria está compuesta por el estroma y por el tejido epitelial mamario, que presenta una estructura ductal. Mientras que los ductos están formados por células ductales y basales (células mioepiteliales y células madre de la glándula mamaria (MaSCs)), el estroma está formado por adipocitos, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos. Adaptado de (Joshi et al., 2012).

## Desarrollo post-embrionario de la glándula mamaria

Desde el nacimiento del ratón hasta el inicio de la pubertad, las glándulas mamarias crecen isométricamente con el resto del cuerpo (Daniel et al., 1987; Sakakura et al., 1987). Sin embargo, durante la pubertad el crecimiento no es isométrico, y además se producen cambios durante los ciclos estrales y la gestación que a continuación se describen por separado:

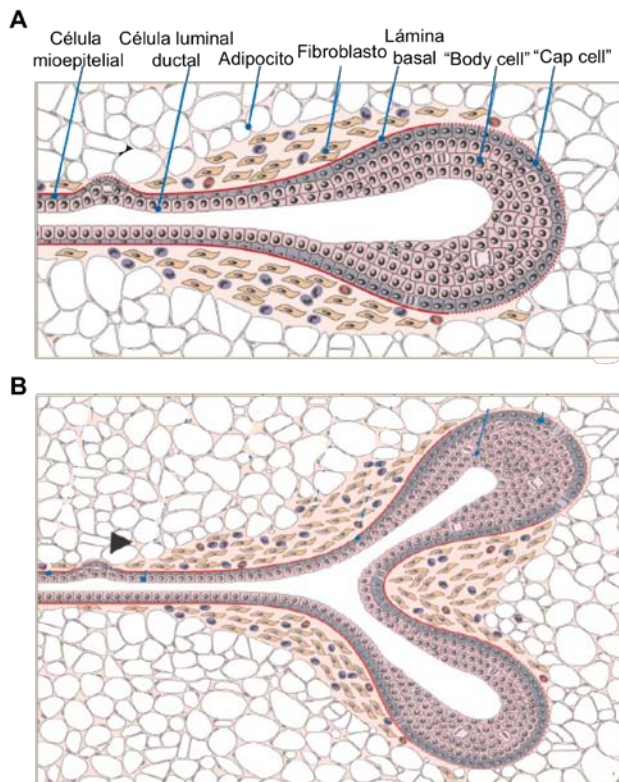
### Pubertad

Durante la pubertad (periodo caracterizado por la maduración de los órganos sexuales), que en ratones comprende aproximadamente desde la tercera hasta la octava semana, las glándulas mamarias de las hembras continúan su desarrollo, caracterizado por un rápido crecimiento ductal (Daniel et al., 1987; Williams and Daniel, 1983) (Figura 4). Sin embargo, la estructura del epitelio mamario en los machos sigue siendo rudimentaria, igual que en el nacimiento (Figura 4), y permanece inalterada durante la vida adulta del ratón (Robinson, 2007).



**Figura 4. Desarrollo de la glándula mamaria en ratonas durante la pubertad.** A las 3 semanas de edad, se observa una estructura epitelial mamaria rudimentaria, la cual no alcanza el nódulo linfático. Cuando los niveles de estrógeno comienzan a elevarse en la pubertad, se forman en la parte apical de los ductos las yemas terminales (TEBs), encargadas de la elongación y bifurcación ductal. A las 8-10 semanas, al final de la pubertad, el estroma mamario se encuentra relleno de ductos ramificados y las TEB desaparecen. Adaptado de (Watson et al., 2011).

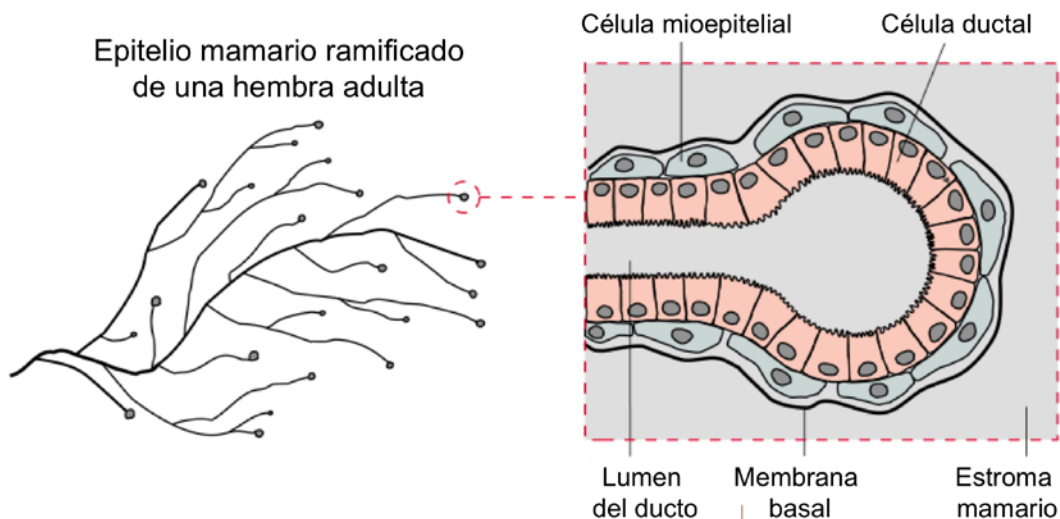
Al comienzo de la pubertad, se observa en las glándulas mamarias de las hembras un ensanchamiento en la parte apical de las ramificaciones del ducto rudimentario, que corresponde a la formación de la yema terminal (TEB) (J. Russo, 1990; Russo, 1989) (Figura 4). Las TEBs están compuestas por una capa externa de células denominadas “cap cells”, y varias capas internas de células denominadas “body cells” (Figura 5A). Mientras que las “cap cells” son capaces de diferenciarse tanto a células mioepiteliales (Russo and Russo, 1996), como a ductales una vez que migran a las capas internas de la TEB (Silberstein, 1987), las “body cells” eventualmente darán lugar a células ductales diferenciadas (Williams and Daniel, 1983). Además, las TEBs, que son los sitios de mayor proliferación de la glándula mamaria, no presentan tejido conectivo ni células mioepiteliales a su alrededor (Figura 5A), lo que facilita la invasión en el estroma en los procesos de elongación y bifurcación ductal (Russo and Russo, 1996; Silberstein, 1987; Williams and Daniel, 1983).



**Figura 5. Yema terminal (TEB).** (A) Representación esquemática de la TEB, donde se puede observar una capa de “cap cells” y varias capas de “body cells”. Además, el cuello del TEB está rodeado por la membrana basal y un estroma rico en fibroblastos, y ambos desaparecen en la parte más distal del TEB. (B) Bifurcación de la TEB y ramificación lateral de los ductos. Las TEBs se bifurcan formando ramificaciones primarias y secundarias de los ductos inmaduros. En el punto de ramificación, según la TEB avanza por el estroma, se vuelve a observar la presencia de membrana basal y fibroblastos en el estroma. Por el contrario, la ramificación lateral o terciaria tiene lugar en los ductos maduros, mediante la formación de estructuras similares a las TEBs. Adaptado de (Sternlicht, 2006).

A medida que la TEB invade el estroma, la parte de la TEB adyacente al ducto adquiere estructura ductal (Figura 5A), permitiendo así la denominada elongación ductal. El nuevo ducto está compuesto por una capa interna de células ductales que rodean al lumen, generado a partir de la apoptosis de las “body cells” localizadas en las capas más internas, y una capa externa de células mioepiteliales (Humphreys et al., 1996). Además, el nuevo ducto se rodea por membrana basal y fibroblastos del estroma (Williams and Daniel, 1983).

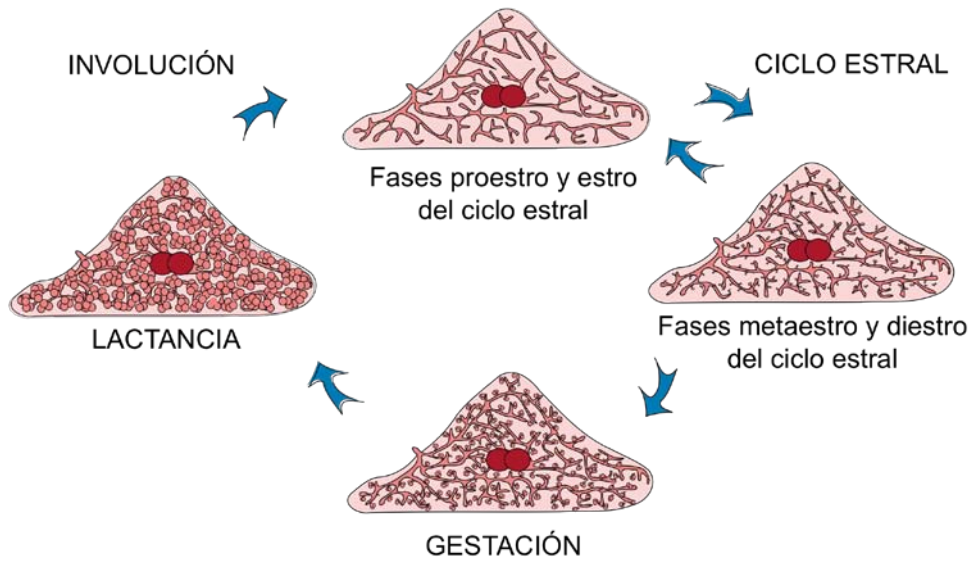
La TEB, a la vez que invade el estroma, es capaz de bifurcarse, generándose de ésta forma ramificaciones primarias y secundarias de los ductos (Gordon and Bernfield, 1980; Silberstein and Daniel, 1982) (Figura 5B). Sin embargo, la ramificación lateral o terciaria de los ductos, tiene lugar en los ductos maduros, mediante la formación de estructuras similares a las TEBs (Silberstein, 1987)(Figura 5B). Finalmente, las TEBs desaparecen cuando alcanzan el tejido conectivo que rodea a un ducto ó la cápsula que contiene al estroma, y se forman las terminaciones de los ductos (Silberstein et al., 1992; Silberstein et al., 1994) (Figura 6). Alrededor de las 8-10 semanas de edad el estroma mamario está completamente invadido por ductos, y la mayor parte de las TEBs han desaparecido (Richert et al., 2000) (Figura 4).



**Figura 6. Estructura de las terminaciones ductales al finalizar la pubertad.** Las ratonas hembras adultas presentan estromas mamarios completamente rellenos de ductos ramificados, cuyas terminaciones presentan una composición celular igual a la del propio ducto.

### Ciclo estral

El epitelio mamario de la ratona adulta cambia cíclicamente con cada ciclo estral (Fata et al., 2001), el cual tiene una duración de cuatro días, y está dividido en cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro (Goldman et al., 2007). En las glándulas mamarias, al final de cada ciclo estral, se observan ramificaciones terciarias de los ductos con yemas alveolares en los extremos, anticipándose a una posible gestación (Andres and Strange, 1999), y desaparecen al iniciarse el siguiente ciclo, al no haber habido gestación (Smalley and Ashworth, 2003) (Figura 7).

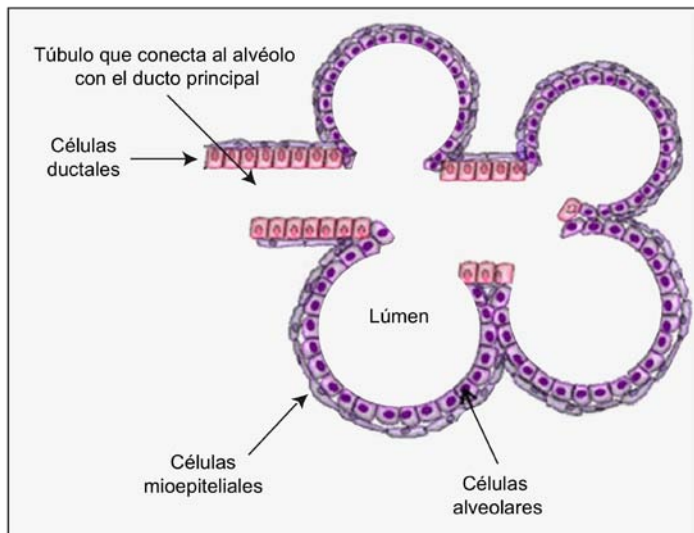


**Figura 7. Cambios en la glándula mamaria de ratones hembra durante los ciclos estrales, la gestación, la lactancia y la involución.** Al final de cada ciclo estral, se induce la formación de ramificaciones laterales con yemas alveolares en los extremos, que desaparecen con el próximo ciclo estral si no hay gestación. Con la gestación, aumenta el número de ramificaciones laterales, y las yemas alveolares se unen formando alvéolos, en los cuales comienza la diferenciación alveolar de las células luminales. Durante la lactancia, las células luminales alveolares secretan leche, y la mayoría del estroma se encuentra ocupado por alvéolos mamarios. Al final de la lactancia, y tras el destete de las crías, la glándula mamaria sufre un proceso de remodelación denominado involución. Adaptado de (Watson et al., 2011).

### Gestación y lactancia

El inicio de la gestación en el ratón induce en la glándula mamaria la formación de ramificaciones terciarias con yemas alveolares en sus extremos, al igual que durante la última fase del ciclo estral (Figura 7). También se aprecian cambios en el estroma; aumenta el tamaño de los adipocitos y el nivel de irrigación (Nandi, 1958).

Durante la segunda mitad de la gestación, las yemas alveolares se unen generando alvéolos (Figura 8). Los alvéolos están compuestos por una capa de células alveolares rodeada de una capa de células mioepiteliales. A su vez, las células alveolares se encuentran situadas alrededor del lumen del alvéolo, el cual está conectado mediante un pequeño túbulo al ducto principal (Figura 8), encargado de conducir la leche hasta el pezón (Oakes et al., 2006).



**Figura 8. Representación esquemática del alvéolo mamario.** El alvéolo mamario se forma mediante la unión de yemas alveolares, y está compuesto por una capa de células mioepiteliales que rodea a una capa de células alveolares. Las células alveolares contactan con el lumen del alvéolo, y éste, a su vez, está conectado mediante un pequeño tubo con el ducto principal que termina en el pezón. Adaptado de (Gajewska et al., 2008).

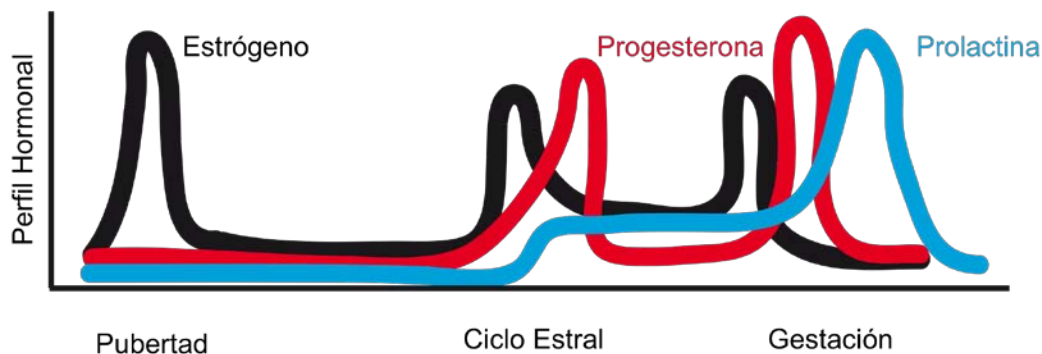
Hacia el día 18 p.c., las células alveolares que conforman la mayoría de la mama son capaces de sintetizar proteínas de la leche y lípidos, estando preparadas para la lactancia (Mather and Keenan, 1998). Asimismo, aproximadamente entre las 48-24 horas previas al parto, se observan células alveolares con forma piramidal rodeadas por una capa discontinua de células mioepiteliales. Dichas células permiten el contacto de las células alveolares con la membrana basal, crítico para su completa diferenciación y para la síntesis de leche (Adams and Watt, 1993; Barcellos-Hoff et al., 1989; Ferguson et al., 1992). En el parto, en respuesta a la oxitocina liberada por el hipotálamo, las células mioepiteliales comienzan a contraerse y fuerzan la eyección de la leche desde los alvéolos hacia el ducto principal (Asch and Asch, 1985; Dulbecco et al., 1986; Richardson, 1949). Durante el periodo de lactancia, y debido a las necesidades energéticas del tejido, la grasa de los adipocitos se metaboliza y los alvéolos se expanden, ocupando prácticamente toda la mama (Neville, 1999) (Figura 7).

### Involución

El fin de la lactancia está determinado por el destete, que provoca en las mamas un proceso de apoptosis y remodelación denominado involución (Quarrie et al., 1995). Tras el destete se pueden observar dos fases distintas. La primera fase corresponde a las primeras 48 horas tras el destete, donde las glándulas mamarias no presentan cambios histológicos con respecto a las mamas lactantes (Furth, 1999; Li et al., 1997). Es una fase reversible, ya que durante este periodo se puede reanudar la lactancia. La segunda fase del proceso de involución es, sin embargo, irreversible. Coincidiendo con el cuarto día desde el comienzo de la involución, se registra un incremento significativo del número de células alveolares que son eliminadas por macrófagos o por células epiteliales vecinas (Fadok, 1999; Richards and Benson, 1971), y a día 21, la remodelación de la mama se ha completado, presentando un aspecto similar al de antes de la gestación (Strange et al., 1992) (Figura 7).

## Función de las hormonas sexuales en el desarrollo de la glándula mamaria

Las hormonas no juegan ningún papel en el desarrollo embrionario de la glándula mamaria, a pesar de que las mamas embrionarias expresen receptores hormonales, y que el feto esté expuesto a altos niveles de hormonas procedentes de la placenta de la madre (Hennighausen and Robinson, 2001; Hovey et al., 2002). Se ha observado que las mamas de embriones deficientes en receptores hormonales son similares a las mamas de embriones silvestres (WT) (Bocchinfuso et al., 2000; Curtis Hewitt et al., 2000). En el embrión, las etapas iniciales del desarrollo mamario dependen de señales entre epitelio y mesénquima (Cunha et al., 1995). Sin embargo, las hormonas sexuales, tanto estrógeno como progesterona y prolactina, sintetizadas durante la pubertad, los ciclos estrales y/o la gestación (Figura 9), tienen un papel importante en el desarrollo postembrionario de la glándula mamaria (Brisken and O'Malley, 2010).



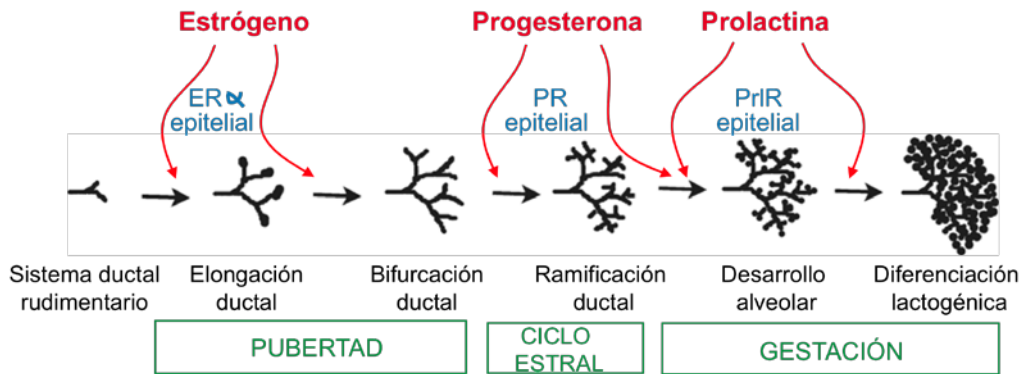
**Figura 9. Perfil hormonal durante la pubertad, los ciclos estrales y la gestación.** La síntesis de hormonas sexuales fluctúa a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo. Se observan picos de estrógeno durante la pubertad, en las primeras fases del ciclo estral y al principio de la gestación, sin embargo los picos de progesterona se observan en las últimas fases del ciclo estral, y en la primera mitad de la gestación. Asimismo el pico de prolactina se observa en la segunda mitad de la gestación. Adaptado de (Joshi et al., 2012).

### Estrógeno

El estrógeno sintetizado durante la pubertad está implicado en la elongación ductal (Daniel et al., 1987; Williams and Daniel, 1983) (Figura 10). Sin embargo, el estrógeno liberado en cada ciclo estral y al principio de la preñez no está implicado en cambios aparentes de las glándulas mamarias, aunque induce la expresión de PR y facilita la sensibilidad de las células luminales a la progesterona (Beleut et al., 2010; Haslam and Shyamala, 1979; Shoker et al., 1999).

Aunque el epitelio y el estroma de la glándula mamaria expresan dos tipos de receptores de estrógeno (ER); ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Daniel et al., 1987), sólo los ER $\alpha$  están implicados en la señalización requerida para la elongación ductal, ya que las mamas de hembras adultas deficientes en ER $\beta$  (ER $\beta^{-/-}$ ) se asemejan a las mamas de hembras WT adultas (Antal et al., 2008). En cambio, las mamas de las hembras deficientes en ER $\alpha$  (ER $\alpha^{-/-}$ ) tienen el desarrollo bloqueado a partir del comienzo de la pubertad (Bocchinfuso et al., 2000). Además, sólo la señalización epitelial de ER $\alpha$  es requerida para la elongación ductal y, directa o indirectamente, para la

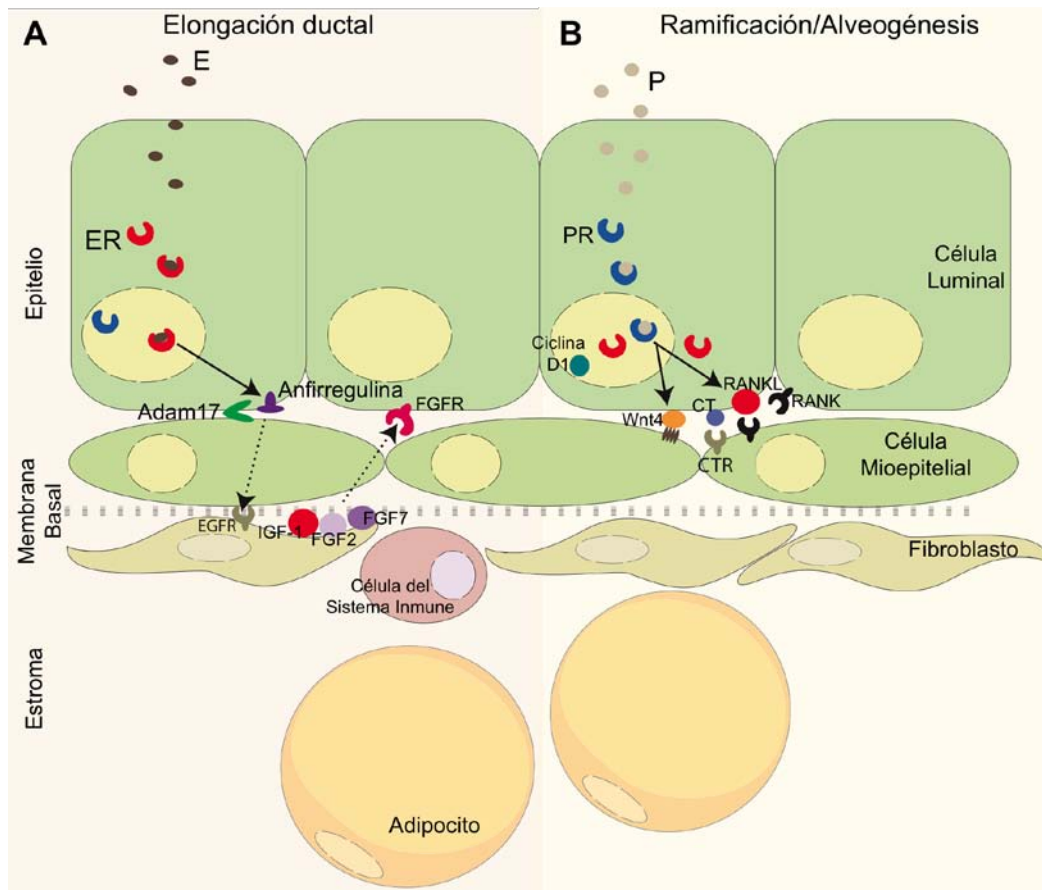
ramificación de los ductos, ya que trasplantes de células epiteliales mamarias (MaECs) de ratonas WT en estroma de hembras  $ER\alpha^{-/-}$  generan glándulas mamarias con un desarrollo normal, mientras que trasplantes de MaECs obtenidas de hembras  $ER\alpha^{-/-}$  en estroma libres de epitelio de ratonas WT prepúberes, no generan estructuras ductales durante la pubertad (Mallepell et al., 2006).



**Figura 10. Desarrollo de la glándula mamaria mediado por hormonas en hembras de ratón.** Las hormonas sexuales (rojo), sintetizadas durante las distintas etapas del desarrollo (verde), actúan a través de sus consiguientes receptores hormonales (azul) induciendo (flechas rojas) la formación de las estructuras mamarias correspondientes (negro). Adaptado de (Briskin and Duss, 2007).

Trasplantes con mezcla de MaECs de ratonas  $ER\alpha^{-/-}$  y MaECs de ratonas WT (que expresan receptores hormonales) son capaces de generar glándulas mamarias quiméricas, compuestas por células WT y células deficientes en la expresión del receptor (Briskin et al., 1998; Mallepell et al., 2006). Estos resultados determinan que el estrógeno actúa en células ductales que presentan ER, y éstas liberan señales paracrinas, las cuales permiten a otras células cercanas participar en el desarrollo de la glándula mamaria (Briskin and Duss, 2007).

El estrógeno liberado por los ovarios durante la pubertad actúa en las células epiteliales  $ER^+$  activando la vía de señalización que induce la expresión de ADAM17 y anfirregulina (AREG), ligando de la familia de EGF que se expresa en la superficie celular, y que tras ser procesado enzimáticamente por ADAM17, se secreta su forma activa (Hammes and Levin, 2007; Ignar-Trowbridge et al., 1992; Prossnitz et al., 2008) (Figura 11A). Cuando se realizan trasplantes con MaECs de ratones deficientes en ER, AREG o ADAM17, no son capaces de reconstituir la glándula mamaria. Sin embargo, al suministrar por vía exógena AREG, se observa un completo desarrollo de la mama, lo que determina que la anfirregulina es un mediador paracrino esencial del estrógeno (Sternlicht et al., 2005). En respuesta a la anfirregulina, las células del estroma que presentan el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) liberan factores de crecimiento (Wiesen et al., 1999); IGF-1 (Richert and Wood, 1999; Walden et al., 1998) y FGFs (Lu et al., 2008; Pedchenko and Imagawa, 2000) (Figura 11A), importantes para la proliferación celular necesaria durante la elongación ductal (Ciarloni et al., 2007; Luetke et al., 1999).



**Figura 11. Señalización paracrina de las hormonas sexuales.** (A) En respuesta al estrógeno liberado durante la pubertad, la células luminales ER<sup>+</sup> sensoras expresan en su superficie celular ADAM17 y anfirregulina (AREG). Se secreta la forma activa de AREG mediante el procesamiento enzimático llevado a cabo por ADAM17. En respuesta a la anfirregulina, las células del estroma liberan factores de crecimiento importantes para la proliferación celular necesaria durante la elongación (B) En respuesta a la progesterona liberada durante el ciclo estral o a comienzos de la gestación, las células luminales PR<sup>+</sup> sensoras sintetizan Ciclina D1, Wnt4 y RANKL, implicadas en la proliferación celular, en ramificación ductal y en lobuloalveogénesis respectivamente. Asimismo, las células luminales PR<sup>+</sup> sensoras también secretan Calcitonina. Adaptado de (Tanos et al., 2012).

## Progesterona

La progesterona liberada por los ovarios en la fase diestro del ciclo estral es la responsable de la aparición de ramificaciones terciarias y yemas alveolares en los ductos mamarios (Joshi et al., 2010), mientras que la progesterona sintetizada durante la primera fase de la gestación, además de la ramificación ductal, también está relacionada con la alveogénesis (Briskin et al., 1999; Gallego et al., 2001) (Figura 10). Al igual que los ERs, los receptores de progesterona (PRs) se expresan en las células del epitelio y del estroma de la glándula mamaria (Haslam, 1989; Haslam and Shyamala, 1981), pero sólo los PR que se expresan en el tejido epitelial están implicados en la señalización requerida para la ramificación ductal y la alveogénesis. El trasplante de MaECs provenientes de ratonas deficientes en PR (PR<sup>-/-</sup>) dentro del estroma de hembras WT prepúberes desprovistas del epitelio mamario, genera glándulas mamarias en las que se observa elongación ductal similar a la de hembras silvestres. No obstante, se detecta una deficiencia en la ramificación y en la formación de alvéolos durante la gestación (Briskin et al., 1998; Lydon et al., 1995). De manera similar al receptor de estrógeno, también se

han descrito dos isoformas del PR: PR-A y PR-B. Se ha demostrado que PR-B, y no PR-A, es necesaria para la ramificación ductal y la alveogénesis, aunque no suficiente para una morfogénesis completa de la mama (Mulac-Jericevic et al., 2003).

La acción de la progesterona sobre el epitelio mamario también está mediada por un mecanismo paracrino. En respuesta a la progesterona, las células luminales PR<sup>+</sup> de la mama, además de sintetizar Ciclina D1 requerida para su propia proliferación (Brisken et al., 1998), sintetizan Wnt4 y el ligando que activa el receptor activador de NF- $\kappa$ B (RANKL) (Brisken and Duss, 2007)(Figura 11B). Mientras que Wnt4 está implicado en la ramificación ductal (Brisken et al., 2000), la deficiencia en RANK o RANKL da lugar a mamas deficientes en lobuloalveogénesis durante la gestación (Fata et al., 2000), siendo Wnt4 y RANKL importantes mediadores paracrinos en la función de la progesterona en la glándula mamaria. Además, la progesterona estimula la secreción de calcitonina por las células luminales (Figura 11B), también considerada como mediador paracrino (Ismail et al., 2004).

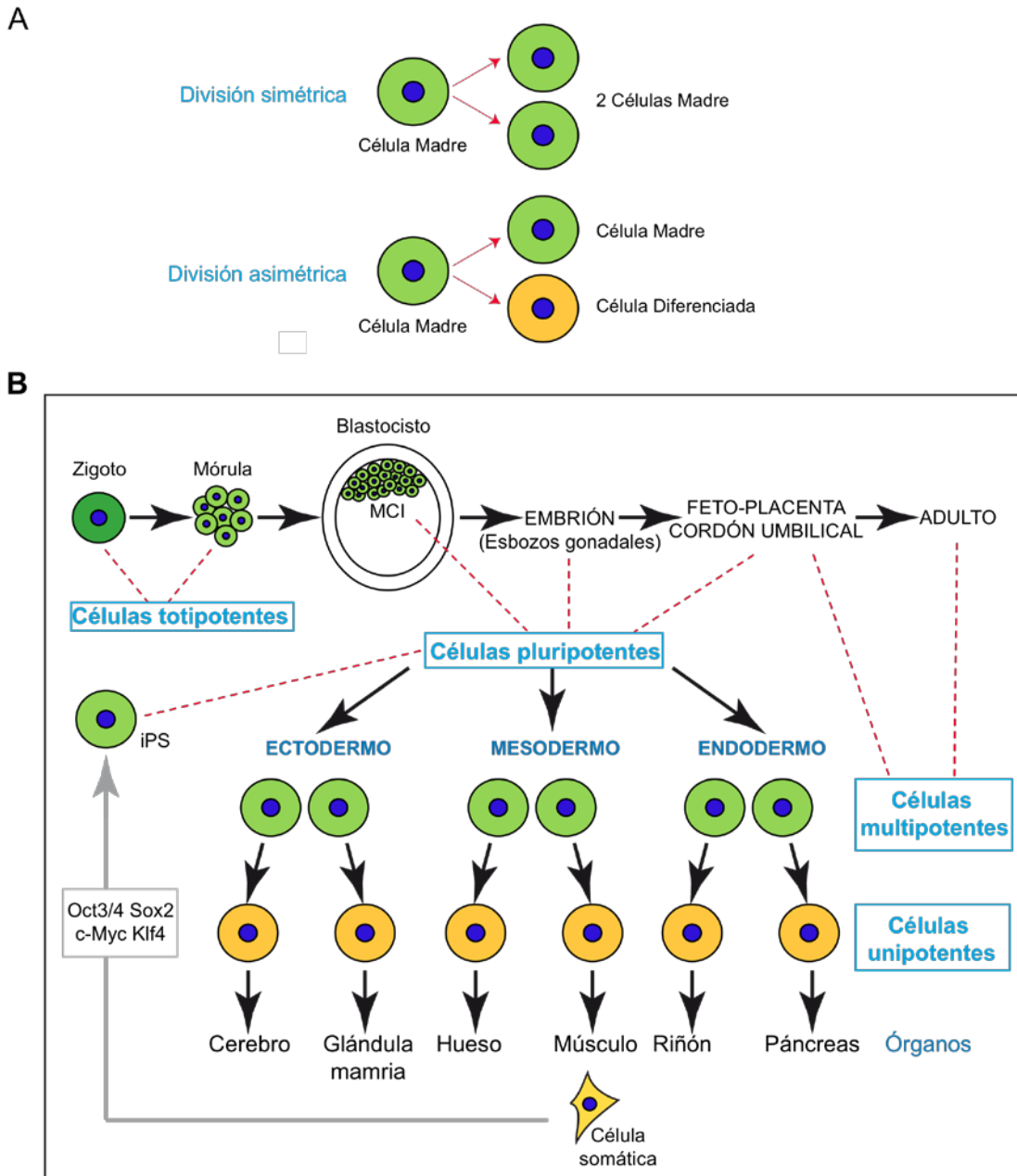
### **Prolactina**

Finalmente, la señalización desencadenada al unirse la prolactina a sus receptores específicos (PrlR) en las células epiteliales, es necesaria para la alveogénesis y la diferenciación de células ductales a células alveolares productoras de leche durante la etapa final de la gestación (Brisken et al., 2002; Brisken et al., 1999; Gallego et al., 2001) (Figura 10). Por el contrario, los PrlR del estroma no están implicados en esta función (Ormandy et al., 2003). Asimismo, la ausencia de expresión de (PrlR) en la glándula mamaria no afecta a la elongación ni a la ramificación ductal (Brisken et al., 1999). La prolactina, que es secretada por la pituitaria, también tiene mediadores paracrinos, al igual que el estrógeno y la progesterona, siendo en este caso IGF-2 y Ciclina D1 (Brisken et al., 2002; Hovey et al., 2003).

### **Células Madre**

Las células madre (SC) son células dotadas simultáneamente de la capacidad de autorrenovación (es decir, producir más células madre) y de originar células más comprometidas en la ruta de diferenciación (progenitores), que tras sucesivas divisiones celulares darán lugar a los tipos celulares diferenciados (Till and Mc, 1961).

Cada célula madre al dividirse simétricamente genera dos células nuevas con características idénticas a la original, asegurando una expansión exponencial de la población de células madre (Caussin and Hirth, 2007) (Figura 12A). Sin embargo, la división asimétrica de la célula madre genera una célula madre idéntica a la original y un progenitor comprometido en la diferenciación, manteniéndose así la población de células madre constante (Morrison and Kimble, 2006)(Figura 12A).



**Figura 12. Células Madre (SCs).** (A) La SC se puede dividir simétricamente, generando dos células idénticas entre sí e idénticas a la SC de origen, y se puede dividir asimétricamente, generando dos células diferentes; una SC similar a la SC de origen, y una célula más comprometida con la diferenciación. (B) Clasificación de las SCs. El cigoto y las células de la mórula (células embrionarias) son totipotentes, pudiendo generar un organismo completo. En el estadio de blastocisto, sólo las células de la MCI (células embrionarias) son pluripotentes, pudiendo generar células pertenecientes a cualquiera de las tres capas germinales. También son pluripotentes las células madre germinales que derivan de los esbozos gonadales del embrión (células embrionarias). Asimismo, algunas células del feto, del cordón umbilical, de la placenta, e incluso las iPS son pluripotentes. Tanto en el individuo adulto como en el feto, podemos encontrar células madre multipotentes (células madre adultas), capaces de generar exclusivamente los tipos celulares que conforman un tejido determinado.

Las células madre se pueden clasificar según su origen en: células madre embrionarias (ES) y células madre adultas. Además, también se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en:

**Células totipotentes:** Células madre capaces de generar un organismo completo. El único ejemplo de célula madre totipotente es el cigoto, sin embargo, el conjunto de células que componen la mórula temprana también tiene esta capacidad (Mitalipov and Wolf, 2009) (Figura 12B).

**Células pluripotentes:** Células madre capaces de dar lugar a las tres capas germinales que forman un embrión (ectodermo, mesodermo, endodermo) (Figura 12B), aunque no son capaces de generar las estructuras extraembrionarias (trofoblasto y placenta) (Thomson et al., 1998). Las células que se aíslan de la masa celular interna (ICM) del blastocisto (Hanna et al., 2010; Mitalipov and Wolf, 2009), y las células germinales que derivan de los esbozos gonadales del embrión (Donovan, 1998) son células madre pluripotentes (Figura 12B). Asimismo, se ha demostrado que una célula somática puede ser reprogramada por la sobreexpresión transitoria de una combinación de genes (Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4), los cuales son capaces de des-diferenciar y convertir a la célula somática en una célula madre pluripotente, denominada célula madre pluripotente inducida (iPS) (Takahashi and Yamanaka, 2006) (Figura 12B). También podemos encontrar células madre pluripotentes en el feto, cordón umbilical y placenta (Kogler et al., 2004) (Figura 12B).

**Células multipotentes:** Células madre capaces de generar exclusivamente los tipos celulares que conforman un tejido determinado (Wiseman and Werb, 2002), también denominadas células madre adultas (Figura 12B).

**Células madre unipotentes:** Células que tienen la capacidad de diferenciarse en sólo un tipo celular, también denominadas células progenitoras (Hsu and Fuchs, 2012) (Figura 12B).

### **Células Madre de la glándula mamaria**

El hecho de que las células de un organismo sean más jóvenes que el propio organismo (Spalding et al., 2005) permite hipotetizar que todos los tejidos que componen un individuo deben poseer células madre adultas encargadas de la homeostasis del propio tejido. Se han descrito células madre adultas en varios sistemas, como el hematopoyético (Spangrude et al., 1988) y el nervioso (Reynolds and Rietze, 2005), y en algunos órganos como intestino (Marshman et al., 2002), páncreas (Bonner-Weir and Sharma, 2002), hígado (Strain and Crosby, 2000), pulmón (Kotton and Fine, 2008) y epidermis (Watt et al., 2006).

La glándula mamaria se desarrolla principalmente después del nacimiento, observándose proliferación y diferenciación celular durante la pubertad, los sucesivos ciclos estrales, la gestación y la lactancia, aunque durante la involución se observa elevados niveles de apoptosis celular. Además, las glándulas mamarias involucionadas son capaces de desarrollarse de nuevo, mediante proliferación y

diferenciación celular, a mamas completamente diferenciadas (mamas lactantes) con cada gestación (Richert et al., 2000; Russo and Russo, 2004). Estos aspectos sólo se sostendrían gracias a la existencia de una población celular capaz de mantenerse y diferenciarse a los diferentes tipos celulares que componen la glándula mamaria, las células madre de la glándula mamaria (MaSCs).

La primera evidencia de la existencia de células madre en la glándula mamaria de ratón fue descrita en 1959 por DeOme y sus colaboradores. Mediante trasplantes de fragmentos de tejido, provenientes de diferentes regiones de una mama adulta, en estromas libres de epitelio, fueron capaces de generar glándulas mamarias completas (DeOme et al., 1959). Posteriormente, también se demostró la posibilidad de regenerar glándulas mamarias a partir de trasplantes en los que se inyectan MaECs en suspensión en estromas libres de epitelio (Daniel et al., 1968; Hoshino and Gardner, 1967; Smith, 1996). Las MaSCs se localizan a lo largo de los ductos (DeOme et al., 1959), aunque se sabe que esta población está aumentada en la zona de las “cap cells” en las TEBs (Kenney et al., 2001). Además, están presentes durante toda la vida del organismo (Smith and Medina, 1988), destacando que ni la historia reproductiva, ni el estado de desarrollo de la glándula mamaria, afecta a su longevidad (Daniel and Young, 1971; Young et al., 1971). La capacidad de repoblación de las MaSCs se determinó mediante trasplantes seriados de fragmentos de mamas reconstituidas, aunque después de siete generaciones, las MaSCs entran en un estado denominado senescencia regenerativa (Daniel et al., 1968). Sin embargo, cuando se usan células pre-neoplásicas o neoplásicas en los trasplantes, la capacidad de repoblación es ilimitada (Medina, 2000; Smith et al., 1978). Además, el análisis de las mamas regeneradas a partir de células que habían sido marcadas genéticamente con MMTV demostró que una sola célula madre era capaz de regenerar una glándula mamaria funcional (Kordon and Smith, 1998).

En ratón, las MaSCs han sido identificadas en preparaciones frescas de células disgregadas de la mama, mediante la eliminación de las células hematopoyéticas y endoteliales, y la utilización de marcadores de superficie celulares: CD24 (HSA), CD29 ( $\beta$ 1-integrina) y CD49f ( $\alpha$ 6-integrina) (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006). Utilizando CD24 como marcador único, se ha determinado que la población CD24<sup>intermedia</sup> presenta una mayor capacidad reconstitutiva (Sleeman et al., 2006). Sin embargo, utilizando CD24 en combinación con CD29 o CD49f, se ha demostrado que la población celular que expresa CD24 y altos niveles de CD29 o CD49f, denominada “doble-positiva”, está enriquecida en MaSCs. Asimismo, la población doble-positiva (CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> o CD24<sup>+</sup>CD49f<sup>alta</sup>) cumple las características principales que definen a las células madre adultas; diferenciación y autorrenovación. La capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares que componen el tejido se demuestra mediante la reconstitución completa de la glándula mamaria en la que se observan células ductales, mioepiteliales y alveolares durante la gestación de las ratonas, mientras que la capacidad de autorrenovación se demuestra mediante reconstituciones secundarias a partir de fragmentos de epitelio mamario formado a partir de una sola célula, estimándose, al menos, diez divisiones simétricas de las MaSCs (Stingl et al., 2006).

En 2006, Shackleton y sus colaboradores fueron capaces de reconstituir *in vivo* una glándula mamaria funcional a partir de trasplantar una única célula de la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> en estromas mamarios libres de epitelio de hembras receptoras prepúberes. Sin embargo, se hace necesario un método de purificación que optimice la obtención de MaSCs, ya que la población de MaSCs en la fracción doble-positiva está estimada en 1 de 17 células (Shackleton et al., 2006).

La población doble-positiva tiene una expresión muy baja de los niveles del antígeno Sca-1 (Asselin-Labat et al., 2007; Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006; Visvader, 2011), no expresa el receptor de la tirosinquinasa ErbB2/HER2/Neu (Lim et al., 2009), y los receptores hormonales ER $\alpha$  y PR son indetectables mediante RT-qPCR (Asselin-Labat et al., 2006; Sleeman et al., 2007). Además, la población doble-positiva tiene una posición basal dentro del epitelio mamario, al igual que las células mioepiteliales, y en ella predomina la expresión de marcadores de células mioepiteliales, CK14 y  $\alpha$ SMA. Sin embargo, dentro de la población total de células epiteliales mamarias con posición basal (población doble-positiva y células mioepiteliales), existe una pequeña fracción de células negativas o con baja expresión de CK14 y  $\alpha$ SMA, pudiendo corresponder con las MaSCs (Asselin-Labat et al., 2006; Shackleton et al., 2006).

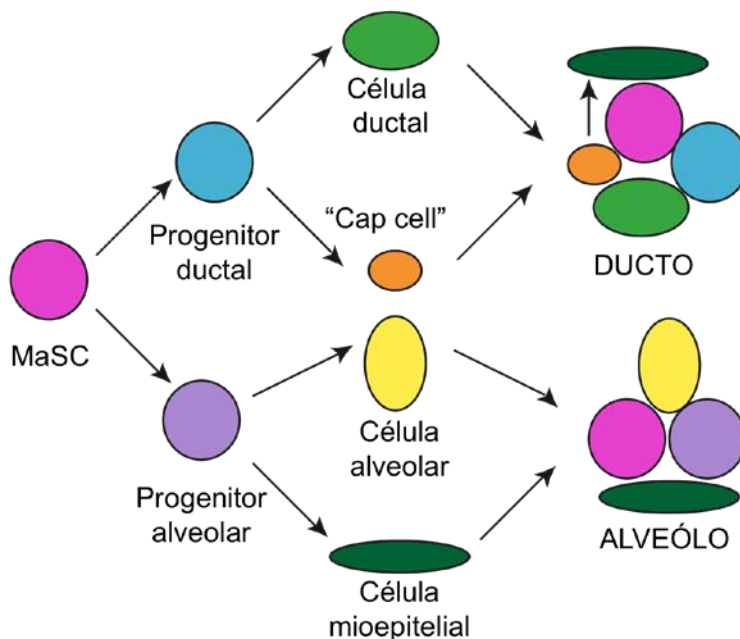
Finalmente, al comparar las MaSCs con las células madre hematopoyéticas se pueden observar algunas diferencias. A pesar de que la mayoría de las células madre hematopoyéticas están dentro de la población SP, (población celular que presentan un aumento de proteínas transportadoras de membrana con habilidad de excluir tinciones como Hoechst 33342 o Rodamina 123), la población doble-positiva no se encuentra dentro esta población (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006). Algo similar ocurre con el estado de actividad; mientras que la mayoría de las células madre hematopoyéticas permanecen quiescentes (G0), la mayoría de las MaSCs están en ciclo (G1, S, G2/M) (Stingl et al., 2006). Además, la fracción de MaSCs que mantiene la tinción con BrdU (Shackleton et al., 2006), denominadas LRCs, no permanecen quiescentes, ya que se ha demostrado que las SCs se dividen asimétricamente manteniendo una cadena de DNA, y de esta forma mantienen la tinción (Smith, 2005). Estos datos son similares a los obtenidos al analizar las células madre adultas de intestino y de folículo piloso (Li and Clevers, 2010), e indican que en la glándula mamaria, al igual que en el intestino y en el folículo piloso, coexisten células madre adultas quiescentes y activas.

### Jerarquía del epitelio mamario

Mediante el análisis de mamas reconstituidas a partir de distintas poblaciones de MaECs se determinó la existencia de una jerarquía celular dentro de la glándula mamaria. Se identificaron tres tipos de progenitores epiteliales dentro de la glándula mamaria, caracterizados por su habilidad de producir lóbulos secretores, ductos mamarios o una glándula mamaria completa (Smith, 1996).

Se han postulado dos modelos de jerarquía de las MaSCs:

En uno de los modelos, las células madre serían las encargadas de producir progenitores bipotenciales que se diferenciarían a los linajes ductal y alveolar. Así, el progenitor ductal se diferenciaría dando lugar a células ductales y a “cap cells” (precursores de células mioepiteliales), mientras que el progenitor alveolar se diferenciaría dando lugar a células alveolares y a células mioepiteliales (Kordon and Smith, 1998; Smith and Boulanger, 2002) (Figura 13).

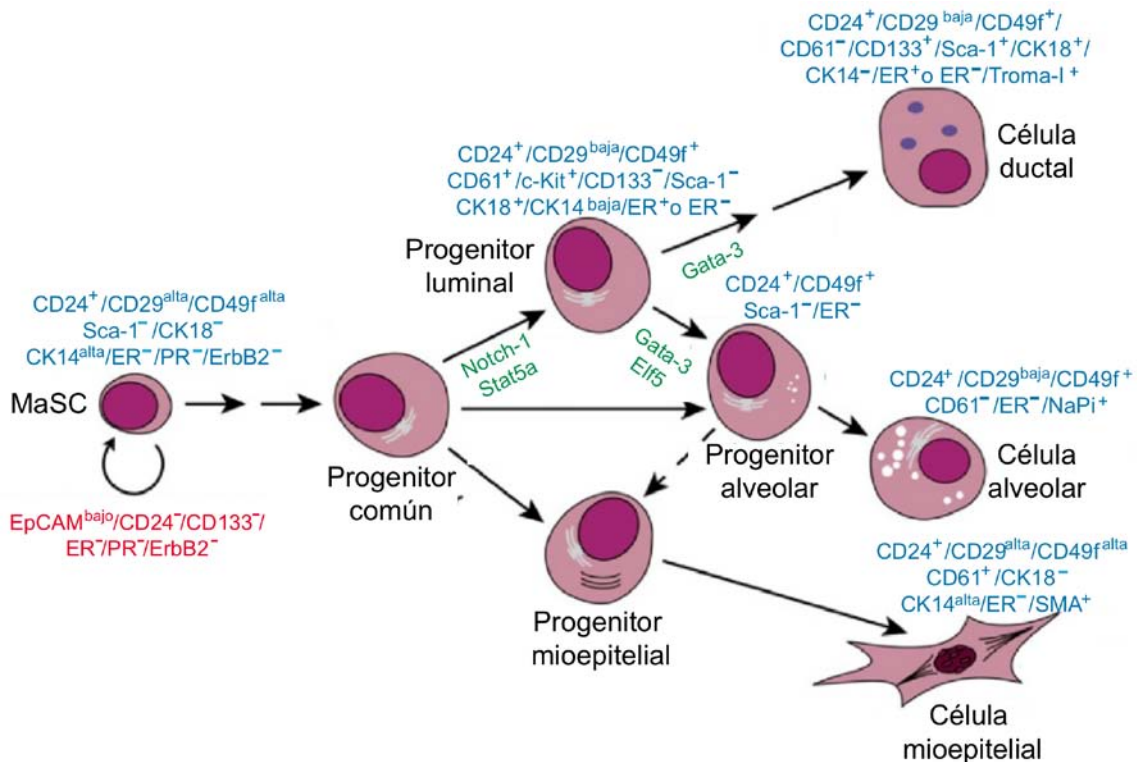


**Figura 13. Modelo de jerarquía celular célula madre/progenitor del epitelio mamario de ratón.** La célula madre daría lugar a cada uno de los dos progenitores multipotentes, y cada progenitor sería responsable de la formación de los ductos durante la pubertad o de la formación de las estructuras alveolares durante la gestación. Adaptado de (Visvader and Smith, 2011)

En el otro modelo, análogo al modelo de jerarquía hematopoyética, los linajes luminal y mioepitelial permanecerían separados, a pesar de proceder de un progenitor común (Smith, 1996; Stingl et al., 1998) (Figura 14).

En la glándula mamaria de ratón, las células madre definidas por la población  $CD24^+CD29^{alta}CD49f^{alta}Sca-1-ER-EP-ErbB2^-$  (Asselin-Labat et al., 2007; Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006; Visvader, 2011), darían lugar a un progenitor común bipotencial, que a su vez, generaría dos progenitores más comprometidos en la diferenciación; el progenitor luminal y el progenitor mioepitelial (Figura 14). El progenitor luminal, con fenotipo  $CD24^+CD29^{bajo}CD49f^+ CD61^+c-Kit^+ER^+$  o  $ER^-$ , se caracteriza por la ausencia de expresión de los marcadores CD133 (prominina-1) y Sca-1, y por no tener capacidad regenerativa *in vivo* (Asselin-Labat et al., 2007; Sleeman et al., 2006). El progenitor luminal estaría restringido a la diferenciación luminal, dando lugar a células lumbales ductales o lumbales alveolares (Figura 14), dependiendo del contexto hormonal (Asselin-Labat et al., 2007). Mientras que Notch-1 (Bouras et al., 2008), Stat5A (Yamaji et al., 2009) y Gata-3 (Asselin-Labat et al., 2007) son claves en la regulación de la diferenciación ductal, Elf5 (Oakes et al., 2008; Zhou et al., 2005) regula la diferenciación hacia el linaje alveolar. La mayor proporción de células  $CD61^+$  se detecta durante la pubertad, coincidiendo con la elongación ductal. Sin embargo, la diferenciación del progenitor luminal a las células ductales va acompañada por un descenso de CD61 y un aumento en la expresión de CD133 y Sca-1. A su vez, la mayoría de las células ductales, con

fenotipo  $CD24^+CD29^{baja}CD49f^+ CD61-Sca-1^+CD133^+ER^+$  o  $ER^-$ , expresan ER, mientras que sólo un 10% de los progenitores luminales lo expresan (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006; Visvader, 2009). Posteriormente, al final de la gestación, se observa descenso en los niveles del progenitor luminal, coincidiendo con la diferenciación del progenitor a células alveolares. Probablemente el progenitor luminal daría lugar a una población de progenitores alveolares que se anticiparía a expandirse al comienzo de la gestación (Figura 14). La población candidata a contener el progenitor alveolar podría tener el fenotipo  $CD24^+CD49f^+Sca-1^-ER^-$  (Asselin-Labat et al., 2007). Esta población expresa proteínas de la leche y podría estar incluida dentro de la población de células alveolares con fenotipo  $CD24^+CD29^{baja}CD49f^+CD61-ER^-$  (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006; Visvader, 2009). Por otro lado, el progenitor mioepitelial, que aún no se ha aislado, daría lugar a las células mioepiteliales (Figura 14), definidas por el fenotipo  $CD24^+CD29^{alta}CD49f^{alta}CD61^+$  (Stingl et al., 2001).

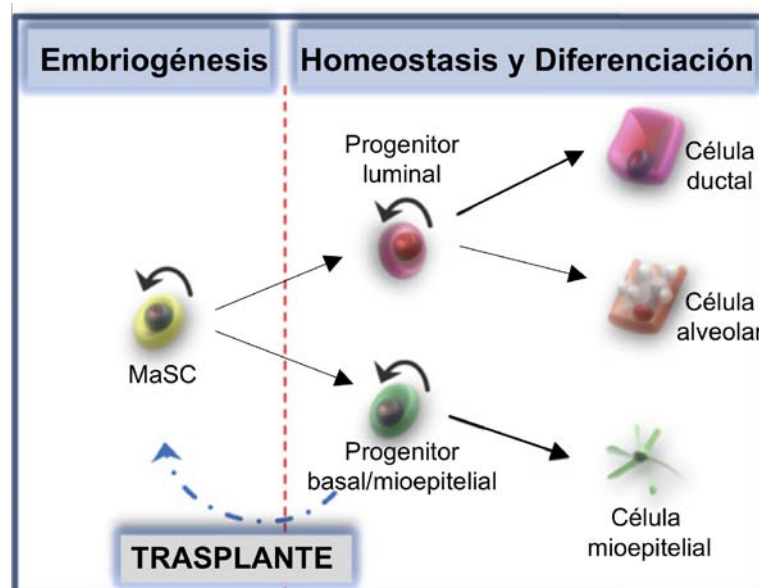


**Figura 14. Modelo de jerarquía dentro del epitelio mamario de ratón.** La célula madre daría lugar a un progenitor común bipotencial, el cual, a su vez, daría lugar a dos progenitores más comprometidos en la diferenciación; el progenitor luminal y el progenitor mioepitelial. El progenitor luminal estaría restringido a la diferenciación luminal, dando lugar a células ductales o alveolares, y durante la gestación, daría lugar a una población de progenitores alveolares con capacidad bipotencial. Por otro lado, el progenitor mioepitelial daría lugar a las células mioepiteliales. Los marcadores de superficie utilizados para el aislamiento de las poblaciones epiteliales de ratón se muestran en azul y los que determinan las MaSCs de humanos en rojo. Los reguladores transcripcionales que controlan diferentes aspectos del desarrollo se muestran en verde. Adaptado de (Visvader, 2009).

En humanos, la población con fenotipo  $EpCAM^{bajo}CD49f^{alto}$  de las MaECs está enriquecida en MaSCs (Eirew et al., 2008) (Figura 14). Esta población es capaz de

generar estructuras ductales y alveolares (Eirew et al., 2010) cuando se trasplanta en las cápsulas suprarrenales de una ratona huésped (Outzen and Custer, 1975; Russo and Russo, 2004). Además, al igual que en los ratones, en la glándula mamaria humana existe una organización jerárquica, en la que se postula la presencia de un progenitor bipotencial que daría lugar a dos progenitores más comprometidos: luminal y mioepitelial (Gudjonsson et al., 2002; Raouf et al., 2012; Stingl et al., 1998; Stingl et al., 2001) (Figura 14).

En contraposición a estos dos modelos de jerarquía en la glándula mamaria del ratón, Cédric Blanpain y su grupo, mediante el análisis de los resultados obtenidos en estudios de identificación de linaje celular (metodología aplicada para la identificación de toda la progenie derivada de una única célula), proponen que el mantenimiento de la glándula mamaria en el adulto no se debería a la existencia de una célula madre multipotente, sino que se mantendría por dos poblaciones separadas de progenitores unipotentes. Sin embargo, en condiciones de trasplantes, donde tiene lugar una regeneración completa de la glándula mamaria, las células basales/mioepiteliales tendrían la propiedad de convertirse en bipotenciales (Van Keymeulen et al., 2011) (Figura 15).

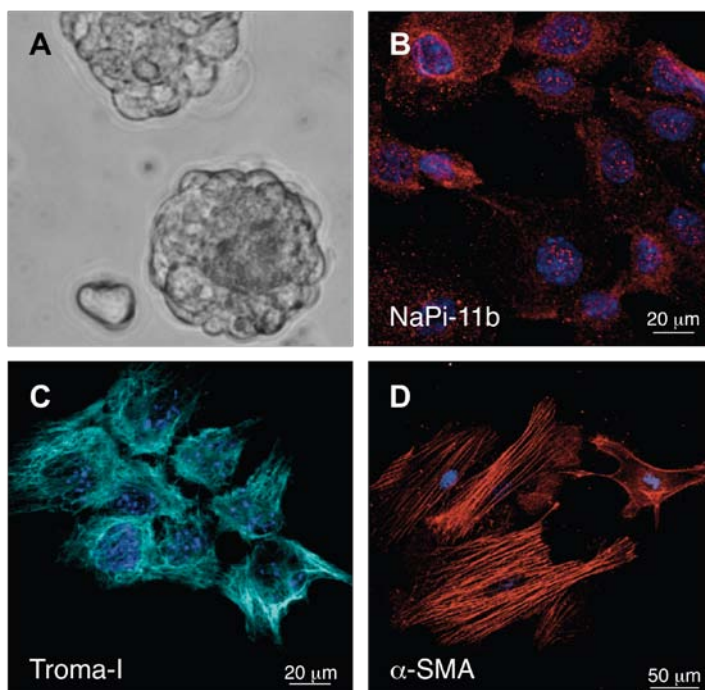


**Figura 15. Remodelación de la jerarquía dentro del epitelio mamario de ratón.** La homeostasis de la glándula se mantendría por dos poblaciones separadas de progenitores unipotentes. Sin embargo, las células basales/mioepiteliales tendrían la propiedad de convertirse en bipotenciales en condiciones de trasplantes, donde tiene lugar una regeneración completa de la glándula mamaria. Adaptado de (Keller et al., 2011).

## Cultivo *in vitro* de las MaECs

Se ha demostrado que en condiciones donde la adherencia al plástico está inhibida y se utiliza un medio libre de suero suplementado con factores de crecimiento epidérmico (EGF) y fibroblástico (bFGF), sólo una pequeña población de las MaECs es capaz de sobrevivir *in vitro* formando estructuras tridimensionales flotantes con morfología esférica, denominadas mamosferas (Dontu et al., 2003) (Figura 16A).

Cuando las MaECs se siembran a densidades muy bajas, o incluso cuando se siembra una célula por pocillo, donde la agregación celular puede descartarse totalmente, las mamosferas que se generan tienen un origen clonal (Diaz-Guerra et al., 2012; Dontu et al., 2003), y en ratón, tan sólo la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> es capaz de generarlas (Diaz-Guerra et al., 2012). Estas estructuras esféricas están enriquecidas en células indiferenciadas (células madre y progenitoras), que en condiciones apropiadas de cultivo, son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia los tres tipos celulares que conforman el epitelio mamario (células ductales, mioepiteliales y alveolares) (Figura 16B-16D). De esta forma se demuestra la capacidad de diferenciación (multipotencia) de las MaSCs *in vitro* (Dontu et al., 2003). Sin embargo, no hay divisiones simétricas *in vitro* de las MaSCs procedentes de ratones WT (Cicalese et al., 2009; Diaz-Guerra et al., 2012).



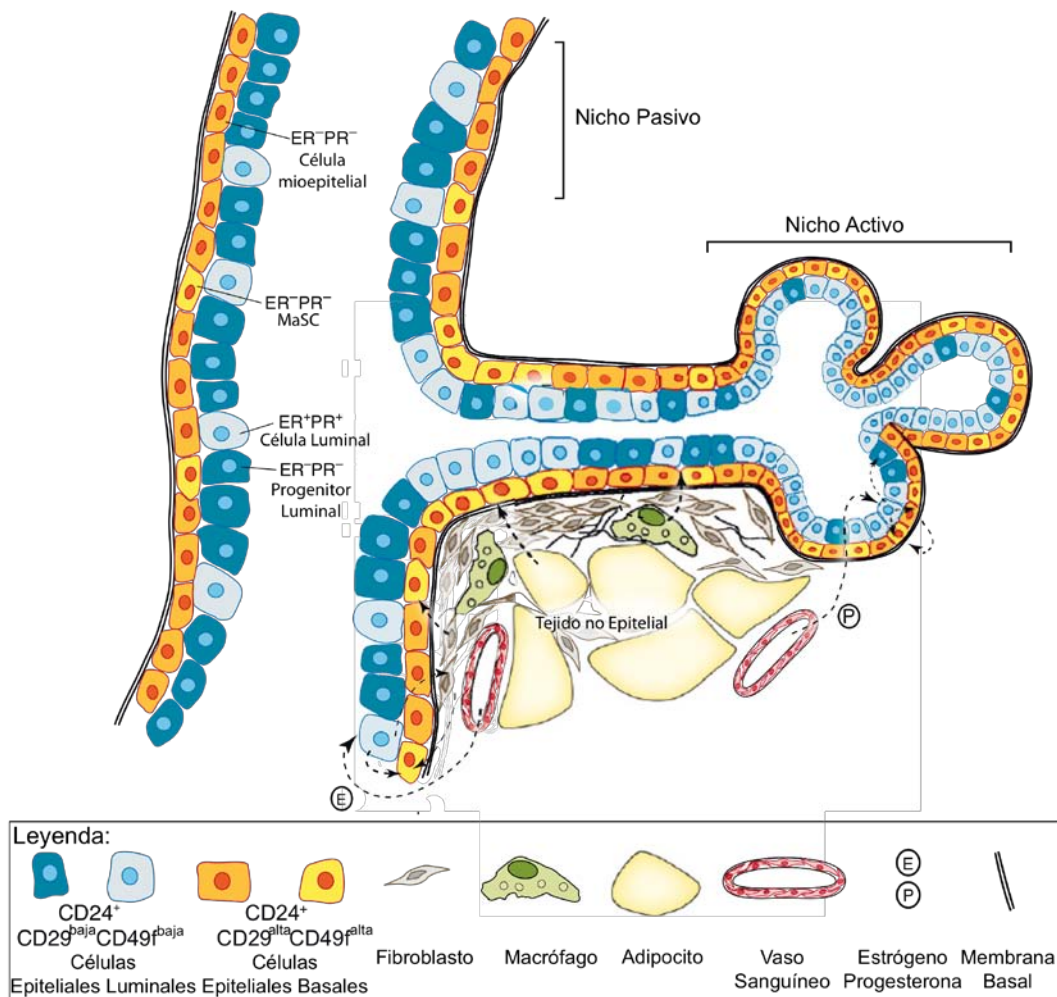
**Figura 16. Cultivo y diferenciación de mamosferas.** (A) Microscopía de campo claro donde se observan las mamosferas. (B-D) Diferenciación de las células que componen la mamosfera. Las células de la mamosfera se diferencian, en condiciones de cultivo apropiadas, hacia los tres tipos celulares que forman el epitelio de la glándula mamaria: (B) células luminales, (C) células mioepiteliales, y (D) células alveolares. Adaptado de (Diaz-Guerra et al., 2012).

## Nicho

El concepto de nicho se definió por primera vez en 1978 en células hematopoyéticas (Schofield, 1978), refiriéndose al microambiente que mantiene a las células madre en estado indiferenciado, pero que también facilita su expansión y diferenciación cuando son necesarias para la reparación o regeneración (Li and Clevers, 2010). El nicho de las MaSCs comprende toda la glándula mamaria, ya que las propias MaSCs se localizan a lo largo de los ductos que conforman la estructura epitelial mamaria (Daniel et al., 1968; DeOme et al., 1959). Sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* postulan la idea de que las células madre activas residan en puntos de crecimiento específicos, en nichos estimulados durante estados dinámicos del desarrollo de la glándula mamaria, mientras que células madre quiescentes residirían en nichos más pasivos (Joshi et al., 2012) (Figura 17).

El nicho de las MaSCs está compuesto por elementos celulares (MaECs y células que componen el estroma) (Figura 17) y por un componente estructural, la matriz extracelular (MEC), que está compuesta por proteínas insolubles secretadas por las células epiteliales y del estroma, y sirve como reservorio de factores de crecimiento importantes para la función de las células madre (Joshi et al., 2012). En la glándula mamaria, las interacciones de las MaSCs con la MEC pueden controlar la proliferación celular, la supervivencia, la migración y la diferenciación, para regular procesos como; la ramificación y polarización de los ductos, el desarrollo de los alvéolos, y la involución después de la gestación (Muschler and Streuli, 2010). Además, las MaECs basales enriquecidas en MaSCs, se localizan próximas a la matriz extracelular, y tienen una elevada expresión de las integrinas  $\beta 1$  (CD29) y  $\alpha 6$  (CD49f) (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006), conocidas como receptores de proteínas de la matriz. Asimismo, la delección de la integrina (en células basales, ocasiona la pérdida del potencial regenerativo de las MaSCs (Taddei, 2008 #60), lo que indica que la comunicación MaSC-MEC en el nicho es importante para el mantenimiento funcional de las MaSCs (Joshi et al., 2012).

También son importantes constituyentes del nicho las células epiteliales luminales ER<sup>+</sup> y PR<sup>+</sup>, cuya función es detectar los niveles de hormonas circulantes en el sistema sanguíneo y generar señales paracrinas importantes para la función de las MaSCs (Briskin and O'Malley, 2010). A su vez, las células del estroma y las células mioepiteliales son esenciales en la señalización paracrina del estrógeno y la progesterona, respectivamente, secretando señales que estimulan directa o indirectamente a las MaSCs (Tanos et al., 2012) (Figura 17). Aunque las MaSCs expresan EGFR, RANK y LRP5 (co-receptor de Wnt4), se desconoce si AREG, RANKL y Wnt4 actúan directamente sobre ellas (Joshi et al., 2010; Wiesen et al., 1999). Asimismo, en las MaSCs activadas se observan altos niveles del activador del ciclo celular Ciclina D2 (Joshi et al., 2010), cuya función es la de promover la activación del ciclo celular. Además, se ha sugerido que señales provenientes de células estromales serían las encargadas de activar la división celular de las MaSCs cuando éstas son trasplantadas aisladas en estromas libres de epitelio mamario, y que los macrófagos desempeñan un papel importante dentro del nicho de las MaSCs (Gyorki et al., 2009).



**Figura 17. Modelo del nicho de las MaSCs durante el desarrollo postnatal.** Las MaSCs residen entre elementos celulares y acelulares que componen el nicho, y éste puede modular el estado y función de las MaSCs. Se postula la idea de que las células madre activas residan en puntos de crecimiento específicos, en nichos estimulados durante estados dinámicos del desarrollo de la glándula mamaria, mientras que células madre quiescentes residirían en nichos más pasivos. Los componentes celulares del nicho incluyen a las células epiteliales y no epiteliales (fibroblastos, adipocitos, macrófagos y células endoteliales), ambas importantes en la señalización mediada por hormonas. Además, la matriz extracelular (MEC) también es un importante componente acelular del nicho, ya que sirve como reservorio de factores de crecimiento importantes para la función de las MaSCs. Adaptado de (Joshi et al., 2012).

Otras células que forman parte del nicho son las células inducidas por paridad (PI-MECs), células diferenciadas durante la alveogénesis que sobreviven al proceso de involución (Wagner et al., 2002), y que están presentes en glándulas mamarias de hembras nulíparas y hembras que han tenido crías (Smith and Medina, 2008). Se piensa que son progenitores alveolares capaces de actuar en continuos embarazos, sin embargo, una fracción de las PI-MECs expresa CD24<sup>+</sup>CD49<sup>alta</sup>, y sólo esta fracción dentro de las PI-MECs es capaz de regenerar una glándula mamaria completa (Matulka et al., 2007). Además, una mezcla de células procedentes de los tubos seminíferos de testículos maduros y MaECs son capaces de regenerar una glándula mamaria, que después de sufrir una involución, presenta PI-MECs que derivan de ambas células (Boulanger et al., 2007), y lo mismo ocurre cuando se trasplanta una mezcla de células madre del sistema neural (neurosferas) y MaECs (Booth et al., 2008), demostrándose de esta forma que las MaSCs y su nicho son

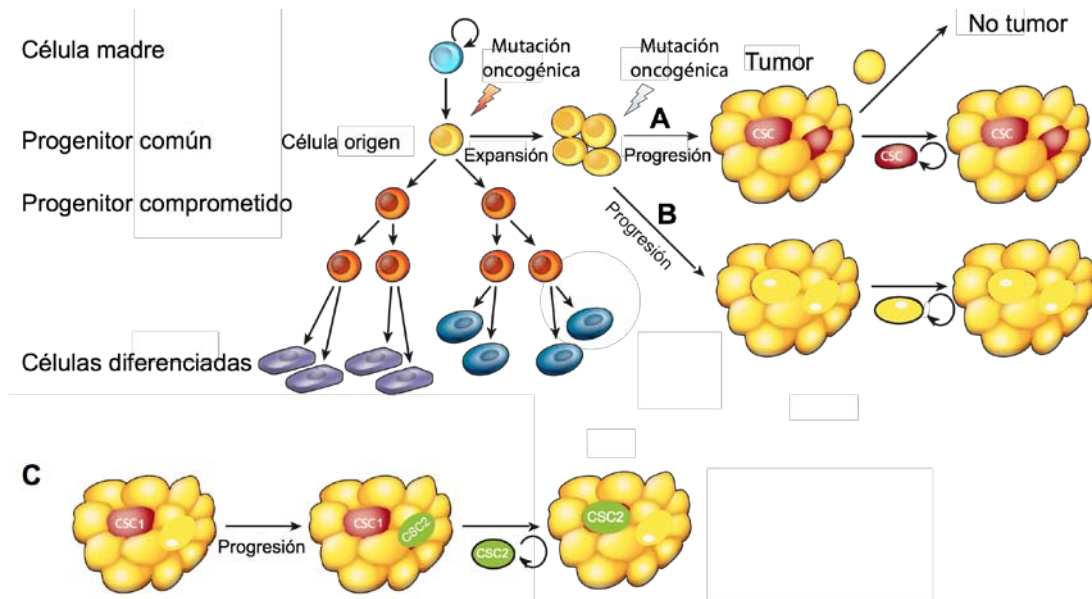
capaces de inducir la transdiferenciación de células madre de otros tejidos a células diferenciadas del epitelio mamario.

### **Células Madre del cáncer**

Los diferentes tumores que se originan en el organismo son generalmente caracterizados clínicamente mediante análisis histológicos y expresión de marcadores específicos. Además de existir heterogeneidad entre los distintos tipos de tumores, también existe heterogeneidad intertumoral, habiendo dentro de un tipo tumoral distintos subtipos. Asimismo, las células que componen el tumor presentan heterogeneidad en expresión de marcadores celulares, en morfología celular, en capacidad proliferativa, en modificaciones genéticas, y en respuesta terapéutica (Heppner and Miller, 1983). Se han propuesto dos modelos para explicar la heterogeneidad y la diferente tumorigenicidad (adquisición de la capacidad de formar tumores) de las células dentro de un tumor: el modelo de la evolución clonal y el modelo de la célula madre del cáncer (CSC).

El modelo de evolución clonal presupone que todas las células cancerosas son tumorigénicas. En este caso, la heterogeneidad característica de los tumores se explica como una consecuencia de la variabilidad en el patrón de expresión genética entre cada una de las células que forman el tumor, así como de la capacidad de éstas para promover la formación de vasos sanguíneos y crear un microambiente favorable para su supervivencia (Campbell and Polyak, 2007; Nowell, 1976) (Figura 18B).

El modelo de la CSC relaciona la actividad proliferativa y metastática de los tumores con las existencia de una subpoblación de células con propiedades semejantes a las de las células madre, las células madre del cáncer (CSCs). Se denominan CSCs a las células tumorales con características de células madre; capaces de autorrenovarse mediante divisiones simétricas, y capaces de dividirse asimétricamente produciendo una célula madre y una célula progenitora, encargada de producir las células con distinto fenotipo que componen el tumor (Bonnet and Dick, 1997; Clarke et al., 2006; Reya et al., 2001). Este modelo implica la organización jerárquica de los tumores, mantenida por la CSC (Bonnet and Dick, 1997) (Figura 18A).



**Figura 18. Modelos representativos de la heterogeneidad y la diferente tumorigenicidad (adquisición de la capacidad de formar tumores) de las células dentro de un tumor.** (A) Modelo de la Célula Madre del Cáncer (CSC). Se denominan CSCs a las células tumorales con características de células madre; capaces de autorrenovarse mediante divisiones simétricas, y capaces de dividirse asimétricamente produciendo una célula madre y una célula progenitora, encargada de producir las células con distinto fenotipo que componen el tumor. (B) Modelo de Evolución Clonal. Todas las células que componen el tumor son tumorigénicas, y la heterogeneidad entre éstas se explica como una consecuencia de la variabilidad en el patrón de expresión genética en cada una de ellas. (C) Modelo que combina ambas teorías. Al principio, el crecimiento del tumor sería llevado a cabo por una CSC1, y con la progresión del tumor, otra distinta CSC2 surgiría debido a la evolución clonal de la CSC1. La CSC2 sería más agresiva, se convertiría en dominante y conduciría a la formación del tumor. Adaptado de (Visvader, 2011).

En 1994 fue identificada la primera CSC humana en muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda; la célula madre de la leucemia (Lapidot et al., 1994). Sólo un pequeño porcentaje de células de la leucemia, con el mismo fenotipo que las células madre hematopoyéticas,  $CD34^+CD38^-$ , eran las responsables de la transmisión de la enfermedad cuando se trasplantaron en ratones inmunodeficientes (Bonnet and Dick, 1997). Sin embargo, las primeras evidencias que confirmaban la existencia de CSCs en tumores humanos sólidos no se dieron hasta 2003, cuando se demostró que la población celular procedente de un tumor de mama humano caracterizada por los marcadores de superficie: Linaje<sup>-</sup> ( $CD19^-CD20^-CD23^-CD5^-$ ) y  $ESA^+CD44^+CD24^{-/baja}$  era altamente tumorigénica. Apenas 200 células de esta población eran capaces de generar tumores en xenotransplantes llevados a cabo en animales inmunodeficientes, mientras que para generar tumores a partir de la población total del tumor, se necesitaban al menos 50.000 células. Los tumores que se generaban eran heterogéneos, al igual que los tumores iniciales, y contenían células tumorigénicas y no tumorigénicas con diversidad en la expresión de los marcadores de superficie ESA, CD44 y CD24 (Al-Hajj et al., 2003). Posteriormente, se demostró que el marcador ALDH podía dividir la población Linaje<sup>-</sup> $ESA^+CD44^+CD24^{-/baja}$  del tumor en fracciones con distinto grado de tumorigenicidad, siendo la población con el fenotipo ALDH<sup>-</sup>Linaje<sup>-</sup> $ESA^+CD44^+CD24^{-/baja}$  la población enriquecida en CSCs (Croker et al., 2009). Además, se demostró que las células de la población  $CD44^+CD24^{-/baja}$  del tumor eran capaces de formar esferas (tumorsferas) en condiciones de cultivo de

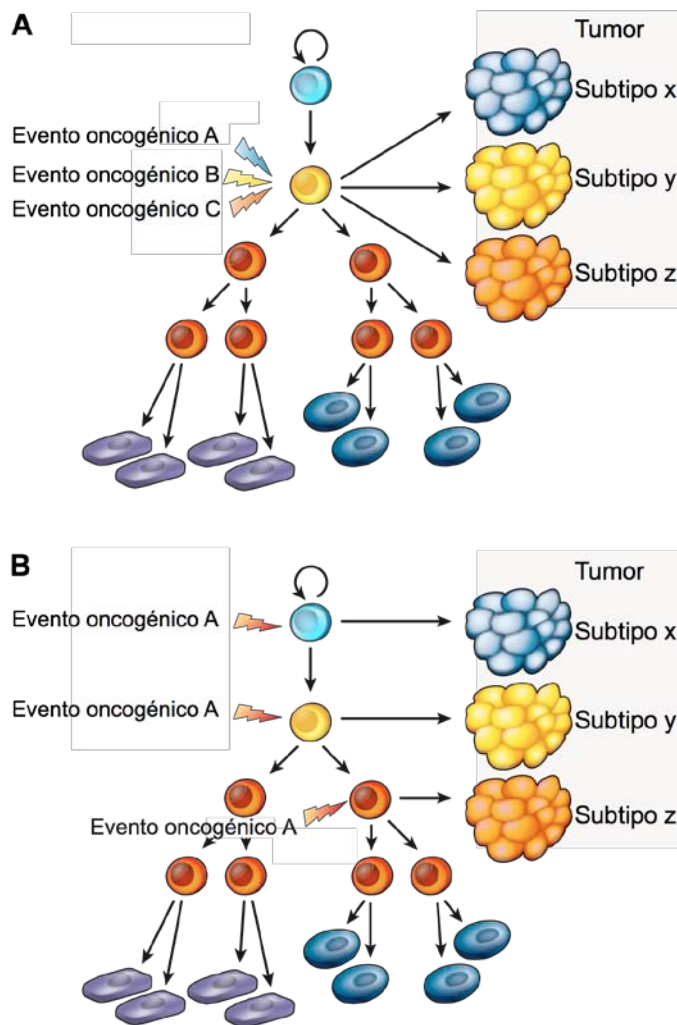
mamosferas, enriquecidas en células madre de cáncer de glándula mamaria (MaCSCs) (Charafe-Jauffret et al., 2009; Ginestier et al., 2007; Ponti et al., 2005). Las células que forman la tumorosfera tienen el fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/bajo</sup>, y además, son células indiferenciadas, ya que no expresan los marcadores CK14, marcador de célula mioepitelial, ni CK18, marcador de célula ductal. Asimismo, estas células son capaces de generar tumores cuando se trasplantan (al menos 1.000 células) en mamas de ratones inmunodeficientes (Grimshaw et al., 2008; Ponti et al., 2005).

Los dos modelos que se proponen para explicar la propagación de los tumores no son incompatibles. Se ha propuesto un modelo que combina ambas teorías para explicar el cambio de fenotipo que sufren algunos tumores durante la progresión del tumor, mediante el cual se vuelven más agresivos (Vecchi et al., 2008), aunque la mayoría de los tumores se mantienen estables en los últimos estadios de la enfermedad e incluso durante la metástasis (Ma et al., 2003; Weigelt et al., 2003). En dicho modelo, al principio, el crecimiento del tumor sería llevado a cabo por una CSC1, y con la progresión del tumor, otra distinta CSC2 surgiría debido a la evolución clonal de la CSC1, como resultado de la adquisición de una mutación adicional o una modificación epigenética. La CSC2 sería más agresiva, se convertiría en dominante y conduciría a la formación del tumor (Barabe et al., 2007; Clark et al., 2000) (Figura 18C).

### **Célula de origen del cáncer**

También existen dos teorías para explicar la heterogeneidad intertumoral (existencia de diferentes subtipos tumorales); mientras que una teoría postula que las diferentes mutaciones genéticas o epigenéticas ocurrirían dentro de la misma célula diana dando lugar a diferentes fenotipos tumorales (Barker et al., 2009; Zhu et al., 2009) (Figura 19A), la otra teoría postula que los distintos subtipos tumorales se originarían de distintas células que componen el tejido, sirviendo como célula de origen (Bailleul et al., 1990; Brown et al., 1998; Lawson et al., 2010; Wang et al., 2009a) (Figura 19B).

Estos mecanismos celulares y moleculares no son exclusivos, pudiendo actuar juntos para determinar el comportamiento y la histopatología del tumor (Alcantara Llaguno et al., 2009; Holland et al., 2000; Wang et al., 2009b). Además, mecanismos extrínsecos pueden estar involucrados en la heterogeneidad tumoral, ya que las interacciones entre las células del tumor y el microambiente estromal son determinantes cruciales de la malignidad del tumor (Tlsty and Coussens, 2006).



**Figura 19. Modelos representativos de la heterogeneidad intertumoral.** (A) Modelo de Mutación Genética. Las diferentes mutaciones genéticas o epigenéticas ocurrirían dentro de la misma célula diana dando lugar a diferentes fenotipos tumorales. (B) Modelo de Célula de Origen. Los distintos subtipos tumorales se originarían de distintas células que componen el tejido, sirviendo como célula de origen. Adaptado de (Visvader, 2011)

La naturaleza de las células diana tiene una importante influencia en las características del tumor, ya que la activación de las mismas rutas oncogénicas en diferentes poblaciones celulares genera tumores con distinto potencial de malignidad (Perez-Losada and Balmain, 2003). Sin embargo, a pesar de que la existencia de una jerarquía celular sea una herramienta importante para entender las células de origen del cáncer, si las células tumorales presentan plasticidad fenotípica o capacidad de des-diferenciación durante la progresión neoplásica, los marcadores de linaje y las rutas moleculares de las células tumorales no reflejan la verdadera célula de origen en el tejido normal. De esta forma, la célula de origen, que es la célula que adquiere la primera mutación promotora del cáncer, no tiene por qué estar relacionada con la CSC, que es la célula que posee la capacidad de mantener el tumor. Célula de origen y CSC son dos conceptos distintos (Visvader, 2011).

Mediante estudios de identificación de linaje celular se han determinado las células de origen de tumores intestinales (Barker et al., 2009; Zhu et al., 2009), de próstata (Wang et al., 2009a), de páncreas (Gidekel Friedlander et al., 2009), de estómago (Barker et al., 2010) y de células de la piel (Youssef et al., 2010), en modelos de

ratón modificados genéticamente. Además, mediante la activación de la expresión de oncogenes ó la inactivación de la expresión de genes supresores de tumores en una subpoblación de células determinada, usando promotores específicos, se han estudiado las células de origen de tumores de cerebro (Alcantara Llaguno et al., 2009), pulmón (Kim et al., 2005) y mama (Bouras et al., 2008; Molyneux et al., 2010), en ratón. Incluso, se han realizado trasplantes en ratones inmunodeficientes de células aisladas de tejidos y sometidas a manipulación genética *ex vivo* para identificar la célula de origen del tumor (Hope et al., 2004).

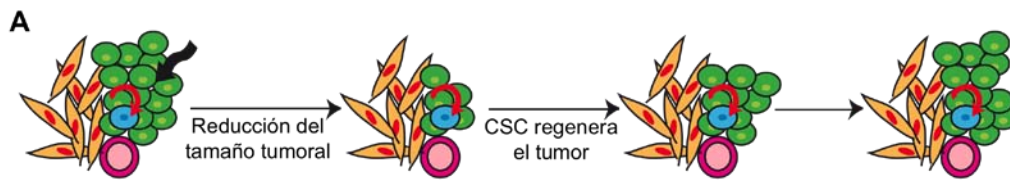
### Terapias contra el cáncer

La identificación de la célula de origen tiene importantes implicaciones para desarrollar terapias preventivas, pudiendo, de ésta forma, suprimir o revertir la fase inicial de la enfermedad. Además, puede permitir un análisis más preciso de las lesiones genéticas implicadas en la iniciación y progresión del tumor, y servir como plataforma para la identificación de biomarcadores tempranos de la enfermedad (Visvader, 2011).

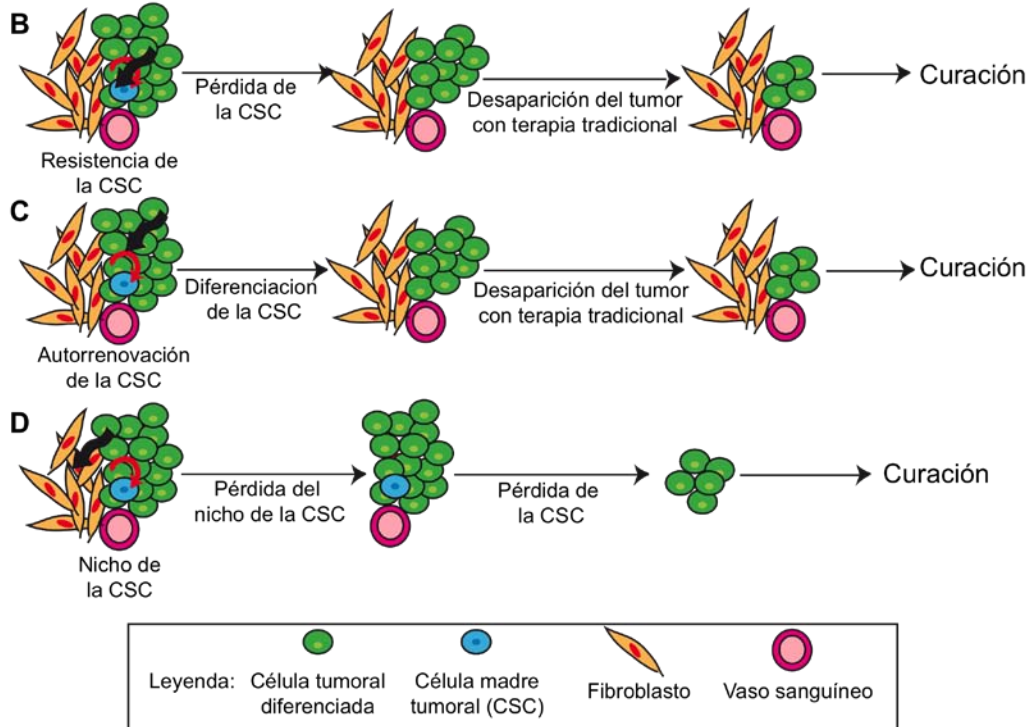
En la mayoría de los casos, los tratamientos llevados a cabo contra el tumor, son posteriores a la detección de éste. Muchas de las terapias estandarizadas tienen como objetivo atacar al mayor numero de células de la masa celular (Figura 20A). Sin embargo, esta estrategia reduce el tamaño del tumor, pero a menudo, no elimina las CSCs. Además, la aparición de tumores localizados y la existencia de metástasis después de aplicar tratamientos contra el tumor indican que las CSCs son capaces de evadir la quimioterapia y radioterapia, así como de repoblar el tumor después del tratamiento. Incluso, algunos estudios clínicos sugieren que la quimioterapia favorece la proliferación de las CSCs (Tanei et al., 2009; Yu et al., 2007).

Existen, al menos, tres vías que podrían ser potenciales dianas terapéuticas para eliminar las CSCs (Ablett et al., 2012): Actuar sobre los mecanismos que dotan a las CSCs de resistencia a las terapias actuales, por ejemplo alterando sus mecanismos de reparación del DNA (Figura 20B). Inhibir las rutas de señalización que dirigen la autorrenovación de las CSCs (Notch, Hedgehog, Wnt) induciendo así la diferenciación o apoptosis (Figura 20C). Eliminar el nicho de las CSCs (Figura 20D).

**Terapia tradicional**



**Terapias alternativas**



**Figura 20. Terapias contra el cáncer.** (A) Terapia tradicional, que tiene como objetivo atacar al mayor número de células de la masa tumoral. (B-D) Terapias alternativas; tienen como objetivo (B) actuar sobre los mecanismos que dotan a las CSCs de resistencia a las terapias actuales, (C) inhibir las rutas de señalización que dirigen la autorrenovación de las CSCs, (D) y eliminar el nicho de las CSCs. Adaptado de (Ablett et al., 2012).

**Cáncer de mama**

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer, y su tasa de mortalidad en las mujeres sólo es superada por la del cáncer de pulmón. El riesgo de desarrollar un cáncer de mama a lo largo de la vida de la mujer se estima en un 12,6% (equivalente a una de cada ocho mujeres) (Bray et al., 2004; Jemal et al., 2007).

Existen diferentes subtipos de tumores de mama con diferencias biológicas y pronósticas, determinados mediante el análisis de las variaciones en los patrones de expresión génica de carcinomas de mama humano, y la agrupación jerárquica de los genotipos según la denominada “huella genética” (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001):

El subtipo luminal se caracteriza por la expresión de ER, y comparte características con las células luminales que revisten el ducto mamario. Se divide a su vez en 2 subtipos: A (con altos niveles de expresión de RE) y B (con bajos niveles de expresión de RE). Estos tumores aparecen principalmente en mujeres postmenopáusicas, y representan 50-80% de los carcinomas (Gown, 2008).

El subtipo HER2<sup>+</sup>, el cual tiene mal pronóstico, presenta una elevada expresión del marcador de superficie HER2 y ausencia o mínima expresión de ER/PR. HER2, también denominado Neu o ErBb2, es un receptor del factor de crecimiento epidérmico humano que interviene en el control del crecimiento celular, y no parece tener un ligando específico, sino que actúa como co-receptor de múltiples factores de crecimiento (Slamon et al., 2001).

El subtipo basal, que recibe este nombre por su perfil de expresión génica similar a la de un epitelio basal mamario, también denominado “triple negativo”, se caracteriza por la ausencia o mínima expresión de ER/PR y HER2. Presenta una elevada expresión de citoqueratinas 5 y 6 (características de las células mioepiteliales) y de EGFR, y representa el 15-20% de los tumores, siendo éstos muy heterogéneos y agresivos (Gusterson, 2009).

El subtipo que expresa bajos niveles de Claudina representa a los tumores tripe negativo con características de células mesenquimales (Herschkowitz et al., 2007).

El subtipo normal, representa a los tumores con perfiles de expresión parecidos al tejido mamario normal.

Recientemente se han determinado 10 subtipos de tumores de mama mediante el análisis de biopsias procedentes de mujeres que previamente habían sido tratadas por un cáncer de mama, y que posteriormente tuvieron un seguimiento, lo que permitió comparar la información genética con los datos clínicos de las pacientes, estimando cuál había sido su evolución, y su respuesta a las terapias (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Esta clasificación permitirá desarrollar terapias adaptadas a cada uno de los subtipos esperando incrementar la eficacia de los tratamientos. Se trata de un primer paso hacia lo que se ha denominado ‘medicina personalizada’, en la que la terapia se ajusta exactamente a la enfermedad particular del paciente concreto.

### Origen de los tumores mamarios

Las MaSCs y las MaCSCs comparten la capacidad de autorrenovación y diferenciación. Sin embargo, a diferencia de las MaSCs, las MaCSCs están poco controladas, presentan una activación aberrante de las rutas implicadas en la autorrenovación (Wnt, Hedgehog y Notch) (Jiao et al., 2010; Liu et al., 2009; Liu et al., 2010; Scheel et al., 2011; Wu et al., 2011), y una baja actividad en la diferenciación (Iliopoulos et al., 2011).

La alta susceptibilidad de la MaSCs a mutaciones y transformaciones oncogénicas durante su vida, evidenciaría la teoría que propone que el origen de la MaCSC sería

el resultado de la desregulación de las rutas implicadas en la autorrenovación y diferenciación de la MaSC (Al-Hajj et al., 2003; Ginestier et al., 2007; Ponti et al., 2005). Sin embargo, la clasificación de los tumores de mama sugiere que los distintos subtipos pueden derivar de mutaciones en distintas células de origen (Molyneux et al., 2007).

Debido a que los tumores basales tienen un patrón de expresión igual que el de las MaSCs, se pensó que las MaSCs podrían ser las células diana para desarrollaran el tumor (Foulkes, 2004; Liu et al., 2008). No obstante, estudios en mamas pre-neoplásicas con la mutación BRACA1 (gen supresor de tumores), que desarrolla tumores de mama con características del subtipo basal, demostraron expansión de la población de progenitores luminales. Además, los progenitores luminales mostraban alteradas las propiedades de crecimiento, y eran capaces de producir nódulos tumorales cuando eran trasplantadas en ratones. Incluso existen similitudes en los perfiles de expresión génica entre los progenitores luminales, las células procedentes de tejidos preneoplásicos con la mutación BRACA1, y las células que conforman los tumores del subtipo basal (Lim et al., 2009). De esta forma, las células con la mutación BRACA1 son ALDH<sup>+</sup>, al igual que los progenitores luminales (Liu et al., 2008). Además, se realizaron estudios en modelos animales en los que se condicionaba la inactivación de BRACA1 y p53 en las células luminales o en las células basales. Sólo la inactivación en las células luminales permitió desarrollar tumores del subtipo basal (Molyneux et al., 2010).

También se comparó la jerarquía mamaria epitelial presente en mamas pre-neoplásicas entre modelos de ratón MMTV-wnt-1 y MMTV-Neu, que desarrollan tumores mamarios de tipo basal y HER2 respectivamente. Mientras que no se observaron cambios al analizar la población enriquecida en MaSCs en las mamas de los ratones MMTV-Neu, se observó un aumento de ésta población en las mamas de las ratonas MMTV-wnt-1, sin embargo, en estas ratonas, la población de células capaces de regenerar glándulas mamarias se encontraba dentro de la población de progenitores luminales. Además, se determinó que en las ratonas MMTV-wnt-1 los progenitores luminales estaban altamente enriquecidos en la capacidad tumorigénica, mientras que en el modelo animal MMTV-Neu no se consiguió identificar la célula iniciadora del tumor (Vaillant et al., 2008).

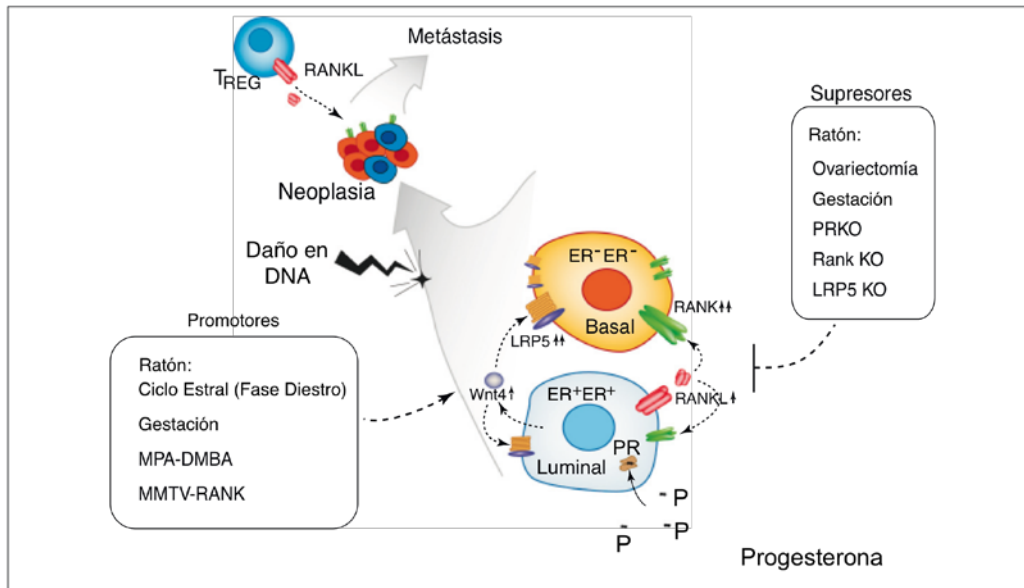
Todos estos resultados conducen a la conclusión de que las células que originan los tumores mamarios basales son los progenitores luminales. Sin embargo, mediante el análisis del modelo de ratón MMTV-Neu deficiente en Ciclina D1, que no desarrolla tumores, Jeselsohn sugiere que las células que originarían los tumores mamarios HER2 serían las PI-MECs, ya que la deficiencia de Ciclina D1 en éste transgénico está relacionada con la drástica disminución de las PI-MECs, siendo la Ciclina D1 necesaria para el mantenimiento de esta población (Jeselsohn et al., 2010).

## **Papel de las hormonas en la tumorigénesis y el crecimiento de tumores mamarios**

Varios estudios demuestran que las hormonas sexuales están implicadas en el desarrollo y progresión de los tumores mamarios. La primera evidencia de relación entre el desarrollo de tumores mamarios y las hormonas sexuales fue descrita en 1896 por Beatson y colaboradores. Describieron que las pacientes con tumores mamarios metastáticos, a las que se extirparon los dos ovarios, mostraban regresiones en los tumores, justificando de esta forma la terapia hormonal para el tratamiento de cáncer de mama (Beatson, 1896). Las hormonas modulan el desarrollo de tumores mamarios con mutaciones conocidas, como es el caso de los tumores desarrollados a partir de la mutación en el gen BRACA (Rebbeck et al., 2002), sin embargo, las hormonas tienen mayor efecto en los tumores sin componente genético demostrable (Clemons and Goss, 2001). La ovariectomía, y con ello la eliminación de las hormonas sexuales secretadas por los ovarios, reduce la incidencia de tumores mamarios en un 75% (Feinleib, 1968). Por el contrario, el aumento del tiempo de exposición a las hormonas sexuales ocasionado por la temprana menarquía, menopausia tardía, alta densidad ósea y obesidad, está asociado al aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama (Goss et al., 2011; Hulka, 1997).

Está descrito que la administración de estrógenos causa tumores en varios modelos animales, y los antiestrógenos anulan este efecto (Hollingsworth et al., 1998; Zumoff, 1998). Asimismo, en humanos, la alta concentración de estrógenos en sangre aumenta el riesgo de desarrollar tumores mamarios (Kaaks et al., 2005; Key et al., 2002). Sin embargo, la terapia con estrógenos no implica que los tumores mamarios desarrollados sean ER<sup>+</sup>, ya que las mujeres menopáusicas tratadas con estrógenos desarrollan tumores mamarios ER<sup>+</sup> y ER<sup>-</sup> independientemente (Yager, 2012). Además de estar implicados en la carcinogénesis de la glándula mamaria, los estrógenos están implicados en la proliferación tumoral en algunos tumores ER<sup>+</sup>, ya que el suministro de un antagonista de estrógeno (Tamoxifeno), que inhibe la unión del estrógeno al receptor, inhibe dicha proliferación (Allred et al., 1998), incluso reduce la tasa de recurrencia de la enfermedad, y más de la mitad de la incidencia de nuevos tumores mamarios en los pacientes (Forbes et al., 2008).

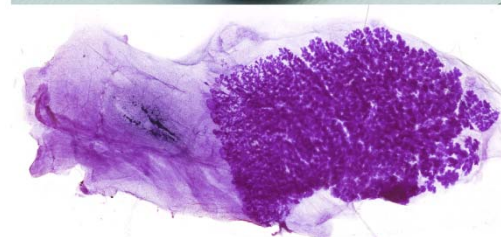
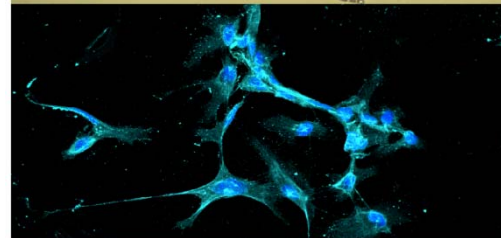
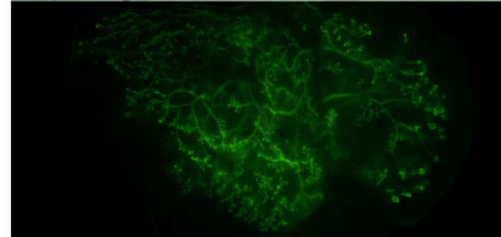
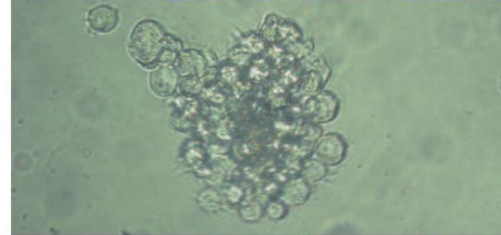
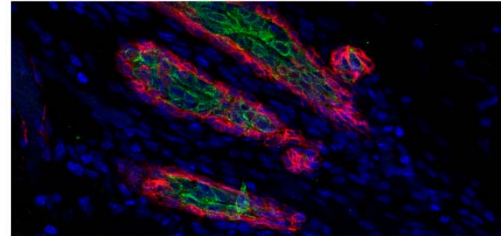
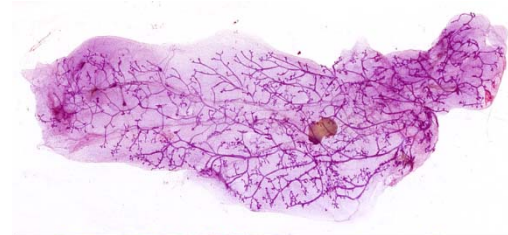
La progesterona también está implicada en la carcinogénesis (Joshi et al., 2012). La ruta de señalización llevada a cabo por la progesterona en las células luminales ductales PR<sup>+</sup> permite que éstas liberen los ligandos RANKL y Wnt4, y en respuesta a estos ligandos, las células basales ER<sup>-</sup>PR<sup>-</sup> aumentan su expresión de RANK y LRP5, receptores de dichos ligandos (Figura 21). Las interacciones en las células basales entre los ligandos y los receptores permiten la expansión de éstas, y con ello, las células basales aumentan el riesgo de adquirir mutaciones que pueden ser determinantes para la tumorigénesis (Gonzalez-Suarez et al., 2010; Sennikov et al., 2002). Del mismo modo, las células que expresan RANK también son capaces de responder a RANKL sintetizado por células reguladoras T que rodean al tumor (Tan et al., 2011) (Figura 21).



**Figura 21. Papel de la progesterona en los tumores mamarios basales.** La ruta de señalización llevada a cabo por la progesterona en las células luminales ductales PR<sup>+</sup> permite que éstas liberen los ligandos RANKL y Wnt4. En respuesta a estos ligandos, las células basales ER<sup>-</sup>PR<sup>-</sup> aumentan su expresión de RANK y LRP5, receptores de dichos ligandos. Las interacciones en las células basales entre los ligandos y los receptores permiten la expansión de éstas, y con ello, las células basales aumentan el riesgo de adquirir mutaciones que pueden ser determinantes para la tumorigénesis. Asimismo, las células que expresan RANK también son capaces de responder a RANKL sintetizado por linfocitos T reguladores que rodean al tumor. Adaptado de (Joshi et al., 2012).

La elevada expresión de RANK en tumores de mama humanos está asociada con metástasis en hueso y una mala prognosis (Santini et al., 2011). Además, en estudios realizados en ratones (PR<sup>-/-</sup>) que fueron sometidos a un tratamiento carcinogénico, y en ratones deficientes para BRACA1/p53, que normalmente desarrollan tumores basales, a los que se les administró un antagonista del receptor de progesterona, se observaron disminuciones en la incidencia, e incluso una completa supresión de los tumores mamarios (Lydon et al., 1999; Poole et al., 2006).

**OBJETIVOS**

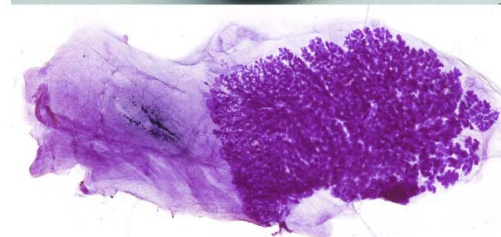
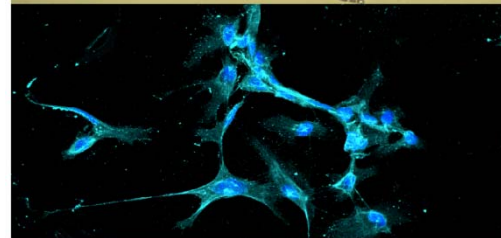
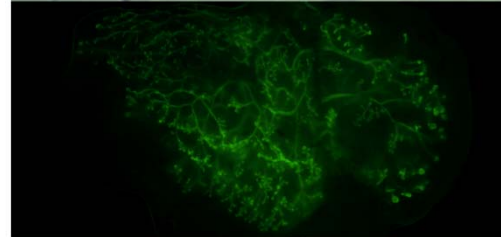
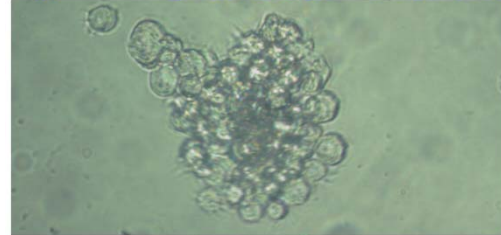
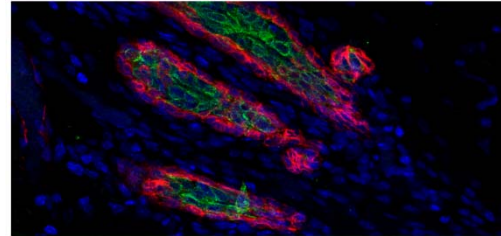
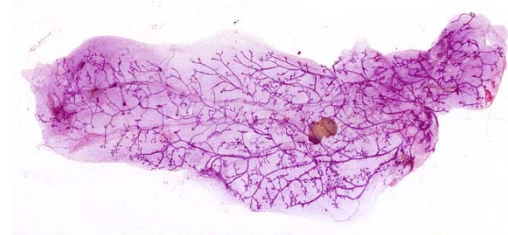


En este trabajo nos planteamos como objetivo general el estudio en ratón de las células madre adultas de glándula mamaria y de las células madre del cáncer de mama. Para ello, se estableció un plan de trabajo con los siguientes objetivos experimentales:

- Determinar *in vivo* la frecuencia de células madre de la glándula mamaria (MaSCs) dentro de la población de células epiteliales mamarias (MaECs), y estudiar el enriquecimiento de MaSCs dentro de la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup>
- Determinar la capacidad de reconstitución de la glándula mamaria en hembras receptoras adultas.
- Demostrar que la mamosfera contiene una célula madre capaz de reconstituir *in vivo* una glándula mamaria.
- Analizar si las MaECs de macho, al igual que las de hembra, contienen una población de MaSCs, y determinar la capacidad de reconstitución de la glándula mamaria en machos.
- Demostrar que el estrógeno es el responsable de la expansión de las MaSCs durante la pubertad.
- Analizar si la expansión de las MaSCs durante la pubertad podría tener un efecto en el desarrollo de tumores en el modelo animal MMTV-Neu.
- Demostrar que la célula formadora de tumorosferas es la célula madre de cáncer (MaCSC), y analizar fenotípicamente la población de MaCSCs del tumor mamario.
- Análisis de la estructura epitelial de glándula mamaria de machos.



**MATERIALES Y**  
**MÉTODOS**



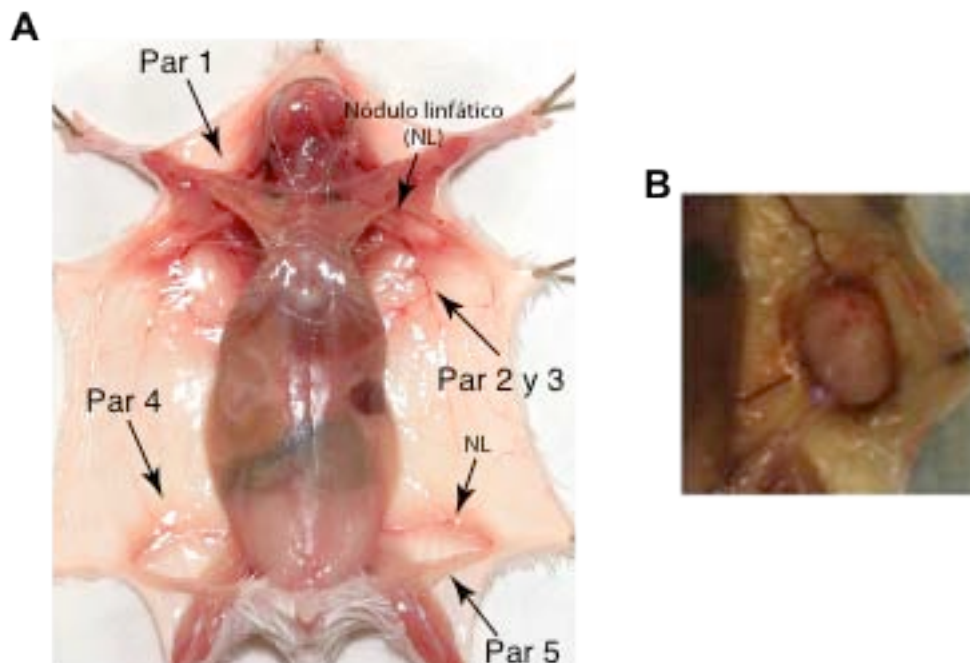
### Animales

Para realizar los experimentos descritos en la presente tesis doctoral se utilizaron varias cepas de ratones, y todos los ratones fueron estabulados en condiciones apropiadas en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Se han utilizado ratones silvestres de las cepas FVB y C57Bl/6, ratones inmunodeficientes Rag2<sup>-/-</sup> en fondo C57Bl/6 (Shinkai et al., 1992) obtenidos de Taconic, ratones GFP<sup>+/+</sup> en fondo C57Bl/6 (Okabe et al., 1997), cuyas células expresan la proteína verde fluorescente (cedidos por el Dr. Augusto Silva (CIB-CSIC)), ratones RFP<sup>+/+</sup> en fondo C57Bl/6 (Vintersten et al., 2004), cuyas células expresan la proteína roja fluorescente (obtenidos a través de la Dra. Cristina Clavería (CNIC)), ratones AREG<sup>-/-</sup> en fondo C57Bl/6, que presentan una deficiencia en la síntesis del factor de crecimiento anfirregulina, implicada en la ruta de señalización del estrógeno (Luetteke et al., 1999) (obtenidos a través del Dr. Matias Morin (Cima, Pamplona)), así como ratones MMTV-Neu en fondo FVB, cuyas hembras desarrollan tumores en sus glándulas mamarias con una elevada frecuencia (Guy et al., 1992) (obtenidos de Jackson Laboratories).

Todos los experimentos descritos, en los que se utilizaron animales, se realizaron de acuerdo a la legislación Española y a la de la Unión Europea sobre protección de animales de experimentación (Directiva 86/609/EEC). Los métodos experimentales fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), minimizando en todo momento el número de animales utilizados y su sufrimiento.

### Obtención de células epiteliales de glándula mamaria (MaECs) y células de tumores mamarios (MaTCs)

Las MaECs se obtuvieron a partir de los pares 2, 3, 4 y 5 de las glándulas mamarias de ratones (Figura 22A). Antes de extraer el tejido mamario, se eliminaron los nódulos linfáticos (Figura 22A) para evitar la contaminación por células linfoides (Linaje positivas o Lin<sup>+</sup>). En el caso de las MaTCs, se separó el tejido mamario que rodea al tumor, aislando únicamente el tejido tumoral (Figura 22B).



**Figura 22. Observación in-situ de las glándulas mamarias y los tumores mamarios de ratón.** (A) Glándulas mamarias. Localización de los cinco pares mamarios presentes en un ratón adulto. Localización de los nódulos linfáticos en las mamas izquierdas de los pares 2-3 y 4 del ratón adulto. (B) Tumores mamarios. Localización de un tumor generado en la mama izquierda del par mamario 4 en una ratona adulta

Una vez extraído el tejido, se disgregó mecánicamente con dos bisturís, y se introdujo en un tubo gentleMACS C que contenía 5ml de medio de proliferación (Tabla I) y 200 $\mu$ l de colagenasa A (Roche Diagnostics GmbH). Se introdujo el tubo en el disociador gentleMACS, disgregando la muestra con el programa “m\_spleen2” durante 10 segundos. Seguidamente, se realizó una digestión enzimática incubando el tejido durante 30 minutos a 37°C en un agitador orbital a 225 r.p.m., y las células se disgregaron nuevamente introduciendo el tubo en el disociador con el programa “m\_spleen3” durante 30 segundos. La suspensión celular resultante se lavó tres veces en solución de lavado (Tabla I) centrifugando a 800 x g durante 5 minutos. A continuación, el sedimento se resuspendió en 1ml de medio de proliferación (Tabla I) y 4 volúmenes de tampón de lisis de eritrocitos (Tabla I), y se filtró a través de una malla de 40 $\mu$ m para eliminar fragmentos de tejido. El filtrado obtenido se centrifugó a 134 x g durante un minuto permitiendo así eliminar los fibroblastos contaminantes. Por último, las células se resuspendieron en 1ml de medio de proliferación (Tabla I), y la suspensión celular obtenida se paso varias veces a través de una jeringuilla de 1ml, usando agujas de 25G, para romper los agregados y obtener una suspensión de células aisladas. Las células se contaron en un contador CASY-TTC (Roche).

### Cultivo *in vitro*: Formación de mamosferas o de tumorosferas

Para inhibir la adherencia de células epiteliales diferenciadas a las placas de cultivo, se pre-trataron las placas con una solución de 12gr/l de Poly 2-hidroxietil metacrilato (Sigma) en etanol al 95%. Se cubrió toda la superficie de cultivo con esta solución, y se permitió la evaporación del etanol en una campana con el flujo durante toda la noche, obteniéndose de ésta forma placas no adherentes (pHEMA).

La suspensión celular resultante de la digestión del tejido mamario o del tumor se sembró a una densidad de 10.000 células viables/cm<sup>2</sup> en placas pHEMA o comerciales con baja capacidad de adhesión (Corning) con medio de proliferación (Tabla I) (25ml en placas de 154cm<sup>2</sup>). Los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Transcurridos siete días de cultivo, se determinó la formación de mamosferas o de tumorosferas.

**Tabla I. Composición del medio de cultivo y de las soluciones empleadas para el aislamiento de las MaECs y de las MaTCs de ratón**

<b>Medio de Proliferación</b>		
Componente	Concentración	Casa Comercial
DMEM-F12	1x	Gibco
B27 sin ácido retinoico	1x	Gibco
Heparina	2mg/ml	Fluka
bFGF	2ng/ml	Guillermo Jimenez, CIB
EGF	200ng/ml	Miltenyi Biotec
Penicilina	100U/ml	BioWhittaker
Estreptomicina	100mg/ml	BioWhittaker
Anfotericina B	250ng/ml	BioWhittaker
b-Mercaptoetanol	5x10 <sup>-5</sup> M	Fluka
L-Glutamina	2mM	Gibco
Gentamicina	100mg/ml	Gibco
<b>Solución de Lavado</b>		
Componente	Concentración	Casa Comercial
PBS	1x	-
BSA	1% (p/v)	Roche
EDTA	5mM	Sigma
<b>Tampón de lisis de eritrocitos</b>		
Componente	Concentración	Casa Comercial
NH <sub>4</sub> Cl	7,47g/L	Sigma
Tris	50mM	Sigma
NaCl	138mM	Sigma
KCl	2,7mM	Sigma

## Diferenciación de las células que conforman la mamosfera

Las mamosferas se recogieron tras siete días de cultivo, disgregándose enzimáticamente con 0,05% (p/v) de Tripsina-EDTA (Gibco) durante cinco minutos a 37°C. La actividad enzimática de la Tripsina se inhibió mediante la adición de FCS (Cambrex Bio Science) al 1%, y se pasó repetidamente dicha solución a través de una aguja de 25G para romper los agregados celulares y obtener una suspensión de células aisladas. Dicha suspensión se centrifugó a 800 x g durante cinco minutos, y las células presentes en el sedimento se resuspendieron en medio de proliferación (Tabla I) para su conteo. Estas células se sembraron a una densidad de 32 células viables/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos, donde previamente se habían introducido cubreobjetos de cristal pre-tratados con una solución de 10<sup>6</sup>g/m l colágeno tipo IV (Sigma) en PBS durante toda la noche a 4°C ó durante dos horas a 37°C, y esterilizados con etanol al 70% (v/v) y con agua destilada estéril. A cada pocillo se añadió medio de cultivo de diferenciación (Tabla II), y las placas se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante cinco días. En estas condiciones tiene lugar la diferenciación hacia células ductales y mioepiteliales. La diferenciación a células alveolares, se obtuvo en un segundo paso. Tras retirar el medio de diferenciación, se añadió sobre cada cubreobjetos una monocapa de GFR Matrigel™ (BD Biosciences) 1:3 (v/v) en medio de diferenciación (Tabla II), y se incubó durante 30 minutos a 37°C para permitir la solidificación del Matrigel™. A continuación, se añadió nuevo medio de diferenciación (Tabla II) suplementado con 1µg/ml de prolactina (Sigma) y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante tres o cuatro días.

Una vez obtenidas las células diferenciadas, se fijaron con metanol absoluto a -20°C durante 20 minutos, se lavaron tres veces en una solución que contenía 0,03% (v/v) de Tritón X-100 (Fluka) en PSB durante 10 minutos para su permeabilización, y se mantuvieron a 4°C en PBS hasta su posterior uso.

**Tabla II. Composición del medio de cultivo empleado para la diferenciación de las células que conforman las mamosferas.**

Medio de Diferenciación		
Componente	Concentración	Casa Comercial
Ham's F-12	1x	Lonza
FCS	5% (v/v)	Cambrex
Insulina	5mg/ml	Sigma
Hidrocortisona	1mg/ml	Sigma
EGF	10ng/ml	Miltenyi Biotec
Toxina Colérica	10mg/ml	List Biological Laboratories
Penicilina	100U/ml	BioWhittaker
Estreptomicina	100mg/ml	BioWhittaker
Anfotericina B	250ng/ml	BioWhittaker
b-Mercaptoetanol	5x10 <sup>-5</sup> M	Fluka

### Análisis por dilución límite (LDA) de células formadoras de mamosferas o tumorosferas

La suspensión celular resultante de la digestión del tejido mamario o de un tumor, se sembró en medio de proliferación (Tabla I) en placas de 96 pocillos de fondo plano con baja capacidad de adhesión (Corning), a una densidad de 100, 300, 1000 y 3000 células/pocillo, en 24 pocillos para cada densidad. Aunque la detección de mamosferas o tumorosferas se pueden detectar a los siete días de cultivo a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, los análisis no se realizaron hasta los 14 días, para distinguir entre mamosferas o tumorosferas y posibles agregados celulares. Se determinó, para cada densidad celular, la fracción de pocillos positivos para mamosferas o tumorosferas, y a partir de dichas fracciones, mediante análisis estadístico, la frecuencia de células capaces de generar mamosferas o tumorosferas.

### Análisis de marcadores celulares mediante citometría de flujo

La suspensión celular resultante de la digestión del tejido mamario o de un tumor se incubó con una solución de bloqueo (Tabla III) durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se incubó con los respectivos anticuerpos primarios (Tabla IV) durante 45 minutos a 4°C. Tras lavar las células con PBS y centrifugarlas a 800 x g, se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos (Tabla IV) durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, tras lavar las células y centrifugarlas, se resuspendieron en una solución salina de PBS suplementado con 20µg/ml de yoduro de propidio (PI) para descartar las células muertas (PI positivas). Todos los ensayos se realizaron en un citómetro de flujo XL o FC500 usando para el análisis de los datos el programa Expo32 (Coulter).

**Tabla III. Composición de las soluciones empleadas en citometría de flujo, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, antes de la realización de los marcajes de los antígenos**

Solución de Bloqueo		
Componente	Concentración	Casa Comercial
PBS	1x	-
BSA	3% (p/v)	Roche
Azida Sódica	0,0025% (p/v)	Fluka
Suero del animal en el que se genera el anticuerpo secundario	10%(v/v)	-
Tampón Citrato		
Componente	Concentración	Casa Comercial
Ácido Cítrico	0,1M	Fluka
Citrato Sódico	0,1M	Fluka
H <sub>2</sub> O	-	-

Tabla IV. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Hospedador	Casa comercial	Clon / Cat #	Dilución
CD24-Biotina	Rata, monoclonal	BD Pharmingen	M1/69	0,5µg/10 <sup>6</sup> células
CD29-FITC	Hamster, monoclonal	BD Pharmingen	Ha2/5	0,5µg/10 <sup>6</sup> células
CD29-Biotina	Hamster, monoclonal	BD Pharmingen	Ha2/5	0,5µg/10 <sup>6</sup> células
CD61-PE	Hamster, monoclonal	BD Pharmingen	2C9.G2	0,5µg/10 <sup>6</sup> células
NaPi-11b	Conejo, antisuero	Dr. J. Biber, U. Zurich	-	1:400
α-SMA-Cy3	Ratón, monoclonal	Sigma	1A4	1:1600/1:200*
Troma-I	Rata, monoclonal	NIH developmental studies hybridoma bank, Iowa	Troma-I	1:20/1:200*
RE	Conejo, policlonal	Santa Cruz	MC-20	1:50
Sca-1	Rata, monoclonal	BD Pharmingen	E13-161.7	0,5µg/10 <sup>6</sup> células
c-Kit-PE	Ratón, monoclonal	BD Pharmingen	2B8	0,5µg/10 <sup>6</sup> células
Living EGFP	Colors Ratón, monoclonal	Clontech	632459	1:200
Living Colors DsRed	Conejo, policlonal	Clontech	632496	1:200
β-Caseína	Cabra, policlonal	Santa Cruz Biotechnology	M-14	1:200
Anticuerpos secundarios				
Anticuerpo	Hospedador	Casa comercial	Clon	Dilución
Anti-Ratón, IgM-Alexa 488	Cabra	Molecular Probes	A-11001	1:800
Anti-Conejo, IgM-Alexa 488	Cabra	Molecular Probes	A-11008	1:800
Anti-Conejo, IgM-Alexa 647	Cabra	Molecular Probes	A-21244	1:200
Anti-Conejo, IgM-Alexa 568	Cabra	Molecular Probes	A-11011	1:800
Anti-Conejo, IgM-Texas Red	Cabra	Molecular Probes	T-2767	1:800
Anti-Rata, IgM-Alexa 488	Cabra	Molecular Probes	A-11006	1:800/1:200*
Anti-Cabra, IgM-FITC	Conejo	Molecular Probes	A-11078	1/800
Streptavidina Alexa 647	-	Invitrogen	S-32357	0,25µg/10 <sup>6</sup> células
Streptavidina Texas Red	-	Molecular Probes	S-872	0,25µg/10 <sup>6</sup> células
Streptavidina Alexa 488	-	Molecular Probes	S-32354	0,25µg/10 <sup>6</sup> células
DAPI	-	Sigma	D-9542	20µg/µl / 0,09ng/ml*

\* La concentración empleada varía dependiendo de si se realiza una inmunohistoquímica o una inmunocitoquímica.

## **Separación de poblaciones celulares mediante Sorting**

La suspensión celular así como las tinciones con anticuerpos primarios y secundarios se realizaron tal y como se han descrito en apartados anteriores. Además, en este caso, las células se mantuvieron en condiciones de esterilidad y en ausencia de azida sódica. Tras el marcaje, las células se separaron utilizando un FACS Vantage (BD) con una boquilla de 90 ó 100µm y en condiciones de esterilidad. Las células se recogieron directamente en tubos eppendorf de 1.5 ml cuando éstas se iban a utilizar en trasplantes. Sin embargo, para crecer mamosferas o tumorosferas, las células se recogieron en placas de 96 pocillos con baja capacidad de adhesión (Corning), conteniendo cada pocillo 100µl de medio de proliferación (Tabla I), a los que posteriormente se les añadieron otros 100µl.

## **Inmunocitoquímica de células diferenciadas**

Se eliminó el PBS que conservaba las células fijadas y permeabilizadas y se añadió a los pocillos solución de bloqueo (Tabla III), manteniéndose durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios (Tabla IV) durante toda la noche a 4°C. Tras lavar las muestras con PBS tres veces durante 10 minutos en agitación, las células se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla IV) durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar las muestras con PBS tres veces durante 10 minutos en agitación, se montaron los cubreobjetos, que contenían las células pegadas, con el medio de montaje Mowiol y utilizando DAPI (0,09ng/ml) como tinción de contraste, en portaobjetos. Las muestras se secaron durante toda la noche, en oscuridad y a temperatura ambiente. Las preparaciones se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta que se analizaron con un microscopio de confocal Leica TCS SP5 AOBS.

## **Inmunocitoquímica de mamosferas o de tumorosferas**

Las mamosferas o las tumorosferas se recogieron en tubos de 15 ml, y sin ser disgregadas, se fijaron en 4% (p/v) de PFA en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron en PBS centrifugando a 800 x g durante cinco minutos, y fueron resuspendidas en una solución de bloqueo (Tabla III) durante una hora a temperatura ambiente. Las preparaciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla IV), se lavaron con PBS mediante centrifugación a 800 x g durante cinco minutos, y se incubaron con una solución de PBS conteniendo los anticuerpos secundarios (Tabla IV) durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, tras varios lavados de cinco minutos con PBS, se resuspendieron en el medio de montaje Mowiol utilizando DAPI (0,09ng/ml) como tinción de contraste. Las muestras se colocaron sobre portaobjetos, se montaron los cubreobjetos, y se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente y en

oscuridad. Las preparaciones se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta que se analizaron con un microscopio de confocal Leica TCS SP5 AOBs.

### Tinción de la glándula mamaria con Alumbre Carmín

Se extrajeron las glándulas mamarias (par cuatro) de ratones y se extendieron sobre un portaobjetos. Una vez adheridas al portaobjetos, se introdujeron en un tubo de 50 ml para su fijación con solución Carnoy (Tabla V) durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se lavaron con etanol al 70% (v/v) durante 15 minutos, y se introdujeron lentamente en agua destilada, donde se mantuvieron durante cinco minutos. Se incubaron las muestras durante toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad con la solución de tinción Alumbre Carmín (Tabla V). Las muestras se deshidrataron mediante lavados de 15 minutos con etanol al 70% (v/v), con etanol al 95% (v/v), y con etanol absoluto. A continuación se llevó a cabo un lavado con xileno (Merck) durante toda la noche. Las muestras se montaron con medio de montaje Permount (Fisher), se dejaron secar, y se fotografiaron.

**Tabla V. Composición de las soluciones empleadas para la tinción de las glándulas mamarias de ratón con Alumbre Carmín**

Solución de Fijación Carnoy		
Componente	Concentración	Casa Comercial
Etanol al 100%	60% (v/v)	Merck
Cloroformo	30% (v/v)	Merck
Ácido acético glacial	10% (v/v)	Merck
Solución de Tinción Alumbre Carmín		
Componente	Concentración	Casa Comercial
Carmín	2g/l	Sigma
Sulfato Potásico de Aluminio	5g/l	Sigma
Cristal de Timol	1g/l	Sigma
H <sub>2</sub> O destilada	-	-
La solución de Alumbre Carmín se preparo a 100°C durante 20 minutos, tras filtrarlo se le añadió Cristal de Timol como conservante, y se mantuvo a 4°C en oscuridad.		

### Inmunohistoquímica

Los cortes de glándula mamaria en los que se realizaron las inmunocitoquimas fueron preparados en el Servicio de Histología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Se enviaron las glándulas mamarias que habían sido fijadas en 4% (p/v) de paraformaldehido (PFA) (Merk) en PBS durante dos horas a 4°C que posteriormente se lavaron con PBS, o bien glándulas mamarias teñidas con Alumbre de Carmín, a las que se les eliminó el Permount con xileno previamente. Las muestras fueron incluidas

en bloques de parafina, y las secciones de tejido 6  $\mu\text{m}$  de espesor fueron recogidas sobre portaobjetos.

Para eliminar la parafina, las muestras se incubaron durante 1 hora a 60°C, y se lavaron 3 veces durante 3 minutos con xileno. Después se rehidrataron en etanol absoluto, etanol al 95% (v/v), etanol al 80% (v/v) y etanol al 75% (v/v), seguido de varios lavados de 5 minutos con PBS. El desenmascaramiento antigénico de las muestras se llevó a cabo hirviéndolas en Tampón Citrato (Tabla III) durante 20 minutos. Una vez enfriadas las muestras (20 minutos a temperatura ambiente), se realizaron cuatro lavados en agua destilada y un lavado en PBS, todos ellos de una duración de cinco minutos.

Para la inmunodetección de proteínas nucleares, se permeabilizaron las muestras con 0,5% (v/v) Tritón X-100 (Fluka) en PBS durante 15 minutos y agitación suave. Además, los lavados realizados durante el marcaje se realizaron con 0,1% (v/v) Tween 20 (Sigma) en PBS.

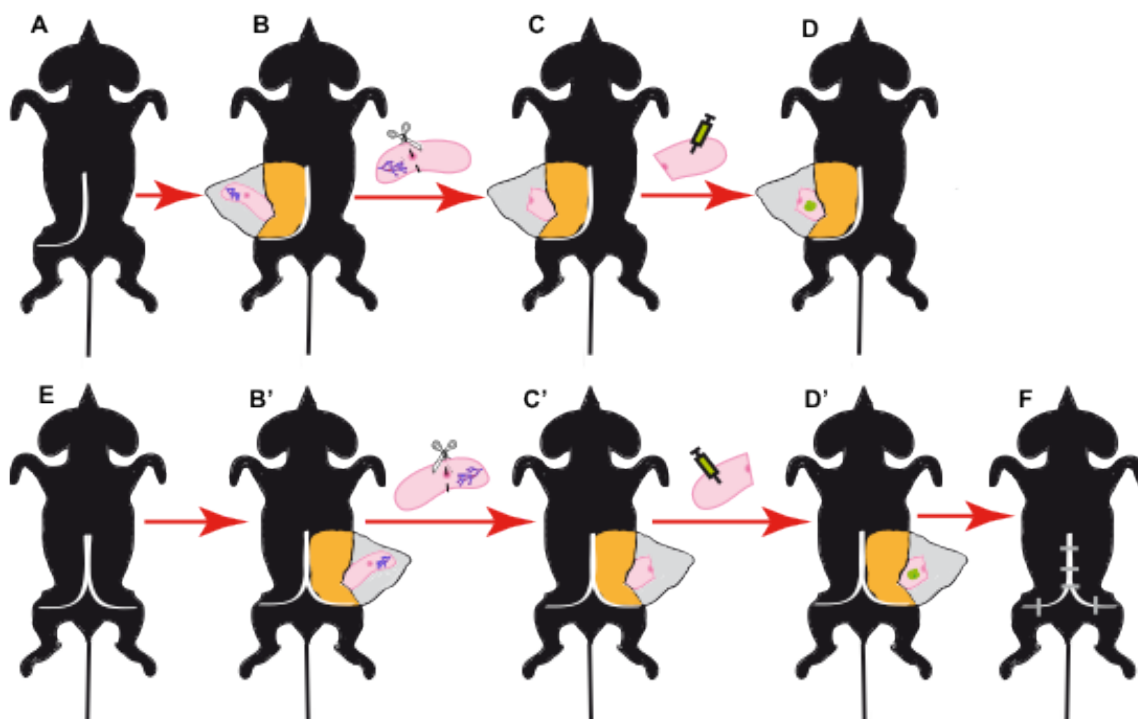
Los marcajes con anticuerpos de las secciones de tejido mamario se realizaron en gota, a partir de delimitar cada sección con un rotulador hidrofóbico. Las muestras se colocaron en una cámara húmeda tapada, evitando de esta forma su deshidratación, todo el proceso de marcaje se llevó a cabo en un agitador orbital. Las muestras se mantuvieron en solución de bloqueo (Tabla III) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios (Tabla IV) durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, las muestras se lavaron con PBS tres veces durante 10 minutos, y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla IV) y DAPI (0,5ng/ml) como tinción de contraste, durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar las muestras con PBS tres veces durante 10 minutos, se montaron las muestras con el medio de montaje Mowiol (Calbiochem) y cubreobjetos, dejándose secar en oscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche. Las muestras fueron almacenadas en condiciones de oscuridad a 4°C hasta que se analizaron con un microscopio de confocal Leica TCS SP5 AOBS.

### Trasplantes de glándula mamaria

Para los trasplantes de glándula mamaria se utilizaron como receptores, si no se indica lo contrario, ratones hembras de tres semanas de edad. Los ratones se anestesiaron por vía intraperitoneal, suministrando una solución de PBS conteniendo Ketamina (100mg/kg) y Xilacina (10mg/kg). Pasados alrededor de 10 minutos después de anestesiarse al ratón, cuando éste estaba dormido, se procedió a colocarle en posición decúbito dorsal, y con la ayuda de pinzas y tijeras se le realizó una incisión en la piel en la zona ventral-caudal (Figura 23A). Se separó la piel que cubría la zona derecha del ratón, permitiendo de esta forma la localización de la mama derecha del par 4. A continuación se separó el tejido mamario de la piel, se cauterizaron los vasos sanguíneos a nivel del ganglio linfático, y tomando éste como referencia, se eliminó

mediante un corte la zona de la glándula mamaria que contenía el epitelio mamario (Figura 23B). El trasplante se realizó en el estroma de la glándula mamaria libre de epitelio (Figura 22C-D). Seguidamente, se volvió a colocar la piel levantada en su sitio original (Figura 23E), y se procedió de igual forma a la realización del trasplante en la mama izquierda del par 4 (Figura 23B'-23D').

Una vez realizado el trasplante en las dos mamas del par 4, se cerró la incisión con grapas (Figura 23F), y se aplicó Povidona Yodada para evitar infecciones. Los animales se mantuvieron sedados durante todo el procedimiento, y las grapas se extrajeron 2 semanas después de la cirugía.



**Figura 23. Metodología para los trasplantes de mama (par 4) de ratón.** (A) Colocar al ratón en posición decúbito dorsal y realizar una incisión en la piel en la zona ventral-caudal. (B) Separar la piel, permitiendo de ésta forma la localización de la mama derecha del par 4. Eliminar el fragmento de estroma que contiene el epitelio mamario. (C-D) Realizar el trasplante en la fracción de estroma libre de epitelio mamario. (E) Colocar la piel levantada en su sitio original. (B'-D') De igual forma proceder a realizar el trasplante en la mama izquierda del par 4. (F) Finalmente cerrar la incisión con ayuda de grapas.

Las glándulas mamarias trasplantadas se analizaron mediante tinción con Alumbre Carmín, utilizando una lupa de fluorescencia (Leica Microsystems), o bien mediante citometría de flujo. Para un análisis más detallado de las glándulas mamarias reconstituidas, se realizaron inmunohistoquímicas de secciones que fueron analizadas mediante microscopía confocal.

Cuando se trasplantaban células tumorales, se examinaba todas las semanas, mediante palpación, el par 4 mamario de las ratonas trasplantadas, determinando de esta forma la aparición de tumores.

### Trasplantes de suspensión celular

MaECs o MaTCs provenientes de digestiones de mamas o tumores mamarios respectivamente, se resuspendieron en medio de proliferación (Tabla I) 8:1 (v/v) GFR Matrigel™ (BD Biosciences), al que se le añadió Nigrosina 1:1000 (v/v). Tanto la jeringa Hamilton de 10µl, con la que se inyectan las células, como la suspensión celular, se mantuvieron en hielo para inhibir que el Matrigel™ se solidificara. Se inyectaron 5µl de suspensión celular en cada estroma mamario libre de epitelio, y el sitio de inyección se visualizó por la presencia de Nigrosina en la suspensión celular.

### Trasplantes con una fracción de tejido mamario

Una fracción de glándula mamaria adulta de alrededor de 1mm<sup>3</sup> de tamaño se introdujo en una cavidad a modo de bolsillo generado quirúrgicamente en el estroma mamario libre de epitelio de la hembra receptora.

### Trasplantes en hembras receptoras adultas

Para poder utilizar hembras adultas como receptoras de trasplantes de mama, se procedió a eliminarles el epitelio mamario del par 4 a las 3 semanas de edad, ya que para realizar los trasplantes se necesita un estroma con espacio para que se pueda llevar a cabo la elongación ductal, y una hembra adulta tiene ocupado todo el estroma mamario por epitelio. De ésta forma, al cumplir 8-10 semanas de edad, estas ratonas poseían estromas libres de epitelio y con espacio para la regeneración de la glándula mamaria, en los cuales se realizaron trasplantes de suspensión celular (descritos anteriormente).

### Trasplantes de una mamosfera o una tumorosfera

Se utilizó un microscopio con un objetivo 20x para localizar mamosferas o tumorosferas aisladas dentro un cultivo. Con una pipeta de 10µl, se extrajeron 5µl de medio del cultivo que contenía una única mamosfera o una única tumorosfera, y posteriormente se depositaron los 5µl en forma de gota en una placa pHEMA colocada sobre hielo. Tras comprobar que cada gota contenía una única mamosfera o una única tumorosfera, se añadió 1µl de GFR Matrigel™ (BD Biosciences) y Nigrosina (v/v) 1:1000 a cada gota, y con la ayuda de una jeringa Hamilton de 10µl, previamente enfriada, tomamos la gota y la inyectamos en el estroma mamario libre de epitelio de las hembras receptoras.

### Ovariectomías y castraciones

Se extirparon los ovarios en la hembra (ovariectomía) para bloquear la secreción de estrógenos. Una vez anestesiada (detallado en el apartado de trasplantes), se colocó en posición decúbito ventral, y con ayuda de pinzas y tijeras se le realizó una incisión

en la piel, y posteriormente en el mesotelio, de aproximadamente 1cm, en el cuadrante inferior del dorso al lado izquierdo. El ovario rodeado de grasa se extirpó de la cavidad peritoneal con la ayuda del cauterizador. De igual forma, se procedió a la extirpación del ovario derecho. Las incisiones realizadas en el mesotelio se cerraron mediante puntos de sutura, mientras que las realizadas en la piel se cerraron con grapas.

Se extirparon los testículos en el macho (castración) para disminuir los niveles de andrógenos. Una vez anestesiado, se colocó en decúbito dorsal. Con ayuda de pinzas y tijeras se le realizó una incisión en la piel y posteriormente en el mesotelio, de aproximadamente 1cm, en el centro del cuadrante inferior ventral. Los testículos se extrajeron de la cavidad peritoneal con la ayuda del cauterizador. Al igual que en las ovariectomías, las incisiones realizadas en el mesotelio se cerraron mediante puntos de sutura, mientras que las realizadas en la piel se cerraron con grapas.

### **Extracción de RNA de la glándula mamaria**

Para dejar el material que se iba a utilizar libre de ribonucleasas, las cuales degradan el RNA, se pre-trató con NaOH 0,1M en agua destilada durante 15 minutos, y posteriormente se lavó con agua destilada. Además, el manejo de los materiales siempre se realizó utilizando guantes.

Las glándulas mamarias extraídas de los animales fueron transferidas a nitrógeno líquido, y una vez congeladas, se introdujeron en tubos estériles que se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las mamas congeladas fueron pulverizadas mecánicamente y resuspendidas en solución D (3ml/mama) (Tabla VI) de forma homogénea mediante agitación. Posteriormente se añadieron 300 $\mu\text{l}$  de Acetato de Sodio 2M (Fluka), 3ml de Fenol saturado en agua, y 600 $\mu\text{l}$  de Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 (v/v) (Fluka). La muestra se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos con cierto grado de inclinación, y se centrifugó a 3.000 x g durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de la centrifugación, se aisló la fase acuosa que contenía el RNA, y éste se precipitó con 3ml de Isopropanol (Fluka) a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. A continuación, se centrifugó la muestra a 8.000 x g durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se resuspendió el precipitado en 600 $\mu\text{l}$  de la solución A (Tabla VI), con una posterior incubación a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos para digerir los restos de proteína de la muestra. El RNA se extrajo tomando la fase acuosa después de añadir Cloropán (Tris-Fenol:Cloroformo:alcohol isoamílico 24:24:1) (v/v). Para precipitar el RNA se añadió 1/10 v de Acetato de Sodio 3M, 2,5 v de ETOH, y 1 $\mu\text{l}$  de Glicógeno (Roche). Se incubó durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y después de una centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  se resuspendió el RNA (precipitado) en 20 $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ribonucleasas. La concentración del RNA se midió mediante el espectofotometría en un Nanodrop-2000 (Fisher Scientific), y las muestras de RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla VI. Composición de las soluciones necesarias para la extracción de RNA de tejido**

<b>Solución D</b>		
Componente	Concentración	Casa Comercial
Tiocianato de Guanidinio	50ml	Fluka
b-Mercaptoetanol	100mM	Fluka
<b>Solución A</b>		
Componente	Concentración	Casa Comercial
Tris 1M	50µl/ml	USB
EDTA 0,5M	20µl/ml	Sigma
SDS 20%	50µl/ml	Sigma
Proteinasa K	10µl/ml	Roche
H <sub>2</sub> O libre de ribonucleasas	-	-

### Retrotranscripción (RT)

Para la síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA) a partir de mRNA se utilizó el kit de RT (Roche). Se añadió 1µl de RNA en 12µl de la solución I (Tabla VII) y se procedió a la desnaturalización de la estructura secundaria mediante una incubación durante 10 minutos a 65°C. Posteriormente, la muestra se enfrió rápidamente en hielo, se le añadió 7µl de la solución II (Tabla VII), y se incubó a 25°C durante 10 minutos, permitiendo la unión del oligonucleótido al mRNA. Seguidamente se realizó una incubación a 50°C durante 1 hora para sintetizar el cDNA. La transcriptasa reversa se inactivó mediante una incubación a 85°C durante 5 minutos. Las muestras de cDNA se guardaron a -20°C.

**Tabla VII. Composición de la solución necesarias para la RT**

<b>Solución I</b>	
Componente	Volumen
H <sub>2</sub> O	10µl
Cebador hexámero arbitrario	2µl
<b>Solución II</b>	
Componente	Volumen
Tampón de reacción de la Transcriptasa Reversa (5X)	4µl
Inhibidor de RNasas (40U/µl)	0,5µl
Mezcla de Desoxinucleótidos (10mM)	2µl
Transcriptasa Reversa	0,5µl

## PCR-Cuantitativa (qPCR)

Para la amplificación y cuantificación del cDNA de interés, se utilizaron cebadores, directos e indirectos, y sondas fluorescentes, ambos específicos de secuencia (Tabla VIII). Se añadieron 19µl de la solución de qPCR (Tabla IX) a cada pocillo de una placa de 96, a los que posteriormente se les añadió un 1µl de cDNA.

**Tabla VIII. Cebadores y sondas utilizadas para la qPCR**

Cebadores y sondas			
mRNA	Cebador directo 5'-3'	Cebador inverso 5'-3'	Sonda (Roche)
Wap	GCCTCATGAGCCTTGTCTT	GGCTTTTGGGAACATGGAC	10
Stat5a	AAGATCAAGCTGGGGCACTA	CATGGGACAGCGGTCATAC	50
Elf5	TCTGGACCTAGCCACCACTT	AGGGGGTACAGAAGGATG	4
Sox2	TCCAAAACTAATCACAACAATGG	GAAGTGAATTGGGATGAAA	63
Notch1	ACTATCTCGGCGGCTTTTC	CTCCTCGGAGCAGTTAGACC	5
Gata3	TTATCAAGCCCAAGCGAAG	CATTAGGGTTCCTCCTCCAG	77
Csn	TCTGTCTAAGAGGATTTCCAGGTT	CATTTCCAGTTTCAGTCAGTTCA	63
Krt14	ATCGAGGACCTGAAGAGCAA	TCGATCTGCAGGAGGACA	83
Krt18	AGATGACACCAACATCACAAG	CTTCCAGACCTTGGACTTCCT	78
Pgr	CCCGCCATACCTTAACTACCT	TGAGGTAAGGAATCAAAGCCATA	20
Tlr3	GATACAGGGATTGCACCCATA	TCCCCAAAGGAGTACATTAGA	26
Stat5b	CGAGCTGGTCTTTCAAGTCA	CTGGCTGCCGTGAACAAT	77
Esr1	GTGCCGTGTGCAATGACTAT	TGCATTGGTTTGTAGCTGGA	106
Lgr5	CTTCACTCGGTGCAGTGCT	CAGCCAGCTACCAAATAGGTG	60
C-Myc	CCTAGTGCTGCATGAGGAGA	TCCACAGACACCACATCAATT	77
Numb2	AGGAAGACCGATTTCCCAAT	CAAGGAGCTGATGCTCTC	12
PKCιota	TGACTACGGCATGTCTAAGGA	CCGCAGAAAGTGCTGGTT	80
18S	CTCAACACGGGAAACCTCAC	CGCTCCACCAACTAAGAACG	55

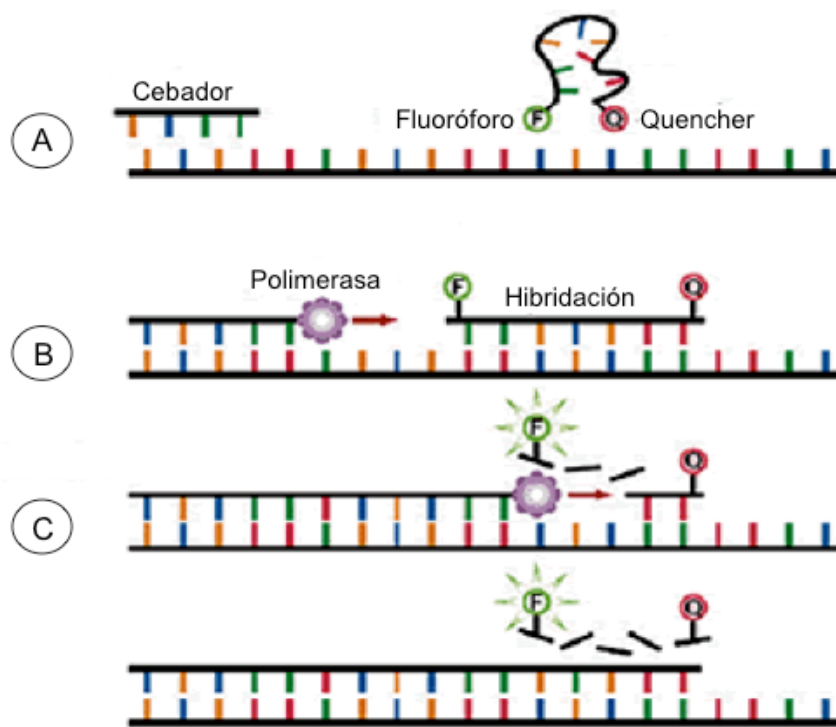
**Tabla IX. Composición de la solución necesaria para la qPCR**

Mezcla de qPCR			
Componente	Volumen	Concentración final	Casa Comercial
ADN polimerasa termoestable*	10µl	1x	Roche
Sonda de hidrólisis (25µM)	0,2µl	250nM	Roche
Cebador directo (90µM)	0,2µl	900nM	Fisher
Cebador reverso (90µM)	0,2µl	900nM	Fisher
H <sub>2</sub> O	8,4µl	-	-

\* +ROX 100µM (6µ por tubo de ADN polimerasa termoestable)

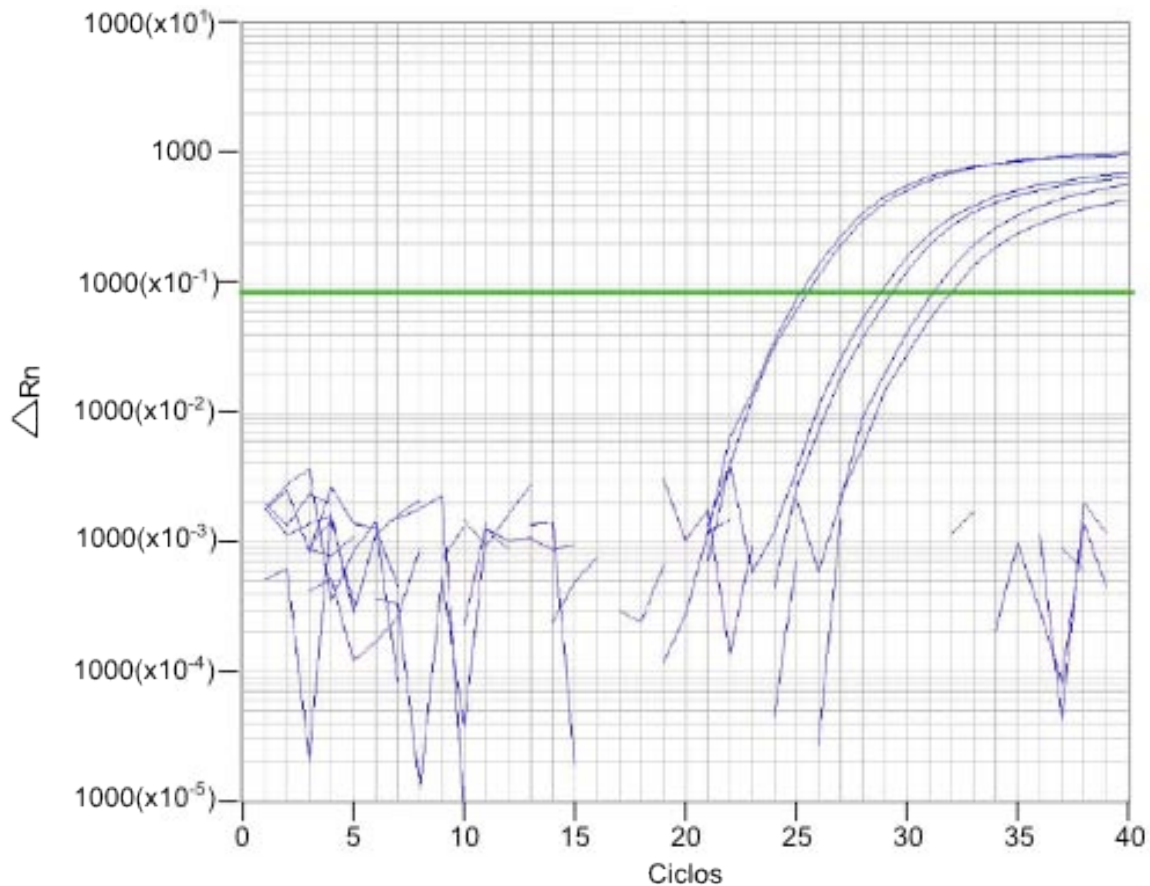
La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluoróforo excitado. Cuando se utilizan sondas específicas, la sonda suele estar unida a un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula

(denominada en inglés «quencher») en el 5' que bloquea la emisión de fluorescencia por el fluoróforo (Figura 24A). Esta sonda marcada híbrida específicamente en el amplicón (Figura 24B), pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia. De este modo, cuando se efectúa la PCR, la polimerasa se topa con la sonda y la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluorocromo, y por tanto, la emisión de fluorescencia (Figura 24C). Esto permite monitorizar un cambio del patrón de fluorescencia que sólo se produce si se amplifica la secuencia de ADN complementaria a la sonda específica. Con este abordaje se elimina cualquier posibilidad de amplificación inespecífica.



**Figura 24. Esquema de qPCR.** (A) Unión específica de los cebadores al DNA. Las sondas utilizadas tienen un fluoróforo unido al extremo 3' y un quencher en el 5' que bloquea la emisión de fluorescencia del fluoróforo. (B) La polimerasa comienza a sintetizar la cadena complementaria del cDNA. La sonda hibrida con el amplicón. (C) La polimerasa hidroliza la sonda al toparse con ella, lo que provoca la separación del fluoróforo del quencher, y por tanto la emisión de fluorescencia.

Los sistemas de PCR a tiempo real detectaron la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR, y el software análisis representó dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos (Figura 25). La cantidad de amplicón producido era proporcional al número de moléculas de RNA/DNA iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente apareció en ciclos anteriores.



**Figura 25.** Representación gráfica de la fluorescencia producida en cada ciclo de PCR respecto al número de ciclo.

La medida de la expresión génica por medio de RT-qPCR era una cuantificación relativa, en la que se comparó entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (RNA 18S). Es lo que se denomina normalización de la expresión del gen específico. El método de cuantificación que se empleó fue el del  $\Delta\Delta C_t$ , en el que se comparó directamente los  $C_t$ s (número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumentó con respecto al ruido de fondo) del gen testado y gen de referencia ( $\Delta C_t$ ) en cada muestra, y posteriormente se compararon los  $\Delta C_t$  de la muestras experimentales con respecto a la muestra control (Scheffe et al., 2006).

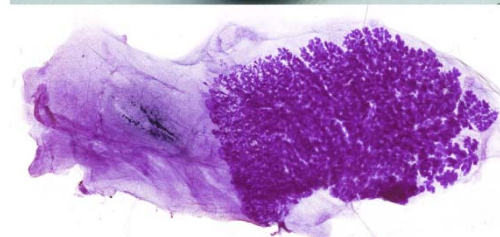
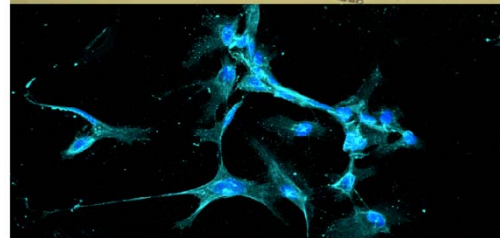
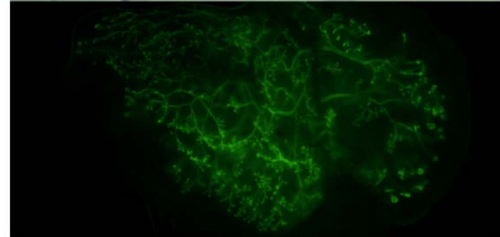
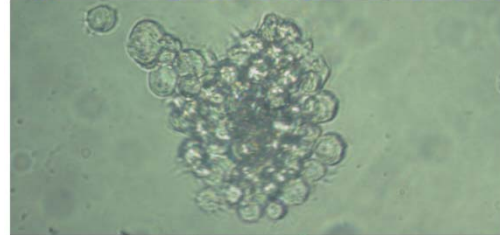
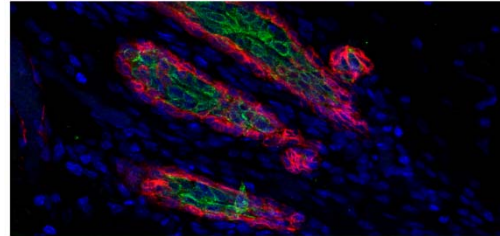
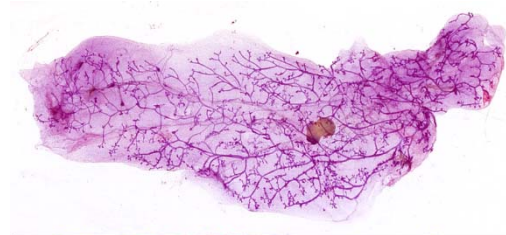
### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos y fueron analizados utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). El análisis estadístico se realizó usando el test de la t de Student, y se consideraron las diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

La frecuencia de células capaces de generar mamosferas o tumorosferas (determinada como media  $\pm$  desviación estándar) fue estimada interpolando la frecuencia de tener una célula precursora de media (F=0,37), representada en una gráfica semi-logarítmica que contiene en el eje x las células pocillo y en el eje y la frecuencia de cultivos negativos representada en una escala logarítmica. Este análisis se realizó usando las herramientas bioinformáticas del Walter & Eliza Hall Institute of Medical Research: <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/index.html> (Hu and Smyth, 2009). Además, estas mismas herramientas bioinformáticas fueron utilizadas para el análisis de los trasplantes mamarios realizados en hembras receptoras, en los que se utilizaron concentraciones celulares en dilución límite.

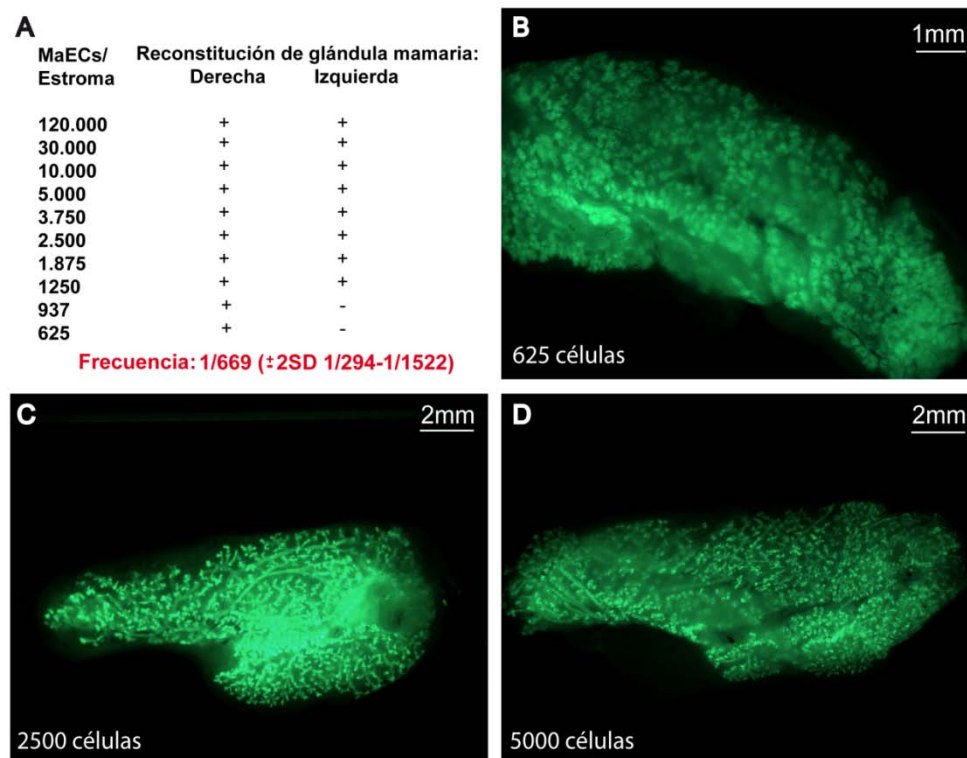


**RESULTADOS**



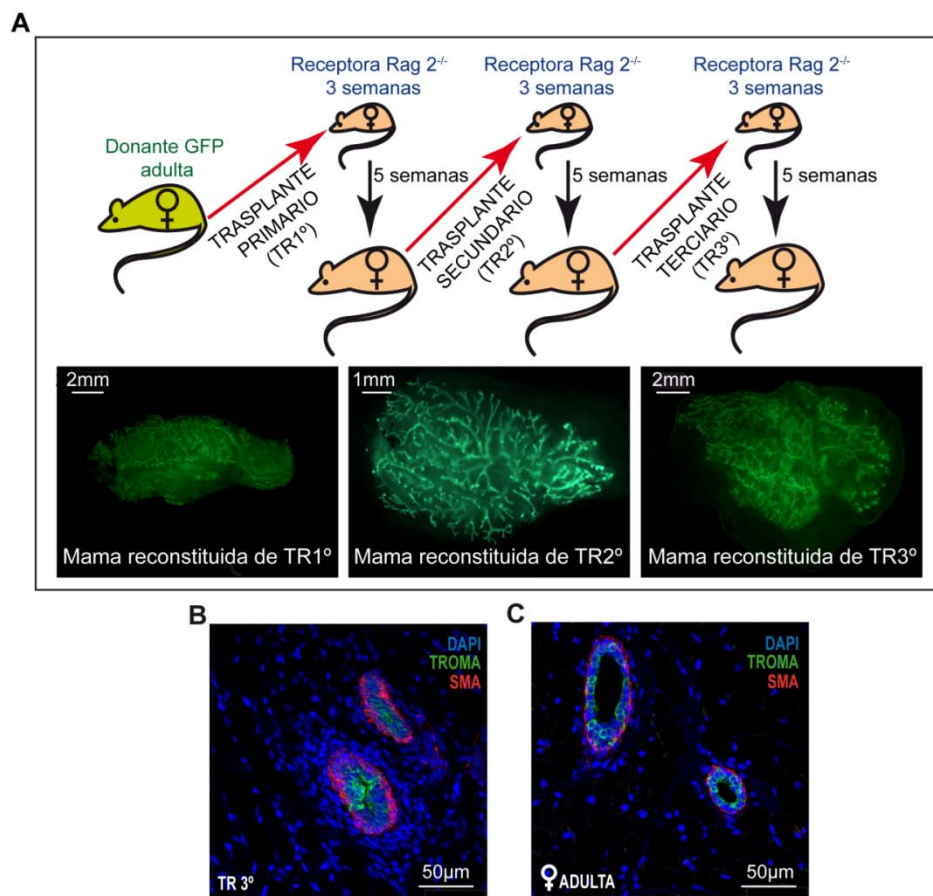
## Reconstitución de la glándula mamaria a partir de MaECs y MaSCs

La población de células madre de la glándula mamaria (MaSCs) se encuentra dentro de las células epiteliales mamarias (MaECs), y es la encargada de mantener la homeostasis del órgano. Cuando se realizan trasplantes mamarios, las MaSCs son las únicas células capaces de regenerar la glándula mamaria completa (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006). Con la finalidad de estimar la frecuencia de MaSCs dentro de las MaECs, realizamos trasplantes en los que introdujimos, en el par mamario abdominal de ratonas inmunodeficientes Rag2<sup>-/-</sup>, distintas concentraciones de MaECs (Figura 26A), aisladas de hembras GFP<sup>+/+</sup> adultas. Cinco semanas después del trasplante, las hembras receptoras se cruzaron, y en los últimos días de gestación analizamos las mamas trasplantadas (Figura 26A). Sólo se regeneró una glándula mamaria de los dos estromas trasplantados con 625 MaECs (Figura 26B), y lo mismo observamos cuando utilizamos 937 MaECs. Sin embargo, con las demás concentraciones se reconstituyeron las dos glándulas mamarias (Figura 26C-D). Con estos datos estimamos, mediante análisis de dilución límite, que 1 célula, de cada 669 células epiteliales mamarias (frecuencia 1/669 ±2SD 1/294-1/1522), era capaz de reconstituir una glándula mamaria completa (Figura 26A).



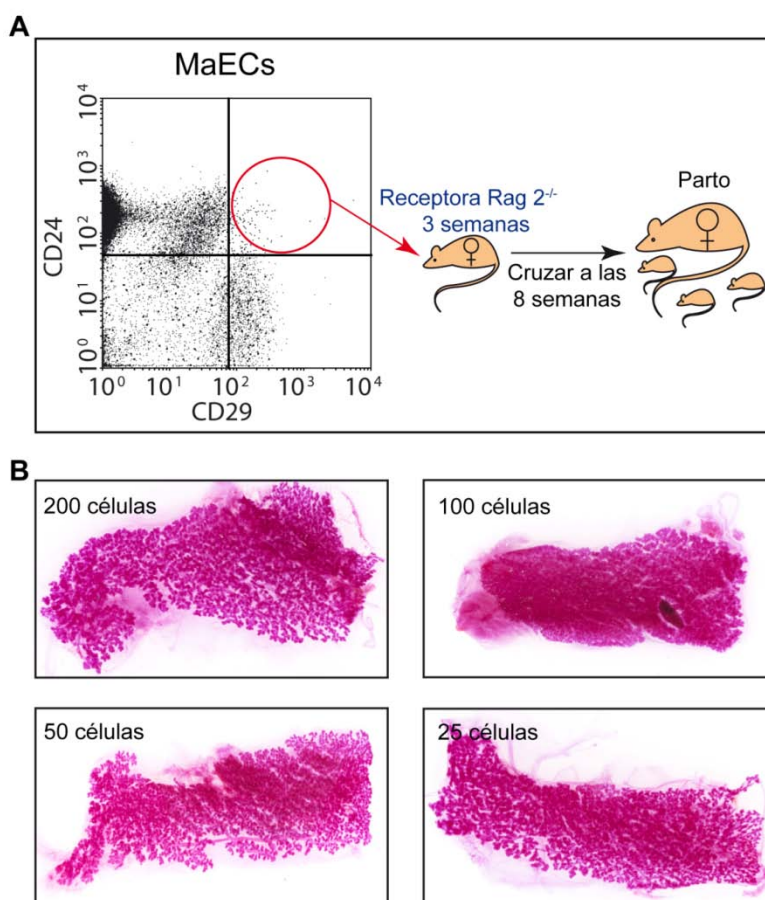
**Figura 26. Reconstitución de glándulas mamarias a partir de MaECs.** (A) Número de MaECs utilizadas en los trasplantes y glándulas mamarias regeneradas. Frecuencia de células dentro de las MaECs capaces de regenerar una glándula mamaria. Los datos se representaron como media ±2 desviaciones estándar, n=20.(B-D) Análisis de glándulas mamarias en los últimos días de gestación reconstituidas con 625, 2.500 y 5.000 MaECs respectivamente, mediante una lupa utilizando luz UV.

Además, realizamos trasplantes seriados (secundarios y terciarios) a partir de glándulas mamarias reconstituidas con MaECs de ratona GFP<sup>+/+</sup> adulta, observando reconstituciones de epitelio mamario en todos los trasplantes (Figura 27A). Estos datos, junto con análisis inmunohistoquímicos de glándulas mamarias reconstituidas en trasplantes terciarios, en las que se observaron ductos compuestos por células lumbinales y mioepiteliales (Figura 27B), similares a los presentes en las glándulas mamarias de las ratonas adultas (Figura 27C), permitieron demostrar que las células capaces de regenerar la glándula mamaria tenían capacidad de autorrenovación y de diferenciación, y que por tanto eran células madre mamarias (MaSCs).



**Figura 27. Capacidad de autorrenovación y diferenciación de las MaSCs.** (A) Reconstitución de glándulas mamarias mediante trasplantes seriados. Fracciones de glándulas mamarias reconstituidas a partir de MaECs de hembras adultas GFP<sup>+/+</sup> se trasplantaron (trasplantes secundarios) en estromas mamarios libres de epitelio de hembras receptoras prepúberes. A su vez, el epitelio mamario de mamas reconstituidas mediante trasplantes secundarios se utilizó para realizar nuevos trasplantes (trasplantes terciarios). Análisis de las glándulas mamarias mediante una lupa utilizando luz UV. (B) Análisis mediante inmunohistoquímica de secciones de tejido de una glándula mamaria reconstituida mediante trasplante terciario. Se utilizaron anticuerpos específicos frente a antígenos de núcleo (DAPI), de células lumbinales (TROMA-1), y de células mioepiteliales ( $\alpha$ -SMA), marcados fluorescentemente para su observación en un microscopio de confocal. (C) Análisis mediante inmunohistoquímica de secciones de tejido de una glándula mamaria de una hembra adulta.

Subsecuentemente, realizamos trasplantes utilizando como células donantes una población de las MaECs, en particular, células con el fenotipo CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup>, enriquecidas en MaSCs (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006). Aislamos las células mediante citometría de flujo de una suspensión de MaECs de hembras C57Bl/6 adultas, e inyectamos distintas concentraciones de estas células en el estroma des-epitelializado de hembras Rag2<sup>-/-</sup> (Figura 28A). Después de 8 semanas, las hembras receptoras se cruzaron, y analizamos las mamas trasplantadas justo después del parto mediante tinción con Alumbre Carmín (Figura 28A-B). Observamos reconstitución del epitelio mamario en las glándulas mamarias trasplantadas con 200, 100, 50 y 25 células (Figura 28B), sin embargo, no detectamos reconstitución en la glándula mamaria trasplantada con 12 células. Estos datos permitieron estimar que 1 de cada 18,5 células (frecuencia 1/18,5 ± 2SD 1/4,6-1/79) de la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> era capaz de reconstituir una glándula mamaria, generando estructuras alveolares durante la gestación. Por tanto, la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> estaba enriquecida al menos 36 veces en MaSCs en comparación con las MaECs.

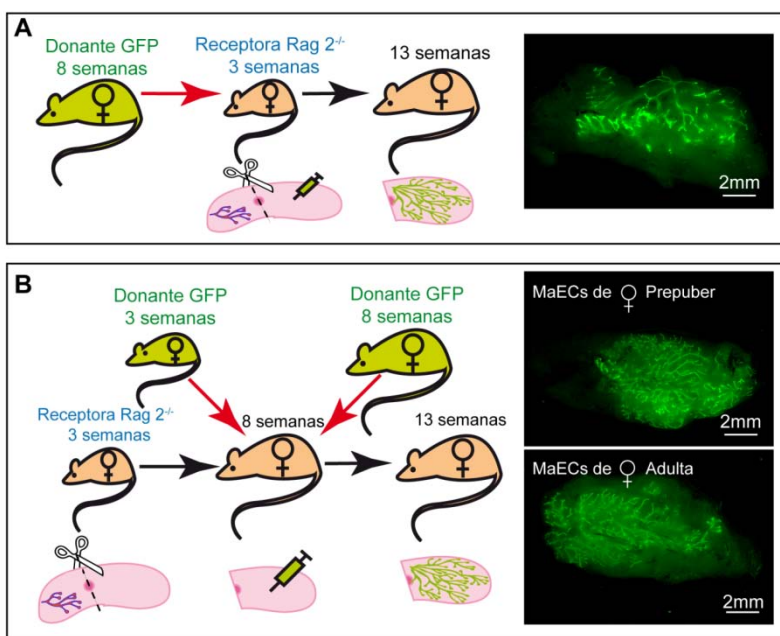


**Figura 28. Reconstitución de glándulas mamarias a partir de la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> (MaSCs).** (A) Se realizaron trasplantes mamarios con distintas concentraciones de la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> de las MaECs, y las hembras receptoras se cruzaron cuando alcanzaron la madurez sexual. (B) Las glándulas mamarias trasplantadas se analizaron después del parto, mediante tinción con Alumbre Carmín.

## Reconstitución de la glándula mamaria en una ratona adulta

Los trasplantes de glándula mamaria, en general, se realizaron en estromas libres de epitelio de hembras receptoras prepúberes, aprovechando así; el pico de estrógeno que se secreta durante la pubertad en las hembras receptoras, implicado en la elongación ductal (Daniel et al., 1987; Williams and Daniel, 1983), y el espacio en el estroma mamario (Figura 29A). Las ratonas adultas tienen todo el estroma mamario relleno de ductos, y aunque durante las etapas proestro y estro del ciclo estral los ovarios también secreten estrógeno, éste no está implicado en la elongación ductal.

Realizamos trasplantes de mama, utilizando como células donantes MaECs de hembras prepúberes y adultas GFP<sup>+/+</sup>, en hembras adultas Rag2<sup>-/-</sup> (Figura 29B). Para poder utilizar estas hembras como receptoras, se les eliminó el epitelio mamario del par 4 a las 3 semanas de edad. De esta forma, al cumplir 8 semanas de edad (fin de la pubertad), e iniciarse los primeros ciclos estrales, estas ratonas poseían estromas libres de epitelio y espacio para la regeneración de la glándula mamaria. Analizamos las mamas trasplantadas a las 5 semanas del trasplante, observando reconstituciones completas del epitelio mamario, tanto en las mamas trasplantadas con MaECs de ratonas prepúberes, como en las mamas trasplantadas con MaECs de ratonas adultas (Figura 29B). Estos resultados indicaron que el estrógeno liberado durante los sucesivos ciclos estrales era suficiente para la reconstitución de la glándula mamaria, con la consiguiente elongación ductal, independientemente de que las células trasplantadas hubieran estado anteriormente expuestas al estrógeno (donantes adultas) o no (donantes prepúberes).

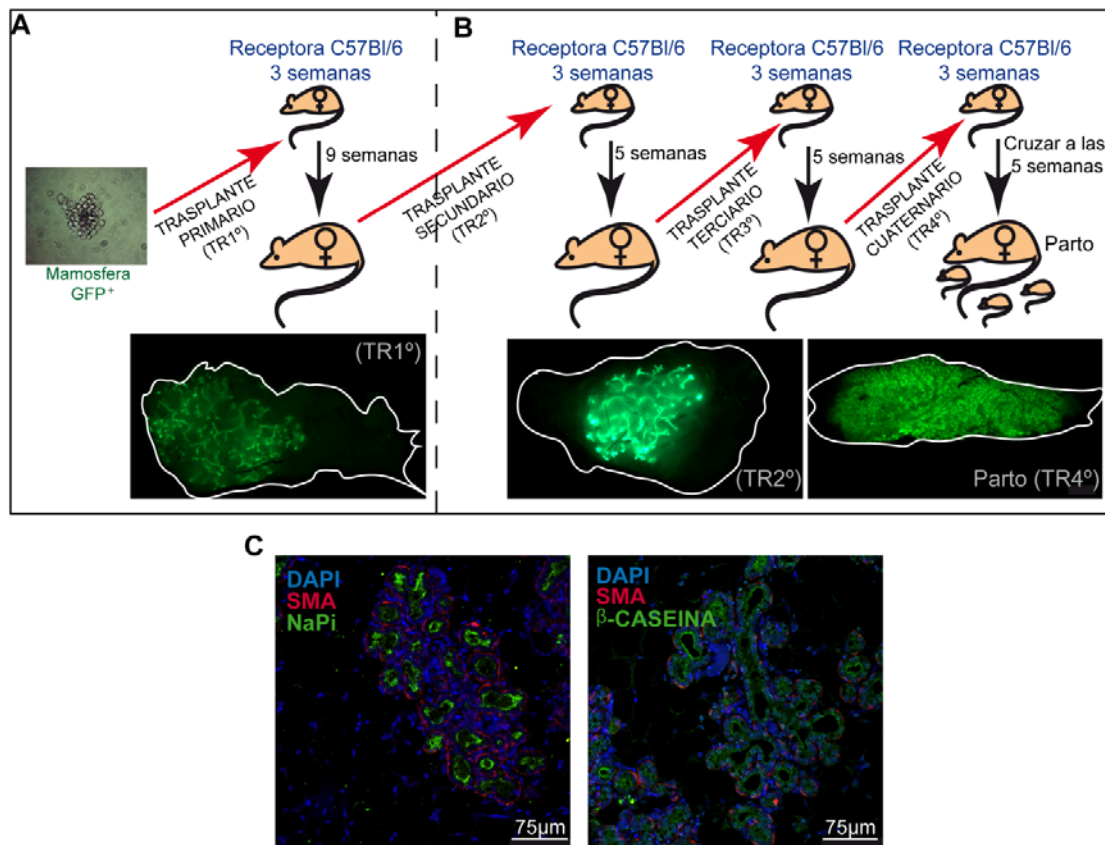


**Figura 29. Hembras receptoras prepúberes y adultas son capaces de reconstituir glándulas mamarias.** (A) Trasplante de MaECs de hembra adulta GFP<sup>+/+</sup> en una hembra receptora prepúber. Una vez transcurridas 5 semanas desde el trasplante se analizaron las mamas trasplantadas mediante una lupa utilizando luz UV. (B) Trasplante de MaECs de hembras prepúberes y adultas GFP<sup>+/+</sup> en hembras receptoras adultas, a las cuales se había eliminado el epitelio mamario a las 3 semanas de edad. Una vez transcurridas 5 semanas desde el trasplante se analizaron las mamas trasplantadas mediante una lupa utilizando luz UV.

## Una única mamosfera es capaz de reconstituir una glándula mamaria funcional

Las células madre y progenitores tempranos de la glándula mamaria pueden mantenerse *in vitro* de manera indiferenciada creciendo como mamosferas. Además, las mamosferas se pueden obtener en condiciones en las que cada una tenga un origen clonal (Dontu et al., 2003). Asimismo, en nuestro laboratorio se demostró que sólo la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> era capaz de generar mamosferas, y que en cada mamosfera había una única célula capaz de generar nuevas mamosferas (Diaz-Guerra et al., 2012). En este contexto, nos planteamos demostrar si las células capaces de generar mamosferas *in vitro* eran *bona-fide* MaSCs. Para ello obtuvimos mamosferas a partir del cultivo de MaECs de una hembra adulta GFP<sup>+/+</sup>, y inyectamos una mamosfera micromanipulada por estroma mamario abdominal de hembras singénicas. Analizamos las glándulas mamarias trasplantadas cuando las hembras receptoras fueron adultas, y observamos reconstituciones en 2 de los 40 estromas que fueron trasplantados (frecuencia 1/20  $\pm$ 2SD 1/78,5-1/5,39), demostrando que una única mamosfera era capaz de reconstituir una glándula mamaria (Figura 30A).

Además, realizamos trasplantes seriados (secundarios, terciarios y cuaternarios) a partir de glándulas mamarias reconstituidas con una mamosfera, y un grupo de ratonas con trasplantes cuaternarios se cruzó (Figura 30B). Observamos reconstituciones en todos los trasplantes, y en las glándulas mamarias analizadas tras el parto pudimos percibir estructuras alveolares bien definidas (Figura 30B). El análisis mediante inmunohistoquímica de las glándulas mamarias lactantes reconstituidas en trasplantes cuaternarios demostraron que los alveolos mamarios estaban compuestos por células mioepiteliales y células que expresaban el marcador alveolar NaPi, y que en ellos había expresión de la proteína de la leche  $\beta$ -caseína, siendo similares a los alveolos observados en una hembra adulta tras el parto (Figura 30C). Estos datos permitieron demostrar que la mamosfera verdaderamente contenía una célula madre con propiedades de autorrenovación y con capacidad de diferenciación a todos los tipos celulares que componen el tejido mamario.



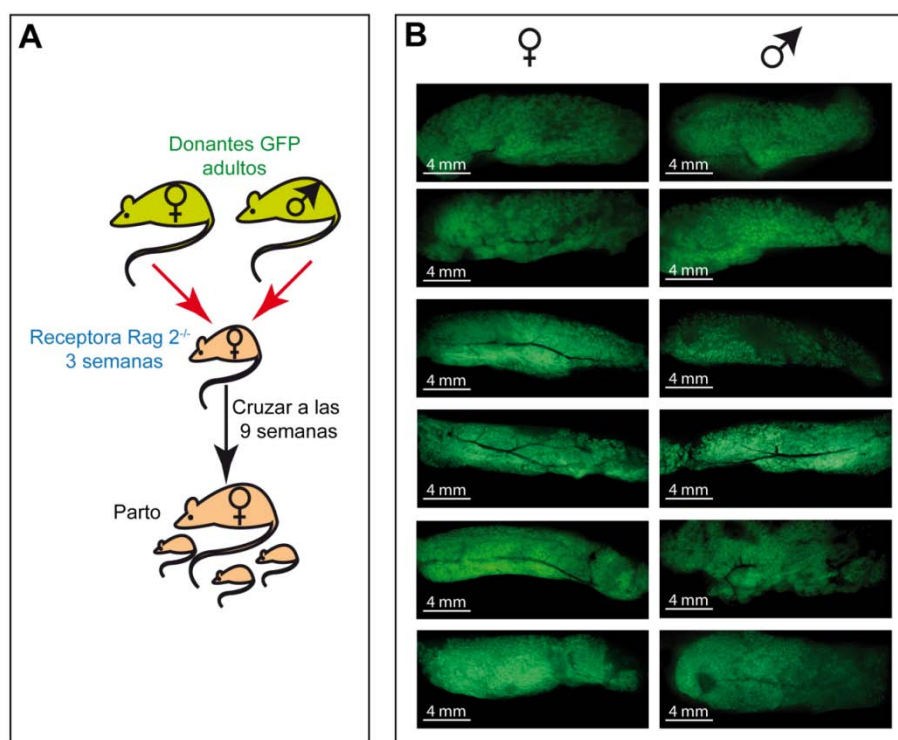
**Figura 30. La mamosfera contiene una MaSC con capacidad de autorrenovación y diferenciación.** (A) Una sola mamosfera micromanipulada a partir de un cultivo *in vitro*, e inyectada en un estroma mamario libre de epitelio de hembra receptora prepúber, es capaz regenerar un epitelio mamario completo. El análisis de las glándulas mamarias trasplantadas se realizó cuando las hembras receptoras fueron adultas, mediante una lupa utilizando luz UV. (B) Reconstitución de glándulas mamarias mediante trasplantes seriados. Las glándulas mamarias trasplantadas fueron analizadas mediante una lupa utilizando luz UV. No se muestra la reconstitución del trasplante terciario. (C) Análisis mediante inmunohistoquímica de secciones de tejido de una glándula mamaria reconstituida del trasplante cuaternario, tras el parto de la hembra receptora. Se utilizaron anticuerpos específicos frente a antígenos de células alveolares (NaPi y  $\beta$ -Caseína) marcados fluorescentemente, y las muestras se analizaron en un microscopio de confocal.

### Los machos contienen una población de MaSC capaz de regenerar una glándula mamaria

El hecho de que las MaECs de macho fueran capaces de generar mamosferas *in vitro*, similares a las derivadas de MaECs de hembra (Diaz-Guerra et al., 2012), sugirió que los machos también contenían una población de MaSCs. Para intentar demostrar que el epitelio mamario de los machos poseía MaSCs realizamos trasplantes utilizando como células donantes MaECs de macho GFP<sup>+/+</sup>, y como receptores de los trasplantes hembras Rag2<sup>-/-</sup> (Figura 30A), ya que éstas son inmunodeficientes, excluyendo por tanto cualquier posible rechazo debido a la posible expresión del antígeno H-Y

(antígeno menor de histocompatibilidad) en las células de macho. Este antígeno se había identificado en linfocitos T, ya que daba lugar al rechazo inmunológico de células de macho trasplantadas en hembra, pero se desconocía su expresión en las células de macho de la glándula mamaria.

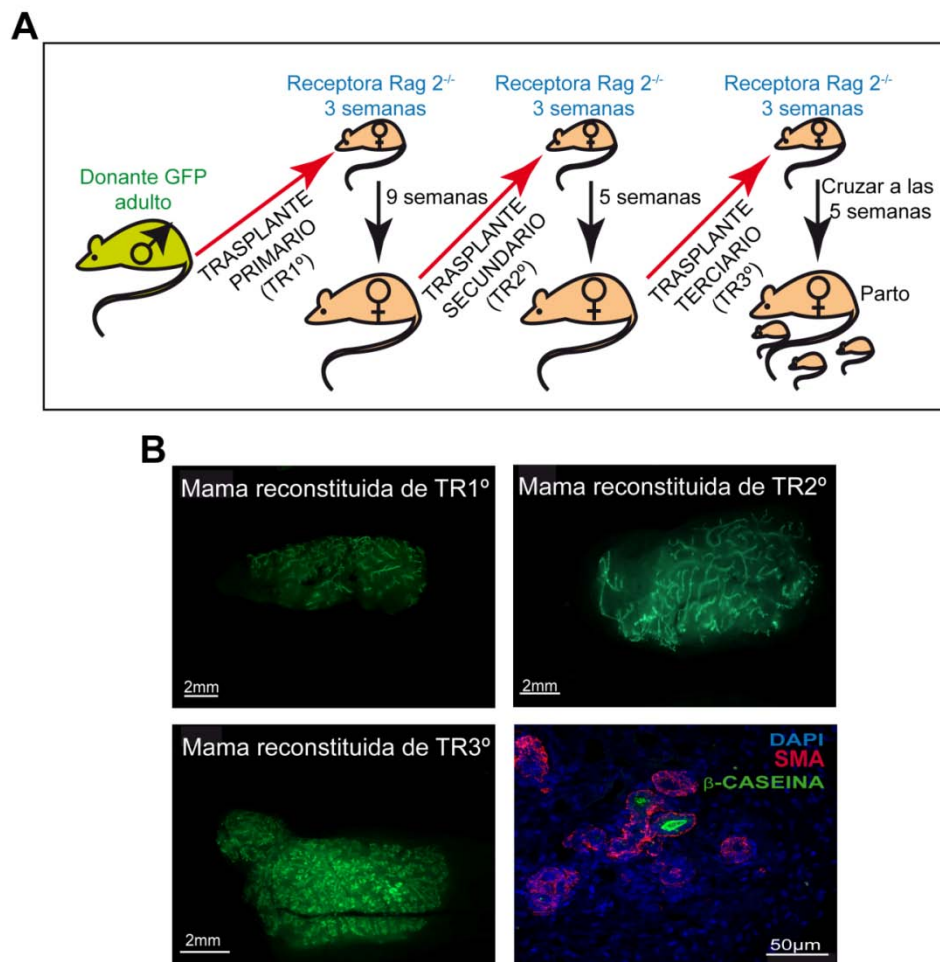
Asimismo, también trasplantamos MaECs de hembra como control (Figura 30A). Las hembras receptoras se cruzaron cuando fueron adultas, y analizamos las mamas trasplantadas después del parto, observándose reconstituciones de epitelio mamario en las mamas donde se inyectaron células de macho, así como en los controles inyectados con células de hembra (Figura 31). Las glándulas mamarias reconstituidas con MaECs procedentes de machos presentaban estructuras alveolares similares a las reconstituidas con células control (Figura 31B).



**Figura 31. Reconstitución de glándulas mamarias en hembras receptoras a partir de trasplantes con MaECs GFP<sup>+</sup> de macho y de hembra.** (A) Las hembras receptoras, en las que se trasplantaron MaECs de macho en uno de los 2 estromas mamarios abdominales, y MaECs de hembra en el otro, se cruzaron cuando fueron adultas, y tras el parto, (B) las glándulas mamarias trasplantadas fueron analizadas mediante una lupa utilizando luz UV.

Posteriormente, realizamos trasplantes seriados (secundarios y terciarios) a partir de glándulas mamarias reconstituidas con MaECs de macho, y un grupo de ratonas con trasplantes terciarios se cruzó (Figura 32A). Observamos reconstituciones en todos los trasplantes, y mediante análisis inmunohistoquímico analizamos que en los alvéolos de glándulas mamarias lactantes, reconstituidas en trasplantes terciarios, había expresión de la proteína de la leche  $\beta$ -caseína (Figura 32B). Estos datos permitieron demostrar que las MaECs de macho contenían una población de MaSCs

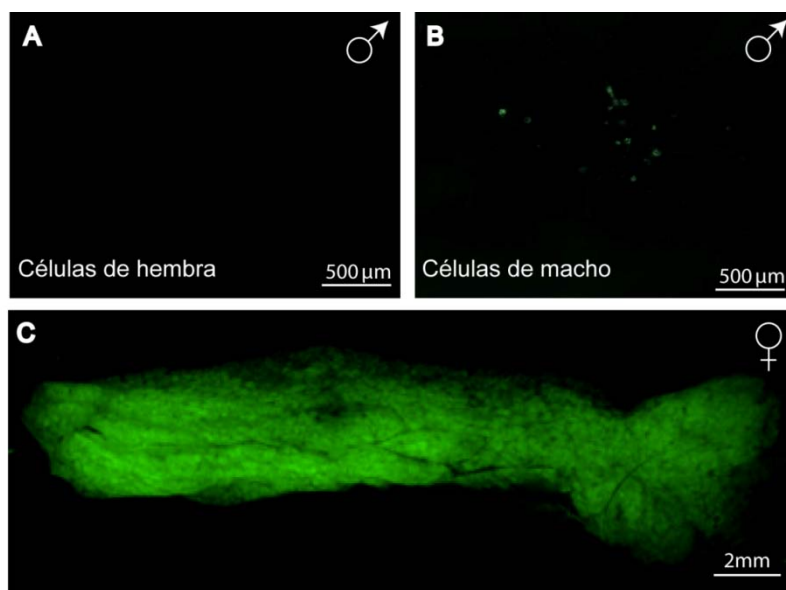
con capacidad de autorrenovación y diferenciación a todos los tipos celulares que componen el tejido.



**Figura 32. Las MaECs de macho contienen una población de MaSCs con capacidad de autorrenovación y diferenciación.** (A) Reconstitución de glándulas mamarias, utilizando MaECs de macho GFP<sup>+/+</sup>, mediante trasplantes seriados. (B) Las glándulas mamarias trasplantadas fueron analizadas mediante una lupa utilizando luz UV. Análisis mediante inmunohistoquímica de secciones de tejido de glándula mamaria, reconstituida mediante trasplante terciario, de hembra receptora tras el parto. Se detectó la expresión de marcadores luminales (SMA) y de marcadores alveolares (proteína de la leche β-Caseína).

Por otra parte, en experimentos donde trasplantamos MaECs de macho o de hembra en estromas mamarios de macho, no detectamos reconstituciones del epitelio mamario (Figura 33A-B), ya que los machos no tienen las señales hormonales adecuadas para la elongación ductal. Sin embargo, en algunos casos, en el estroma de los machos receptores que carecían de estructuras ductales, detectamos la presencia de células GFP<sup>+</sup> (Figura 33B). Recuperamos dichas células y las re-trasplantamos en hembras receptoras Rag2<sup>-/-</sup>. Cuando las hembras receptoras fueron adultas se cruzaron, y analizamos las mamas trasplantadas posterior al parto. Observamos glándulas mamarias con ramificaciones y estructuras alveolares bien definidas

(Figura 33C), demostrando que aunque las MaECs no fueran capaces de reconstituir una glándula mamaria de macho, sí contenían MaSCs que se mantuvieron vivas en la glándula mamaria de macho y que fueron capaces de reconstituir una glándula mamaria en el subsecuente trasplante en hembras, cuando poseían contexto hormonal apropiado.

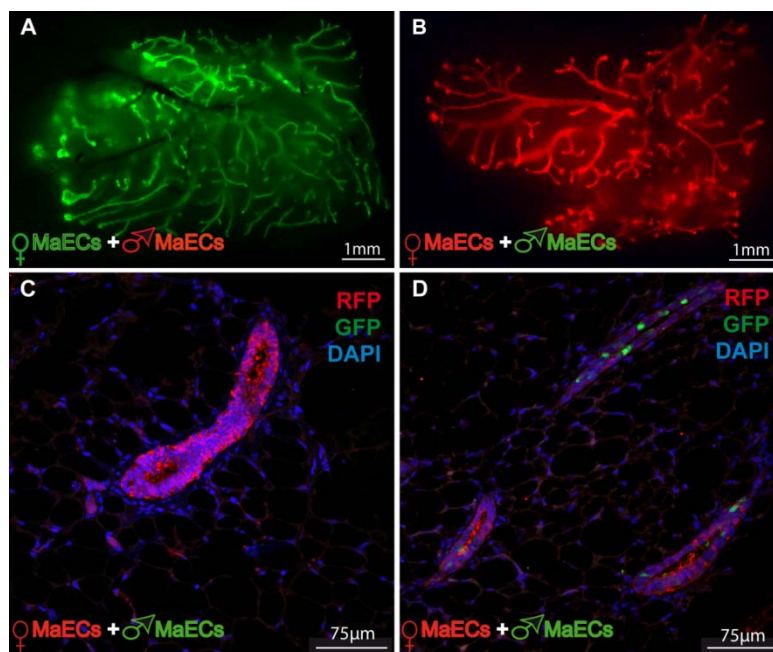


**Figura 33. Los receptores macho no son capaces de reconstituir una glándula mamaria. Análisis mediante una lupa utilizando luz UV de las mamas de macho (A) trasplantadas con MaECs de hembra GFP<sup>+/+</sup>, (B) y trasplantadas con MaECs de macho GFP<sup>+/+</sup>. (C) Reconstitución de glándula mamaria de hembra a partir del re-trasplante de células GFP<sup>+</sup> localizadas en macho.**

### **Análisis de las MaSCs más aptas para regenerar una glándula mamaria**

Debido a que los machos contienen una población de MaSCs que en un contexto hormonal de hembra son capaces de reconstituir una glándula mamaria funcional, y por tanto tienen las mismas características que las MaSCs de hembra, evaluamos si había diferencias en su eficacia para regenerar una glándula mamaria, en comparación con las MaSCs de hembra. Para ello realizamos trasplantes en hembras Rag2<sup>-/-</sup>, utilizando como células donantes una mezcla de 5.000 MaECs de hembra GFP<sup>+/+</sup> y 5.000 MaECs de macho RFP<sup>+/-</sup>, ambos adultos. Analizamos las mamas trasplantadas en la lupa cuando las hembras receptoras fueron adultas, y observamos únicamente reconstituciones con células de hembra (GFP<sup>+</sup>) (Figura 34A). Para descartar la posibilidad de que las MaSCs GFP<sup>+</sup> fueran más eficientes que las RFP<sup>+</sup>, realizamos trasplantes utilizando células de macho GFP<sup>+/+</sup>, y de hembra RFP<sup>+/-</sup>. Además aumentamos 3 veces el número de células de macho. Analizamos las mamas trasplantadas en la lupa cuando las hembras receptoras fueron adultas, y observamos únicamente reconstituciones con células de hembra (RFP<sup>+</sup>) (Figura 34B). Estos datos

fueron confirmados mediante análisis inmunohistoquímicos de cortes de dichas mamas, observando que la mayoría de las células que componían los ductos procedían de la hembra donante (RFP<sup>+</sup>) (Figura 34C), aunque se detectó, en un bajo porcentaje, células de macho (GFP<sup>+</sup>) (Figura 34D), determinándose que las MaSCs de la hembra reconstituían la mayor parte de la glándula mamaria. Además, se demostró que ni la expresión de la proteína RFP ó GFP en las MaECs, ni un mayor número de MaECs, determinaban la regeneración de la glándula mamaria.



**Figura 34. Las MaSCs de hembra son más aptas que las de macho a la hora de regenerar una glándula mamaria.** Análisis mediante una lupa utilizando luz UV de glándulas mamarias adultas trasplantadas (A) con una mezcla de 5.000 MaECs de hembra GFP<sup>+/+</sup> y 5.000 MaECs de macho RFP<sup>+/-</sup>, y (B) con una mezcla de 5.000 MaECs hembra RFP<sup>+/-</sup> y 15.000 MaECs de macho GFP<sup>+/+</sup>. (C y D) Análisis mediante inmunohistoquímica de secciones de tejido de una glándula mamaria reconstituida con una mezcla de 5.000 MaECs hembra RFP<sup>+/-</sup> y 15.000 MaECs de macho GFP<sup>+/+</sup>. Se utilizaron anticuerpos específicos de GFP y RFP marcados con fluorescencia, y la detección se realizó utilizando un microscopio de confocal.

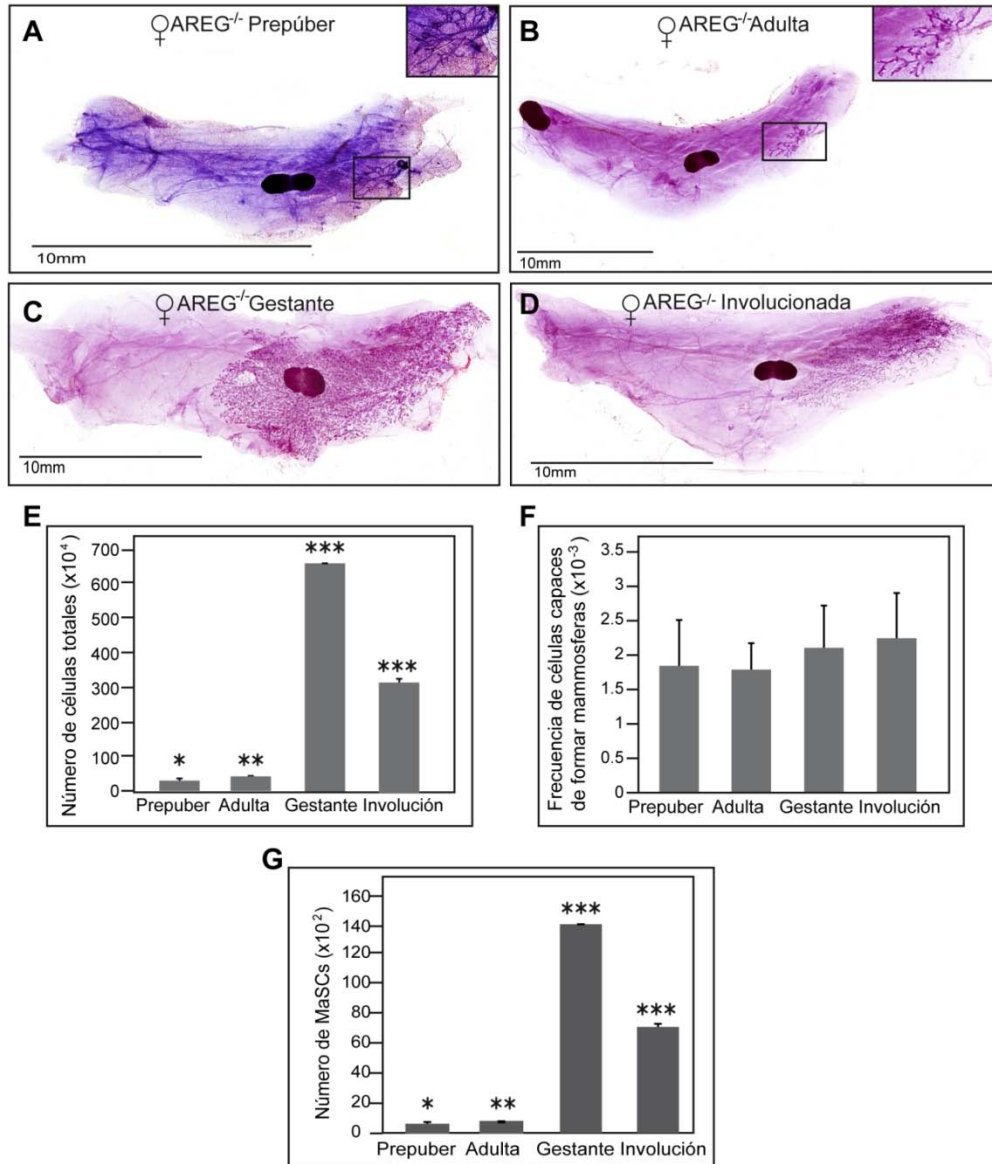
### Papel de las hormonas sexuales en la expansión de las MaSCs

Los cambios que sufre la glándula mamaria durante su desarrollo están asociados a señales hormonales, las cuales actúan de forma paracrina en las MaSCs (Briskin and O'Malley, 2010). Asimismo, en nuestro laboratorio se demostró que durante la pubertad, donde predominantemente actúa el estrógeno, había una expansión de las MaSCs de 20 veces, y que la expansión estaba correlacionada con los cambios morfológicos del epitelio mamario y con la celularidad total del órgano (Diaz-Guerra et al., 2012).

Realizamos estudios, antes y después de la pubertad, en ratonas AREG<sup>-/-</sup>, las cuales presentan una deficiencia en la síntesis del factor de crecimiento anfirregulina, que está implicado en la ruta de señalización del estrógeno. De esta forma, las ratonas AREG<sup>-/-</sup>, al tener bloqueada la ruta de señalización del estrógeno, muestran deficiencias en la elongación de los ductos mamarios durante la pubertad (Ciarloni et al., 2007). No observamos diferencias entre el tamaño del epitelio mamario de una glándula mamaria de una hembra prepúber (Figura 35A), y el de una hembra adulta de 11 semanas (Figura 35B), ni detectamos diferencias significativas en la celularidad en dichas mamas, ya que el número medio de MaECs era de 340.000 en ratonas prepúberes, y de 400.000 en ratonas adultas (Figura 35E). Tampoco encontramos ninguna diferencia significativa en las frecuencias de células capaces de generar mamosferas, siendo la frecuencia en hembras prepúberes, de una célula por cada 546 células (frecuencia  $1/546 \pm 2SD$  1/448-1/667), y en hembras adultas de una por cada 564 células (frecuencia  $1/564 \pm 2SD$  1/462-1/688) (Figura 35F). Además, estimamos el número de MaSCs, multiplicando la celularidad total por la frecuencia de células capaces de generar mamosferas, habiendo 623 MaSCs en las hembras prepúberes y 709 en las adultas (Figura 35G). Todos estos datos corroboraron que realmente el estrógeno era el encargado de la expansión de las MaSCs en la glándula mamaria durante la pubertad.

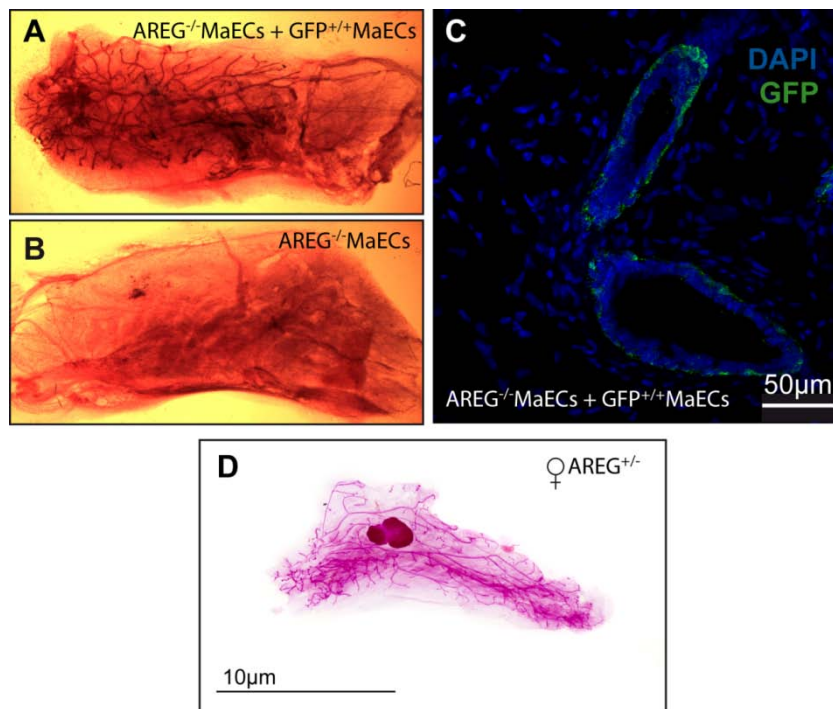
Por otra parte, también cuantificamos el número de MaSCs que poseían las ratonas AREG<sup>-/-</sup> al final de la gestación y tras la involución. Los cambios que ocurrían durante la gestación se veían reflejados tanto en el tamaño del epitelio mamario (Figura 35C), como en su celularidad total (Figura 35E), que aumentaban respecto a una hembra adulta AREG<sup>-/-</sup>, pero no en la frecuencia de células capaces de generar mamosferas (Figura 35F). Asimismo, existía un aumento de 18,8 veces en el número de MaSCs de las hembras al final de la gestación (Figura 35G). Estos datos indicaron que las hormonas liberadas durante la gestación, independientemente de que no hubiera habido elongación ductal en la mama, estaban implicadas en la ramificación de los ductos y en la formación de estructuras alveolares, y todo ello acompañado de la expansión de las MaSCs.

Sin embargo, cuando analizamos las mamas después de la involución, observamos que no existía; ni la regresión completa del órgano (Figura 35D), ni la reducción total de las MaSCs expandidas durante la gestación (Figura 35G), a diferencia de las glándulas mamarias involucionadas de hembras silvestres, que presentan una estructura epitelial mamaria y un número de MaSCs similar a las hembras adultas (Asselin-Labat et al., 2010; Diaz-Guerra et al., 2012). Existía un aumento de 9,5 veces en el número de MaSCs de las hembras involucionadas con respecto a las presentes en hembras adultas (Figura 35G). Por el contrario, en las sucesivas gestaciones la expansión de las MaSCs sólo era de 2 veces, y las MaSCs expandidas se retraían completamente (2 veces) con la involución.



**Figura 35. Expansión de las MaSCs en hembras AREG<sup>-/-</sup>.** (A-D) Tinción con Alumbre Carmín. Análisis de la estructura de la glándula mamaria de ratonas AREG<sup>-/-</sup> durante su desarrollo posnatal y gestación. Los detalles muestran el epitelio mamario dentro del estroma. (E) Número total de células epiteliales de la glándula mamaria. (F) Frecuencia de células capaces de formar mamosferas (frecuencia de MaSCs). (G) Estimación del número de MaSCs durante el desarrollo posnatal y gestación de hembras AREG<sup>-/-</sup>. Los datos en E, F y G se representaron como media  $\pm 2$  desviaciones estándar, n=3. \* Todas las comparaciones, excepto con las hembras adultas vírgenes, eran estadísticamente significativas (p<0,05), \*\*todas las comparaciones, excepto con las hembras prepúberes, eran estadísticamente significativas (p<0,05), \*\*\* todas las comparaciones eran estadísticamente significativas (p<0,05).

Mientras que en las hembras  $AREG^{-/-}$ , a pesar de haber síntesis de estrógeno durante la pubertad, no observamos elongación ductal, en las glándulas mamarias de ratonas adultas que habían sido trasplantadas a las 3 semanas de edad con una mezcla de MaECs de ratona  $AREG^{-/-}$  y MaECs de ratona  $GFP^{+/+}$ , si observamos la elongación de los ductos durante la pubertad (Figura 36A), y con ello la expansión de las MaSCs. Además, los ductos estaban compuestos por células  $AREG^{-/-}$  y células  $GFP^{+}$  (Figura 36C). Sin embargo, no observamos reconstitución de las glándulas mamarias trasplantadas sólo con MaECs de hembra  $AREG^{-/-}$  (Figura 36B). Demostramos así, que el bloqueo en la expansión de las MaSCs debido a la ausencia de anfirregulina se podía contrarrestar mediante la anfirregulina secretada por las células  $GFP^{+}$  en respuesta al estrógeno sintetizado durante la pubertad. La anfirregulina actuaría tanto en las MaSCs  $GFP^{+}$  como en las  $AREG^{-/-}$ , permitiendo la expansión necesaria para regenerar la glándula mamaria. Igualmente, las hembras  $AREG^{+/-}$ , que sintetizaban la mitad de cantidad de anfirregulina, presentaban un desarrollo de la glándula mamaria similar al de las hembras silvestres (Figura 36D).



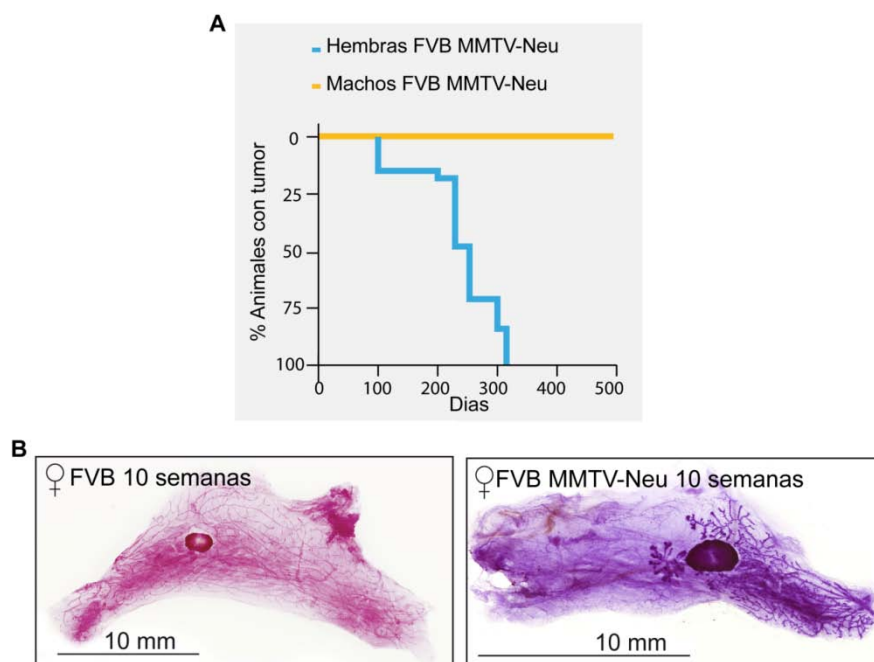
**Figura 36. Importancia de la anfirregulina en la elongación ductal.** Tinción con Alumbre Carmín. Análisis de la estructura de la glándula mamaria de ratona adulta; (A) trasplantada con mezcla de MaECs de hembra  $AREG^{-/-}$  y  $GFP^{+}$ , (B) trasplantada con MaECs de hembra  $AREG^{-/-}$ . (C) Análisis mediante inmunohistoquímica de secciones de tejido de la glándula mamaria que se muestra en A. Se utilizó el anticuerpo específico de GFP marcado fluorescentemente, y la detección se realizó utilizando un microscopio de confocal. (D) Tinción con Alumbre Carmín. Análisis de la estructura de la glándula mamaria de ratona con genotipo  $AREG^{+/-}$ .

## Papel de las hormonas sexuales en la aparición de tumores

Hipotetizamos que la expansión de las MaSCs durante la pubertad podría tener un efecto en el desarrollo de tumores, y para demostrarlo analizamos la presencia de tumores en ratonas MMTV-Neu en las que habíamos modulado (disminuyendo o aumentando) la expansión de las MaSCs.

Utilizamos el modelo de ratón transgénico MMTV-Neu, en el que la expresión del oncogén Neu (receptor ErbB2) se encuentra bajo la regulación transcripcional del LTR del virus del tumor mamario del ratón (MMTV), que actúa específicamente en las células de la glándula mamaria. Además, la progresión del tumor depende de mutaciones somáticas en el receptor, las cuales promueven su activación (Bouchard et al., 1989; Guy et al., 1992; Muller et al., 1988; Siegel et al., 1999).

En dicho modelo, sólo las hembras desarrollan tumores mamarios, y lo hacen, normalmente, entre los 7 y 10 meses de edad (Figura 37A). Sin embargo, los machos, a pesar de expresar el transgén, no desarrollan tumores mamarios (Figura 37A). Además, las hembras MMTV-Neu tienen glándulas mamarias con ductos muy ramificados, los cuales presentan un retardo temporal en el relleno completo del estroma con respecto a los ductos de glándulas mamarias de hembras silvestres (Figura 37B).



**Figura 37. Modelo de ratón FVB MMTV-Neu.** (A) Representación gráfica de la aparición de tumores en los ratones. n=15. (B) Tinción con Alumbre Carmín. Análisis comparativo de glándulas mamarias de hembras de 10 semanas FVB silvestre y FVB MMTV-Neu.

Disminuimos la expansión de las MMTV-Neu MaSCs ovariectomizando hembras de 8, 4 y 3 semanas, de manera que las hembras ovariectomizadas a las 8 semanas habían

estado expuestas al pico de estrógeno liberado durante toda la pubertad. Por su parte, las ovariectomizadas a las 4 semanas sólo habían estado expuestas durante una semana, mientras que en las ovariectomizadas a las 3 semanas no había habido síntesis ovárica de estrógeno.

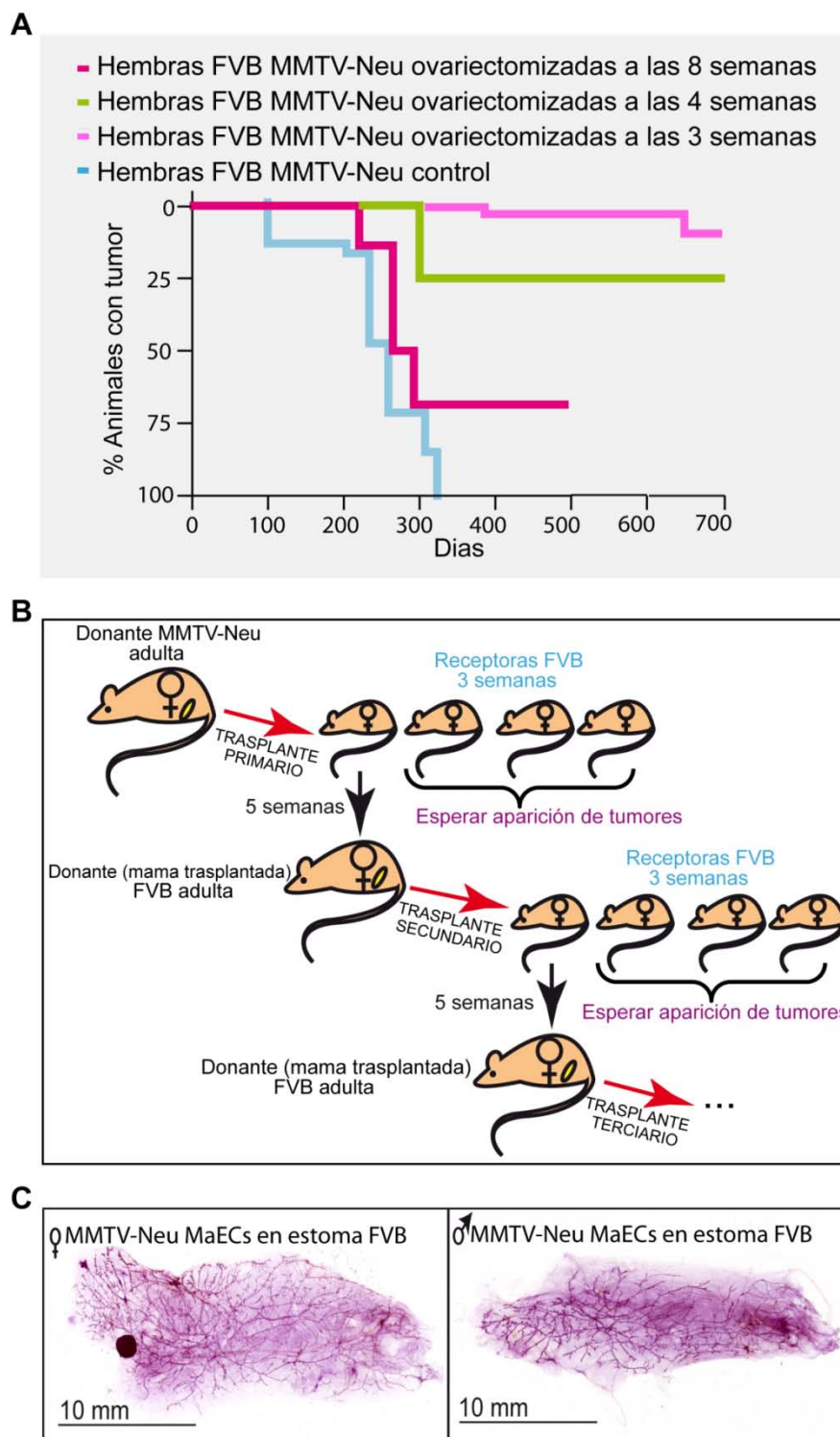
Pudimos observar la aparición de tumores en el 67% de las ratonas ovariectomizadas a las 8 semanas, además, éstos aparecían con una cinética similar a la de las hembras MMTV-Neu no ovariectomizadas (control). Sin embargo, sólo el 25% de las hembras ovariectomizadas a las 4 semanas y el 13% de las hembras ovariectomizadas a las 3 semanas, desarrollaron tumores, aunque éstos aparecieron con una cinética mucho más lenta (Figura 38A).

No se pudo descartar un papel de las hormonas sexuales sintetizadas durante los ciclos estrales, ya que un 33% de las hembras ovariectomizadas a las 8 semanas no desarrollaron tumores, aunque la cinética de aparición de los mismos era similar a la de las ratonas control (Figura 38A). Los datos obtenidos mostraron que disminuyendo el tiempo de exposición de las ratonas al estrógeno disminuía la frecuencia de tumores de mama, y además aumentaba el tiempo requerido para la aparición del tumor.

Por otra parte, aumentamos la expansión de las MMTV-Neu MaSCs realizando trasplantes seriados, de manera que con cada trasplante, las MaSCs estarían sometidas a una nueva expansión (Figura 38B). De esta forma, la expansión de las MaSCs dependía del número de trasplantes seriados que se realizaran, y según nuestra hipótesis, esperábamos que cuantas más expansiones hubiera, las hembras desarrollarían tumores con una cinética más rápida.

Trasplantamos MMTV-Neu MaECs de hembras adultas (8 semanas) en hembras prepúberes FVB. Como controles realizamos trasplantes con MMTV-Neu MaECs de hembras de 3 semanas y de macho, cuyas MaSCs no habían sufrido expansión.

A pesar de que las mamas trasplantadas se regeneraron (Figura 38C), confirmando de esta manera la expansión de las MaSCs, ninguna de ellas desarrolló tumores mamarios después de 20 meses desde el trasplante, no pudiendo demostrar, por tanto, esta parte de la hipótesis utilizando el modelo MMTV-Neu. Otros grupos de investigación han obtenido resultados similares en este modelo, aunque estos, por tratarse de resultados negativos no han sido publicados.



**Figura 38. Modificación de la expansión de las MaSCs en los ratones FVB MMTV-Neu.** (A) Representación gráfica de la aparición de tumores en ratonas control y ovariectomizadas a distintas edades,  $n \geq 4$ . (B) Modelo de trasplantes seriados con la finalidad de aumentar la expansión de las MaSCs. (C) Tinción con Alumbre Carmín. Análisis de glándulas mamarias de hembras FVB trasplantadas con MaECs de hembra y macho FVB MMTV-Neu.

## Factores implicados en la formación de tumores

Realizamos nuevos trasplantes en estromas de hembras FVB, en los que introdujimos fracciones de epitelio de una glándula mamaria pre-neoplásica perteneciente a una hembra MMTV-Neu de 7 meses y medio de edad (Figura 39A), que había desarrollado tumores en otras mamas. A pesar de que las mamas trasplantadas se regeneraron (Figura 39B), ninguna de ellas desarrolló tumores en los 10 meses posteriores al trasplante. Además, las glándulas mamarias reconstituidas presentaban un fenotipo más parecido al de glándulas mamarias de hembras silvestres que al de las mamas pre-neoplásicas de las hembras MMTV-Neu.

Por otra parte, también trasplantamos MaECs de ratonas FVB adultas en el par cuatro mamario de ratonas FVB-MMTV-Neu prepúberes. Cuando las hembras receptoras alcanzaron la edad de 8 meses comenzaron a desarrollar tumores en las mamas no trasplantadas, tal y como era de esperar en este modelo de ratón transgénico, pero no desarrollaron tumores en las mamas trasplantadas (Figura 39C). En este experimento el desarrollo de tumores en las mamas trasplantadas estaba limitado en el tiempo, tiempo en el que las mamas no trasplantadas desarrollaron tumores. Las mamas reconstituidas con FVB MaECs (Figura 39D), aunque presentaban un fenotipo muy parecido al de las mamas pre-neoplásicas MMTV-Neu (Figura 39A), no desarrollaron tumores. Estos resultados determinaron que era necesaria, aunque no suficiente, la expresión del transgén Neu en las células epiteliales mamarias para que los ratones desarrollaran tumores mamarios.

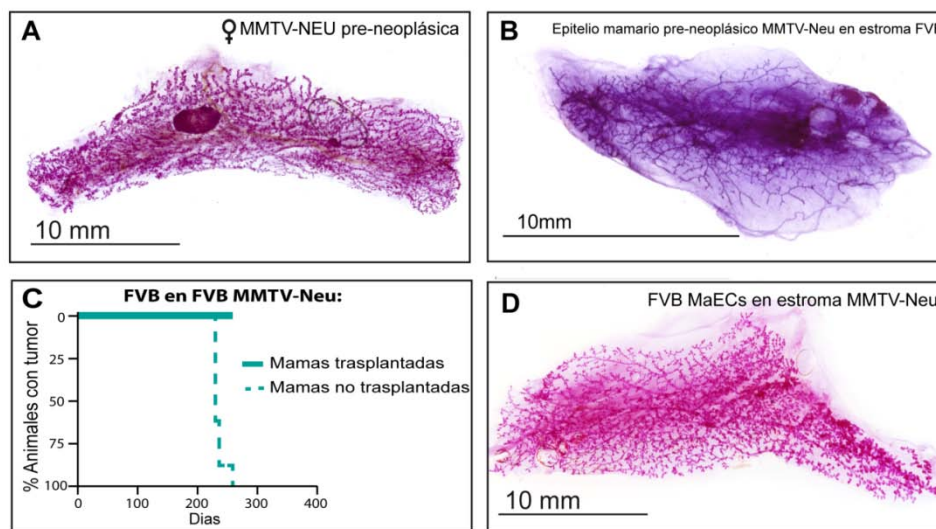
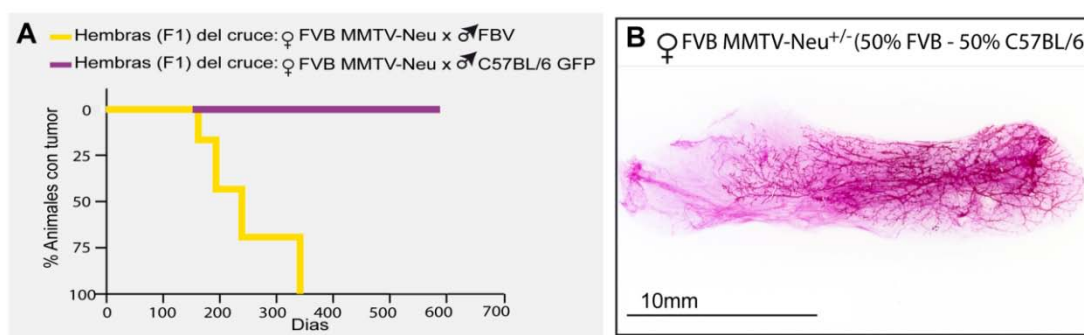


Figura 39. Expresión del transgén Neu en las MaECs o en el estroma mamario. (A y B) Tinción Alumbre Carmín. (A) Análisis de glándula mamaria pre-neoplásica de hembra de 7 meses y medio de edad. (B) Análisis de glándula mamaria trasplantada con fracción de epitelio de glándula mamaria pre-neoplásica después de 8 meses del trasplante. (C) Representación gráfica de la aparición de tumores en hembras FVB MMTV-Neu con el par abdominal mamario trasplantado con MaECs de hembras FVB silvestres.  $n \geq 4$ . (D) Tinción Alumbre Carmín. Análisis de glándula mamaria de ratona MMTV-Neu trasplantada con MaECs de hembra FVB.

Las hembras MMTV-Neu<sup>+/-</sup>, obtenidas del cruce de una hembra FVB-MMTV-Neu<sup>+/+</sup> con un macho FVB silvestre, desarrollaban tumores mamarios con una cinética similar a la de las hembras FVB-MMTV-Neu<sup>+/+</sup> (Figura 40A). Sin embargo, las hembras obtenidas del cruce de una hembra FVB-MMTV-Neu<sup>+/+</sup> con un macho C57Bl/6-GFP<sup>+/+</sup> no desarrollaron tumores (Figura 40A), y además, el fenotipo de las mamas (Figura 40B) era más parecido al de las mamas de ratonas silvestres. Estos datos mostraron que independientemente de que el transgen MMTV-Neu se expresara en homocigosis o en heterocigosis, siempre que el fondo genético del ratón fuera FVB, las hembras desarrollaban tumores mamarios con la misma cinética. Sin embargo, en un fondo genético mixto (50% FVB-50% C57Bl/6), las hembras no desarrollaron tumores, sugiriendo que el fondo genético sea relevante en el desarrollo de tumores en el modelo MMTV-Neu.



**Figura 40. Importancia de la expresión del transgén y del fondo genético en el desarrollo de los tumores.** (A) Representación gráfica de la aparición de tumores en hembras que expresan el transgén MMTV-Neu en heterocigosis, en fondo FVB o 50% FVB-50% C57Bl/6. (B) Tinción Alumbre Carmín. Análisis de la estructura de glándula mamaria de hembras descendientes del cruce de hembras FVB MMTV-Neu con machos C57Bl/6 silvestres.

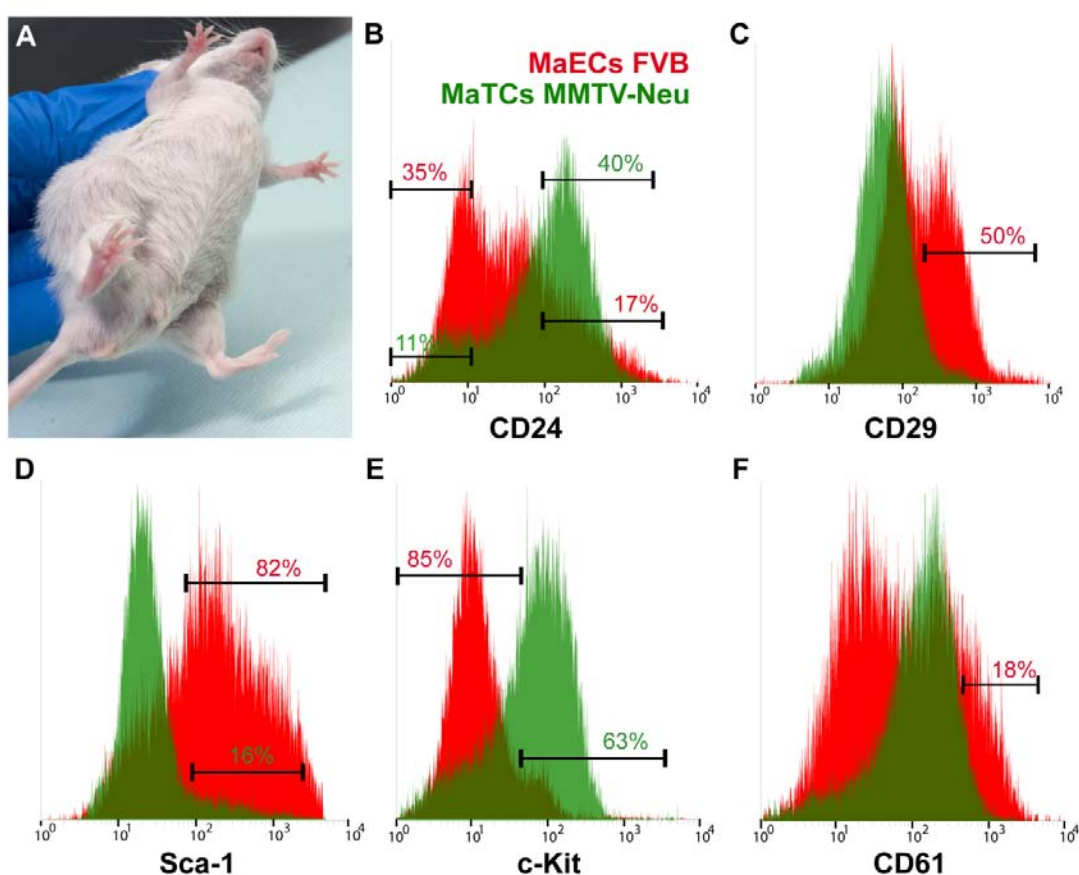
### Características de las células que componen los tumores que se desarrollan en las ratonas FVB MMTV-Neu (MMTV-Neu MaTCs)

Las células tumorales mamarias (MaTCs) trasplantadas en mamas libres de epitelio de machos y hembras FVB, y en mamas de hembras FVB adultas con los estromas completamente rellenos de ductos, desarrollaron tumores (Figura 41A). Dichos tumores se desarrollaban al cabo de un mes, y eran similares a los tumores primarios, sin importar el contexto hormonal que presentaban las mamas receptoras, ni si estas estaban rellenas de ductos.

Las MaTCs presentaban un perfil de expresión, con los marcadores de superficie celular CD24, CD29, Sca-1, CD61 y C-Kit, diferente al perfil que presentaban las MaECs de las ratonas FVB. Mientras que las MaECs presentaban dos poblaciones positivas cuando se marcaban con el marcador CD24 ó CD29 ó CD61, las MaTCs marcadas con cada uno de éstos marcadores solamente presentaban una población positiva, perdiendo en el caso de CD29 y CD61 la población de células con expresión más alta

del antígeno, que correspondían con el 50% y 18% de las MaECs respectivamente (Figura 41C y 41F). Sin embargo, en los tumores se detectaba un número mayor de células con alta expresión de CD24 (17% de MaECs y 40% de MaTCs ) y una proporción menor de células CD24<sup>-</sup> (35% de MaECs y 11% de MaTCs) (Figura 41B).

De forma inversa, en las MaTCs se observaron dos poblaciones de células Sca-1<sup>+</sup>, mientras que las MaECs sólo presentaban una única población de células positivas para éste anticuerpo, disminuyendo drásticamente la población Sca-1<sup>alta</sup>, del 82% en las MaECs al 16% en las MaTCs (Figura 41D). La expresión de C-kit también variaba; el 85% de las MaECs eran C-kit<sup>-</sup> o C-kit<sup>baja</sup>, por el contrario, el 63% de las MaTCs eran C-kit<sup>alta</sup>, y además se observaba una población con altos niveles de C-kit que no aparecía en las MaECs (Figura 41E).



**Figura 41. MaTCs de tumores generados en ratonas MMTV-Neu.** (A) Tumor desarrollado en la glándula mamaria de macho a partir del trasplante con MaTCs. Comparación de la expresión de (B) CD24, (C) CD29, (D) Sca-1, (E) C-kit y (F) CD61 entre MaECs de hembra FVB y MaTCs de tumores generados en hembras FVB MMTV-Neu, analizada mediante citometría de flujo. Los datos representativos de las MaECs se representan en rojo y los de las MaTCs en verde. Las barras en negro indican el porcentaje de células de la población señalada.

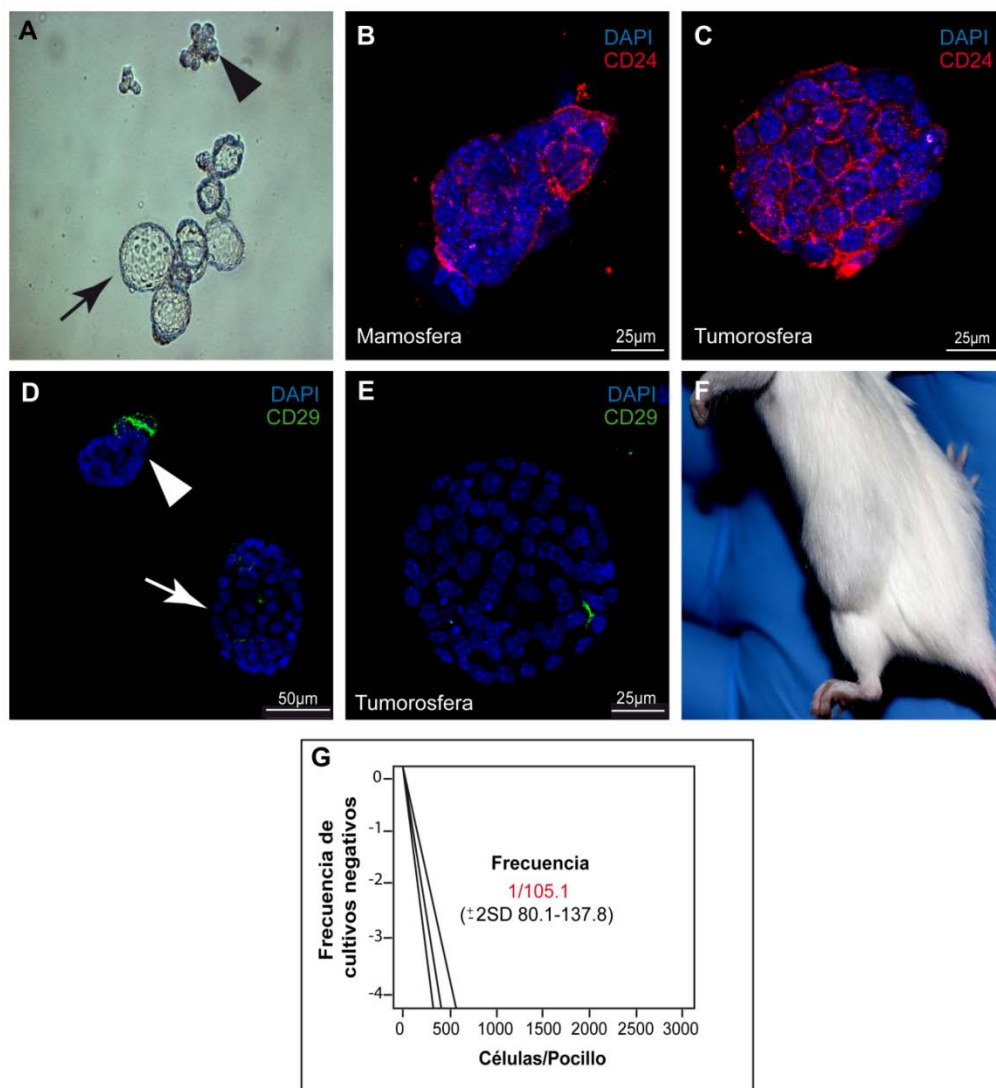
## Tumorosferas: Fenotipo y capacidad de generar tumores

Las MaTCs con propiedades de células madre y progenitores se mantienen *in vitro*, en las mismas condiciones que se mantienen las células madre y progenitores de glándula mamaria, en forma de esferas no adherentes. Además, en humanos, sólo las células madre del cáncer mamario (MaCSCs), población Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>, son capaces de generar dichas esferas, denominadas tumorosferas (Ponti et al., 2005).

Sembramos MaTCs de tumores procedentes de ratonas MMTV-Neu a baja densidad, descartándose de ésta forma la agregación celular, y pasados 15 días observamos dos tipos de estructuras tridimensionales de origen clonal. Pudimos observar una gran cantidad de estructuras esféricas, compactas, y aparentemente delimitadas por una capa celular, a las que denominamos tumorosferas, y una pequeña proporción de estructuras similares a las mamosferas generadas a partir de MaECs (Figura 42A). El análisis mediante inmunocitoquímica de los antígenos CD24 y CD29 demostró diferentes perfiles de expresión en las distintas esferas. Todas las células que componían la tumorosfera eran CD24<sup>+</sup> (Figura 42C). Sin embargo, el marcaje con CD29 estaba limitado a una o dos células (Figura 42D-E). Asimismo, todas las células que componían la mamosfera eran CD24<sup>+</sup> (Figura 42B), mientras que la expresión del antígeno CD29 estaba restringida a células localizadas en un polo de la mamosfera (Figura 42D), distribución similar a la que presentan las mamosferas procedentes de MaECs.

Realizamos trasplantes inyectando una tumorosfera micromanipulada por estroma mamario, y a partir de los 2 meses del trasplante, detectamos tumores en las mamas trasplantadas (34 tumores/44 mamas trasplantadas) (Figura 42F), demostrando de esta forma, que la tumorosfera contenía al menos una MaCSC, y que ésta mantenía sus características. Sin embargo, las esferas con fenotipo similar al de mamosferas formadas *in vitro* a partir de MaTCs, no generaron tumores tras ser trasplantadas (0 tumores/6 mamas trasplantadas).

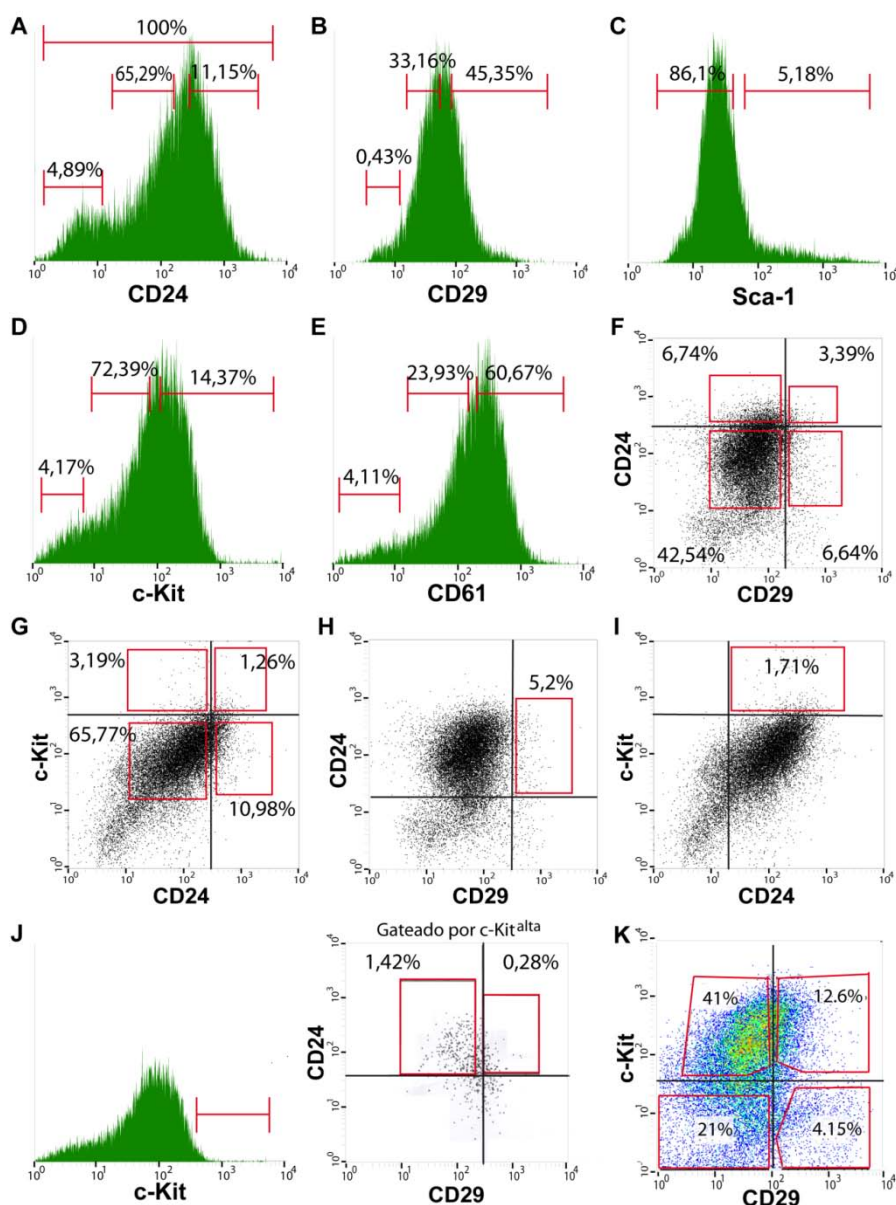
En la población tumoral, 1 de cada 105 células era capaz de formar una tumorosfera (Figura 42G), y como a partir de una sola tumorosfera se podía generar un tumor con una frecuencia de 1/1,29 (frecuencia 1/1,29  $\pm$ 2SD 1/1,13-1/1,56), la célula capaz de formar la tumorosfera probablemente representaba una MaCSC.



**Figura 42. Tumorosferas.** (A) Microscopía de campo claro de un cultivo de MaTCs donde se observan tumorosferas (señaladas con flecha) y mamosferas (señaladas con punta de flecha) in vitro. (B-E) Análisis por inmunocitoquímica de tumorosferas y mamosferas presentes en un cultivo de MaTCs. Se utilizaron anticuerpos específicos de núcleo (DAPI), y de antígenos determinados (CD24 y CD29), fluorescentes para su observación en un microscopio de confocal. (F) Fotografía de ratón con tumor en la glándula mamaria abdominal derecha, en la cual se trasplantó una tumorosfera. (G) Frecuencia de células dentro de las MaTCs capaces de formar tumorosferas. Los datos se representaron como media  $\pm 2$  desviaciones estándar, (n=96).

## Identificación de las MaCSCs

Con la finalidad de identificar la MaCSC que originaría la tumorosfera, procedimos a determinar la capacidad de formación de tumorosferas de distintas poblaciones de MaTCs. Para ello, pusimos en cultivo distintas poblaciones de MaTCs con una expresión diferencial de los antígenos anteriormente estudiados (Figura 43A-E) a una densidad que no permitía la agregación celular (600 células/pocillo de placa de 96).



**Figura 43. Separación de poblaciones dentro de las MaTCs mediante citometría de flujo utilizando los antígenos; (A) CD24, (B) CD29, (C) Sca-1, (D) C-kit y (E) CD61, y la combinación de antígenos (F y H) CD24+CD29, (G e I) CD24+C-kit, (J) C-kit+CD24+CD29 y (K) CD29+C-kit. Las poblaciones sorteadas se delimitan mediante segmentos o cuadrados en rojo, y se indica el porcentaje de células que corresponde a cada población.**

Después de dos semanas en cultivo, procedimos al recuento de pocillos en los que se habían formado tumorosferas (pocillos positivos). Observamos 5 pocillos positivos de los 12 pocillos sembrados con células de la población total de MaTCs (control), la cual se había pasado por el citómetro de flujo separando solamente las células vivas (Figura 44A). Observamos enriquecimiento de MaCSCs en las poblaciones con baja y alta expresión de CD24 (CD24<sup>baja</sup> y CD24<sup>alta</sup>), y en la población con alta expresión de CD29 (CD29<sup>alta</sup>). Sin embargo, observamos el mismo número de pocillos positivos que en el control, en los cultivos con células de la población con expresión más alta de C-kit (C-kit<sup>alta</sup>). Las distintas poblaciones resultantes del marcaje con los anticuerpos CD61 y Sca-1, así como las poblaciones CD24<sup>-</sup>, CD29<sup>-</sup>, CD29<sup>baja</sup>, C-kit<sup>-</sup> y C-kit<sup>baja</sup> no estaban enriquecidas en MaCSCs (Figura 44A).

Debido a que distintas poblaciones estaban enriquecidas en la formación de tumorosferas (Figura 44A), y que cada una de ellas representaban un porcentaje alto dentro de las MaTCs (Figura 43A-E), procedimos a subdividir las poblaciones CD24<sup>baja</sup> y CD24<sup>alta</sup> con los marcadores CD29 y C-kit, con el objetivo de obtener poblaciones más pequeñas enriquecidas en MaCSCs (Figura 43 F-G). Además, restringimos las poblaciones CD29<sup>alta</sup> y C-kit<sup>alta</sup> al 16.58% y 2.67% de las MaTCs respectivamente. Sólo las poblaciones de MaTCs CD29<sup>alta</sup> ó C-Kit<sup>alta</sup>, en combinación tanto con CD24<sup>baja</sup> ó CD24<sup>alta</sup>, estaban enriquecidas en MaCSCs (Figura 44B-C).

Posteriormente, y de acuerdo con los resultados obtenidos, sembramos en cultivo las poblaciones de MaTCs CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> y CD24<sup>+</sup>C-kit<sup>alta</sup>, que representaban el 5,2% y 1.71% de la población de MaTCs respectivamente (Figura 43H-I). Dichas poblaciones estaban altamente enriquecidas en MaCSC ya que se detectaron tumorosferas en un 75% de los pocillos sembrados (Figura 44D), y 1 de cada 261 células de estas poblaciones (frecuencia 1/261 ±2SD 1/584-1/116) era una MaCSC.

Del mismo modo, intentamos identificar, mediante un triple marcaje, una única población de MaTCs donde se encontraran las MaCSCs. Para ello, dividimos la población C-Kit<sup>alta</sup> (2.4% de las MaTCs), en las subpoblaciones CD24<sup>+</sup>CD29<sup>baja</sup> (58%) y CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> (4.29%) (Figura 43J). Sin embargo, detectamos pocillos positivos con ambas subpoblaciones, de manera que no pudimos determinar una población enriquecida en CSC con los anticuerpos C-kit+CD24+CD29, ya que mientras que en la subpoblación C-Kit<sup>alta</sup>CD24<sup>+</sup>CD29<sup>baja</sup>, que representaba un 1.42% de las MaTCs (Figura 43J), el 66% de los pocillos presentaban tumorosferas (Figura 44E), en la subpoblación C-Kit<sup>alta</sup>CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup>, que representaba un 0.28% de las MaTCs (Figura 43J), el 30% de los pocillos sembrados, en éste caso con 300 células, presentaban tumorosferas.

	POBLACIÓN	% POCILLOS +
A	●●●●●○○○○○○○○ Total	41,6%
	○○○○○○○○○○○○○○○○ CD24 <sup>-</sup>	0
	●●●●●●●○○○○○○○○ CD24 <sup>baja</sup>	58,3%
	●●●●●●●●●●●●●●●● CD24 <sup>alta</sup>	100%
	○○○○○○○○○○○○○○○○ CD29 <sup>-</sup>	0
	○○○○○○○○○○○○○○○○ CD29 <sup>baja</sup>	0
	●●●●●●●○○○○○○○○ CD29 <sup>alta</sup>	50%
	○○○○○○○○○○○○○○○○ Sca-1 <sup>-</sup>	0
	○○○○○○○○○○○○○○○○ Sca-1 <sup>+</sup>	0
	○○○○○○○○○○○○○○○○ C-kit <sup>-</sup>	0
	○○○○○○○○○○○○○○○○ C-kit <sup>baja</sup>	0
	●●●●●○○○○○○○○○○ C-kit <sup>alta</sup>	41,6%
	○○○○○○○○○○○○○○○○ CD61 <sup>-</sup>	0
	○○○○○○○○○○○○○○○○ CD61 <sup>baja</sup>	0
●●○○○○○○○○○○○○○○ CD61 <sup>alta</sup>	16,6%	
B	●●●●●○○○○○○○○○○ Total	33,3%
	●●●●●●●●●●●●●●●● CD29 <sup>alta</sup> CD24 <sup>alta</sup>	91,6%
	●●●●●●●●●●●●●●●● CD29 <sup>alta</sup> CD24 <sup>baja</sup>	91,6%
	○○○○○○○○○○○○○○○○ CD29 <sup>baja</sup> CD24 <sup>baja</sup>	0
	○○○○○○○○○○○○○○○○ CD29 <sup>baja</sup> CD24 <sup>alta</sup>	0
C	●●●●●○○○○○○○○○○ Total	41,6%
	●●●●●●●●●●●●●●●● C-kit <sup>alta</sup> CD24 <sup>alta</sup>	100%
	●●●●●●●●●●●●●●●● C-kit <sup>alta</sup> CD24 <sup>baja</sup>	91,6%
	○○○○○○○○○○○○○○○○ C-kit <sup>baja</sup> CD24 <sup>baja</sup>	0
	○○○○○○○○○○○○○○○○ C-kit <sup>baja</sup> CD24 <sup>alta</sup>	0
D	●●●●●○○○○○○○○○○ Total	41,6%
	●●●●●●●●●●●●●●●● CD24 <sup>+</sup> CD29 <sup>alta</sup>	90%
	●●●●●●●●●●●●●●●● CD24 <sup>+</sup> C-kit <sup>alta</sup>	90%
E	●●●●●○○○○○○○○○○ Total	33,3%
	●●●●●○○○○○○○○○○ CD24 <sup>+</sup> C-kit <sup>alta</sup> CD29 <sup>alta</sup>	30%
	●●●●●●●●●●○○○○○○ CD24 <sup>+</sup> C-kit <sup>alta</sup> CD29 <sup>baja</sup>	66,6%

**Figura 44. Identificación de la población de MaTCs enriquecida en MaCSCs.** A, B, C, D y E corresponden a los distintos experimentos llevados a cabo. Los círculos representan los pocillos sembrados con 600 células, excepto los pocillos que están rodeados de rojo, en los que se sembraron 300 células, y los pocillos con una X, en los cuales no se sembraron células. En cada fila de pocillos se sembró la población indicada a la derecha. Los pocillos en los que se observaron tumorosferas después de dos semanas en cultivo aparecen rellenos de color verde (pocillos positivos), los pocillos en los que no aparecieron tumorosferas están sin rellenar. Además, en la figura se indica el porcentaje de pocillos positivos sembrados con las distintas poblaciones.

También utilizamos la combinación de los anticuerpos CD29 y C-kit para aislar la población de MaTCs enriquecida en MaCSCs, aunque en este caso realizamos trasplantes con las distintas poblaciones resultantes (Figura 43K). Trasplantamos distintas concentraciones de MaTCs, dependiendo de la población, de manera que de la población más pequeña, C-kit<sup>-</sup>CD29<sup>alta</sup>, trasplantamos 1000 células por mama, y de la población más grande, C-kit<sup>+</sup>CD29<sup>baja</sup>, que es 10 veces mayor que la pequeña, trasplantamos 10.000 células por mama (Tabla X). En todos los grupos de ratonas trasplantadas con las distintas poblaciones apareció algún tumor, aunque existía variación en la frecuencia entre las distintas poblaciones; desarrollaron tumores el 0,3% de las mamas trasplantadas con la población C-kit<sup>-</sup>CD29<sup>alta</sup>, el 0,6% de las trasplantadas con C-Kit<sup>-</sup>CD29<sup>baja</sup>, el 0,75% de las trasplantadas con C-kit<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup>, y todas las mamas trasplantadas con la población C-kit<sup>+</sup>CD29<sup>baja</sup> (Tabla X). Estos datos demostraron que la combinación de los anticuerpos C-kit y CD29 no era idónea para aislar la población de MaTCs enriquecida en MaCSCs.

**Tabla X. Trasplantes de distintas poblaciones de MaTCs en estromas mamarios de hembras FVB. Análisis de mamas que desarrollan tumores**

POBLACIÓN	CÉLULAS/MAMA	MAMAS TRASPLANTADAS	MAMAS CON TUMOR
C-kit <sup>-</sup> CD29 <sup>alta</sup>	1000	6	2
C-kit <sup>+</sup> CD29 <sup>alta</sup>	2000	8	6
C-kit <sup>-</sup> CD29 <sup>baja</sup>	5000	6	4
C-kit <sup>+</sup> CD29 <sup>baja</sup>	10000	6	6

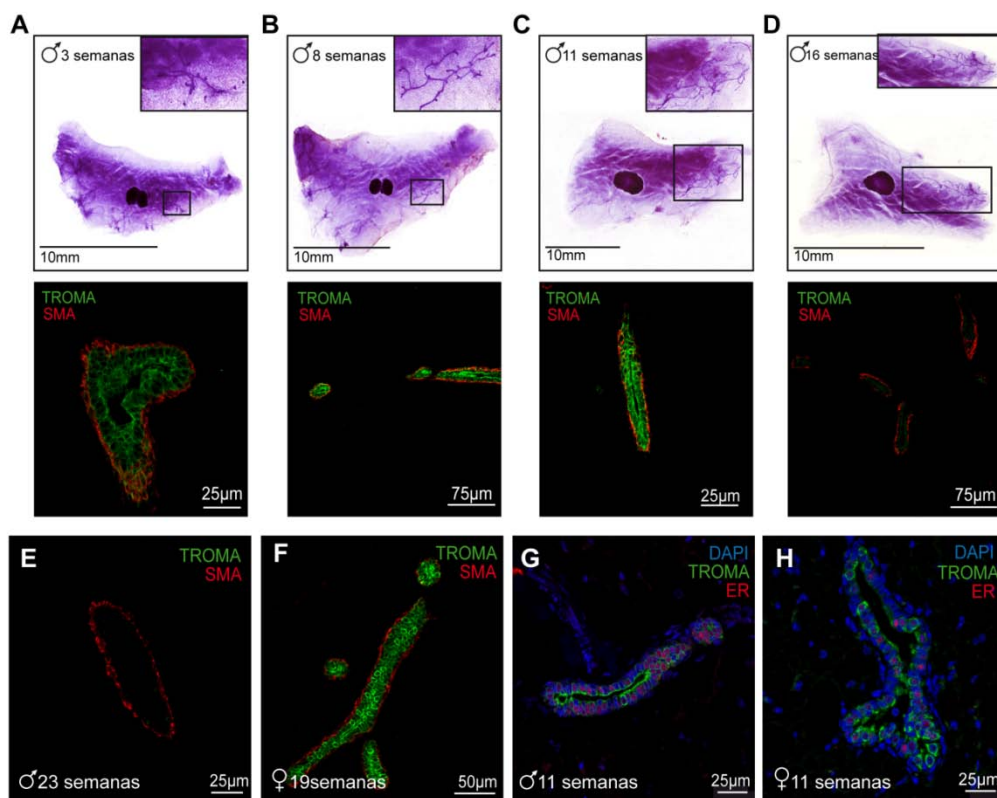
## **Biología de la glándula mamaria en machos**

Debido a que los machos MMTV-Neu no desarrollan tumores mamarios, sin embargo, los trasplantes de MaTCs en machos FVB generaban tumores con la misma frecuencia y cinética que en hembra, analizamos las glándulas mamarias de macho para determinar si había diferencias detectables con las de hembra.

A diferencia de las hembras, en las glándulas mamarias de los machos no se observa elongación ductal. En los machos se mantiene la estructura epitelial mamaria rudimentaria, aunque ésta crece isométricamente con el resto del cuerpo a lo largo de la vida del ratón (Figura 45A-D).

Asimismo, los ductos de machos adultos (11 semanas) estaban formados por células ductales, algunas de ellas con expresión de ER (Figura 45G), rodeadas de una capa de células mioepiteliales (Figura 45C), composición similar a la que presentaban los ductos de las hembras de la misma edad (Figura 45H). Sin embargo, en nuestro laboratorio se observó que las células ductales mamarias de los machos con una elevada edad no expresaban TROMA-I, marcador de células ductales.

Analizamos la composición de los ductos de machos de distinta edad para conocer la edad en la que comenzaba a observarse el bloqueo en la diferenciación luminal. En los machos, a partir de las 16 semanas de edad observamos un descenso en la expresión del marcador (TROMA-I) de las células ductales (Figura 45D), perdiéndose completamente en la semana 23 (Figura 45E), sin que esto afectara a la propia estructura del ducto. Este efecto era específico de las células epiteliales de macho, ya que no le observamos en las células ductales mamarias de hembras, que seguían expresando dicho marcador ductal (Figura 45F).

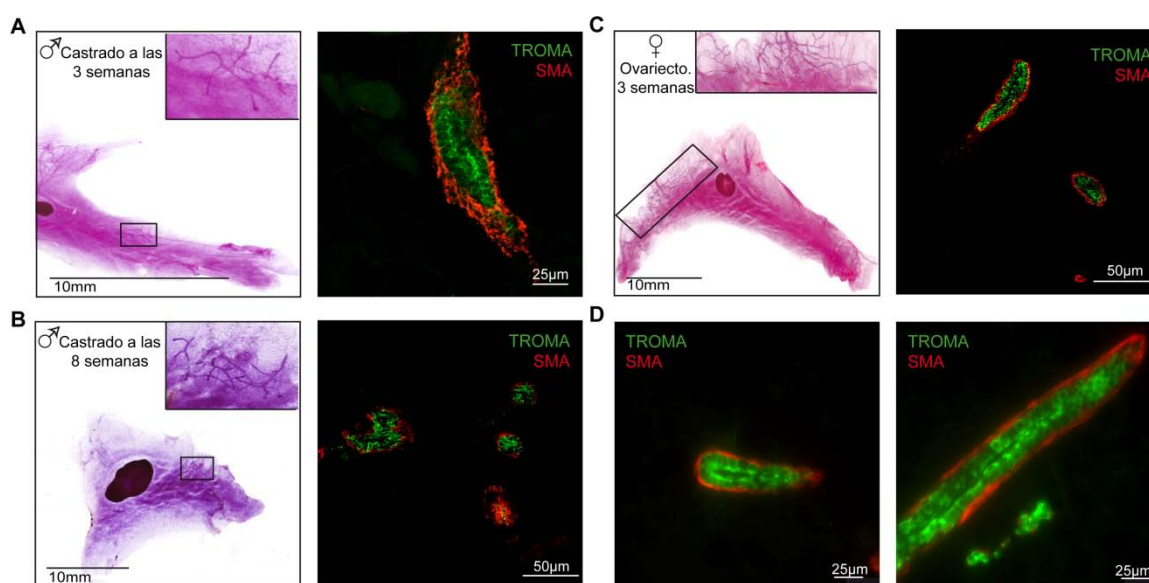


**Figura 45. Análisis de la estructura epitelial y de la expresión de marcadores específicos en glándulas mamarias de macho.** (A-D) Tinción con Alumbre Carmín, mostrando en los detalles el epitelio mamario. Análisis de la estructura de la glándula mamaria de ratones macho durante su desarrollo, y análisis mediante inmunohistoquímica de secciones de las glándulas mamarias. Se utilizaron anticuerpos específicos de células luminales (TROMA-I), y de células mioepiteliales ( $\alpha$ -SMA). (E-H) Análisis mediante inmunohistoquímica de secciones de glándulas mamaria de machos y hembras a distintas edades. Además de los anticuerpos anteriormente descritos, también se utilizó el anticuerpo que reconoce el receptor de estrógeno (ER).

Mientras que las células ductales mamarias de los machos de 24 semanas no tenían expresión de TROMA-I, las células ductales mamarias de machos de 24 semanas, que habían sido castrados a las 3 y 8 semanas de edad, si lo expresaban (Figura 46A-B). Con la castración se eliminó la secreción de andrógenos por los testículos, demostrándose que el efecto del bloqueo de la diferenciación luminal era producido por los andrógenos, y que la exposición a los andrógenos durante la pubertad (desde las 3 a las 8 semanas de edad) no era suficiente para que el bloqueo se efectuara.

Como control, también analizamos la composición de los ductos presentes en las glándulas mamarias de hembras adultas, ovariectomizadas a las 3 semanas de edad, en las cuales el estrógeno no había tenido un posible efecto en su desarrollo. Los ductos que componían estas glándulas mamarias estaban formados por células que expresaban  $\alpha$ -SMA, y células que expresaban TROMA-I (Figura 46C), determinando de esta manera que la ausencia o los bajos niveles de estrógeno no afectaban al bloqueo de la diferenciación luminal.

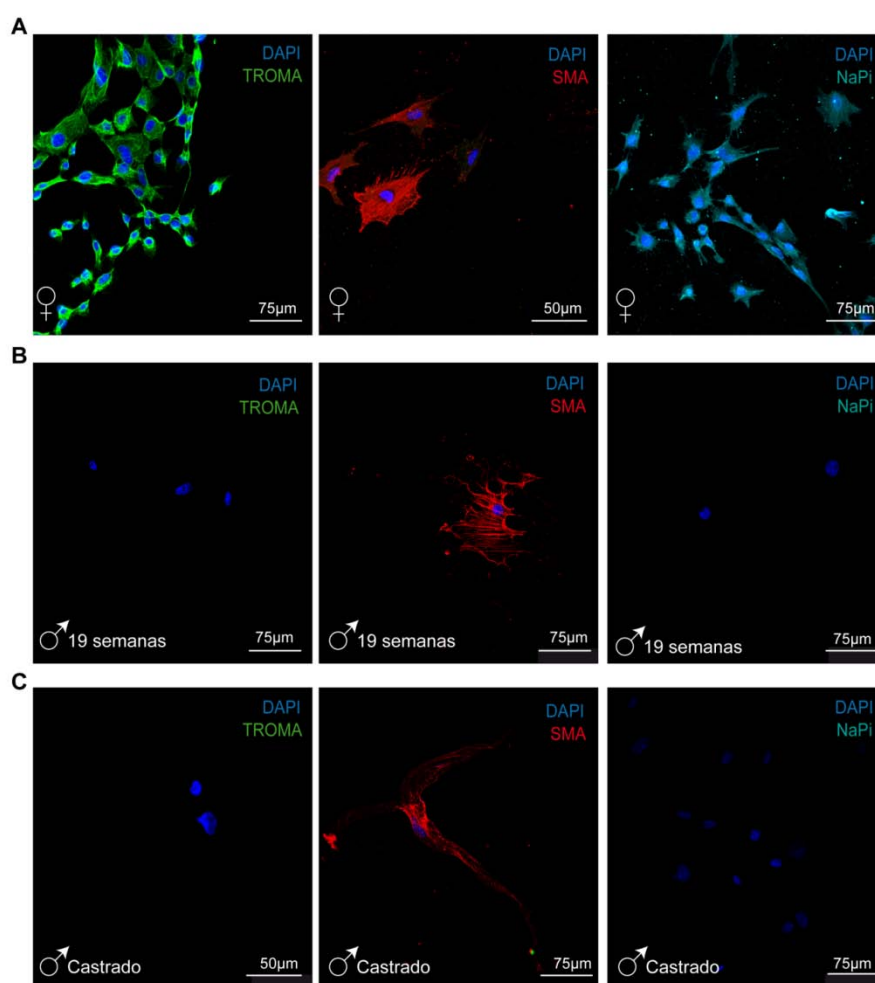
Realizamos trasplantes en los que se inyectaron MaECs de machos de 32 semanas, que no expresaban el marcador ductal TROMA-I, en estromas de hembras singénicas. Cuando las hembras receptoras llegaron a la madurez sexual, analizamos las mamas trasplantadas mediante inmunohistoquímica, observándose que los ductos de las mamas regeneradas estaban formados por células mioepiteliales que expresaban  $\alpha$ -SMA y células ductales que expresaban TROMA-I (Figura 46D), demostrándose que el bloqueo de la diferenciación que comenzaba a apreciarse en los machos a partir de las 16 semanas era reversible cuando las células se encontraban en un contexto hormonal de hembra.



**Figura 46. Efecto de la castración en la expresión del marcador específico de células ductales TROMA-I.** (A-B) Tinción con Alumbre Carmín, mostrando en los detalles el epitelio mamario. Análisis mediante inmunohistoquímica de la expresión de células ductales (TROMA-I) de secciones de glándulas mamarias de machos castrados a las 3 y 8 semanas de edad. (C) Tinción con Alumbre Carmín, mostrando en los detalles el epitelio mamario. Análisis mediante inmunohistoquímica de la expresión de TROMA-I en secciones de glándula mamaria de hembra ovariectomizada a las 3 semanas de edad. (D) Análisis mediante inmunohistoquímica de la expresión de TROMA-I en secciones de glándula mamaria de hembra reconstituida con MaECs de macho de 32 semanas.

Por otra parte, también analizamos la capacidad de diferenciación *in vitro* de las MaSCs tanto de ratón de 19 semanas de edad, cuyos ductos no expresaban TROMA-I, como de ratón adulto castrado a las 3 semanas, cuyos ductos expresaban TROMA-I. Para ello generamos cultivos de mamosferas a partir de MaECs de los distintos

ratones. También generamos un cultivo de mamíferas a partir de MaECs de una hembra, que utilizamos como control. Las células que componían las diferentes mamíferas procedentes de machos sólo fueron capaces de diferenciarse a células mioepiteliales, independientemente de la continuada o defectuosa exposición de las MaSCs a los andrógenos *in vivo* (Figura 47B-C). Sin embargo, las células que componían las mamíferas procedentes de hembras fueron capaces de diferenciarse a los tres tipos celulares; células ductales, células mioepiteliales y células alveolares (Figura 47A), como previamente observaron otros autores (Dontu et al., 2003). De esta forma demostramos que independientemente de que las MaSCs de los machos hubieran estado expuestas o no a los andrógenos, éstas generan mamíferas cuyas células no se diferenciaban *in vitro* a células del linaje luminal: células ductales y alveolares.



**Figura 47. Diferenciación *in vitro* de las células que conforman las mamíferas.** (A) Análisis mediante inmunocitoquímica de la diferenciación *in vitro* de células de mamíferas, procedentes de hembras, a los 3 tipos celulares que forman el epitelio de la glándula mamaria; células ductales (TROMA-1), mioepiteliales ( $\alpha$ -SMA), y alveolares (NaPi). Las células de mamíferas procedentes de machos de 19 semanas (B) y machos castrados (C), son incapaces de diferenciarse *in vitro* a células ductales y a células alveolares.

Adicionalmente, analizamos por RT-PCR cuantitativa la expresión de distintos genes en; i, hembras adultas, que usamos como control, ya que las células ductales en las hembras expresan TROMA-I; ii, machos adultos, en los cuales se da el bloqueo en la diferenciación luminal, ya que las células que componen los ductos no expresan el marcador ductal TROMA-I; iii, machos adultos castrados a las 3 semanas de edad, a los que denominamos machos castrados, en los cuales, al igual que en las hembras adultas, las células ductales expresan TROMA-I. De esta forma, los genes que se expresaran de distinta forma en machos adultos y hembras, y en machos adultos y machos castrados, y que además se expresaran de igual forma en los machos castrados y en las hembras, podrían ser posibles candidatos implicados en el bloqueo de la diferenciación luminal.

Observamos diferencias significativas en la expresión de los genes; *Csn* (codifica la caseína, proteína de la leche), *Krt14* (marcador mioepitelial), *Pgr* (receptor de progesterona), *Wap* (gen de la proteína ácida del suero de la leche), *C-Myc* (protooncogén) y *Numb2* (proteína cuya distribución en el núcleo determina la división simétrica o asimétrica) entre machos adultos y hembras. Además, observamos diferencias significativas entre machos adultos y machos castrados. Sin embargo, también observamos diferencias entre machos castrados y hembras adultas (Figura 48A). Al analizar la expresión de los genes implicados en la diferenciación luminal; *Stat5A*, *Elf5*, *Notch1* y *Gata3*, no apreciamos diferencias significativas en la expresión entre machos adultos y machos castrados, aunque existían diferencias significativas en la expresión de dichos genes en machos adultos y machos castrados con respecto a las hembras adultas (Figura 48B). Lo mismo ocurría con los genes *Krt18*, que es un marcador ductal, y *Lgr5* que es un biomarcador de células madre adultas en algunos tejidos (Figura 48B). El gen *Esr1* (receptor de estrógenos) se expresaba de igual forma en machos castrados y hembras, y mientras que en los machos adultos observamos diferencias significativas con respecto a las hembras, no observamos diferencias con respecto a los machos castrados (Figura 48C). Sin embargo, el análisis cuantitativo no reflejó cambios en la expresión de los genes *StatB*, *PKC-iota* (isoforma de la proteína quinasa C) y *Sox2* (factor de transcripción) en machos adultos y hembras (Figura 48D). Todos estos datos determinaron que dichos genes analizados estarían excluidos de estar implicados en el bloqueo de la diferenciación luminal observada en los machos adultos debido a la presencia de andrógenos.

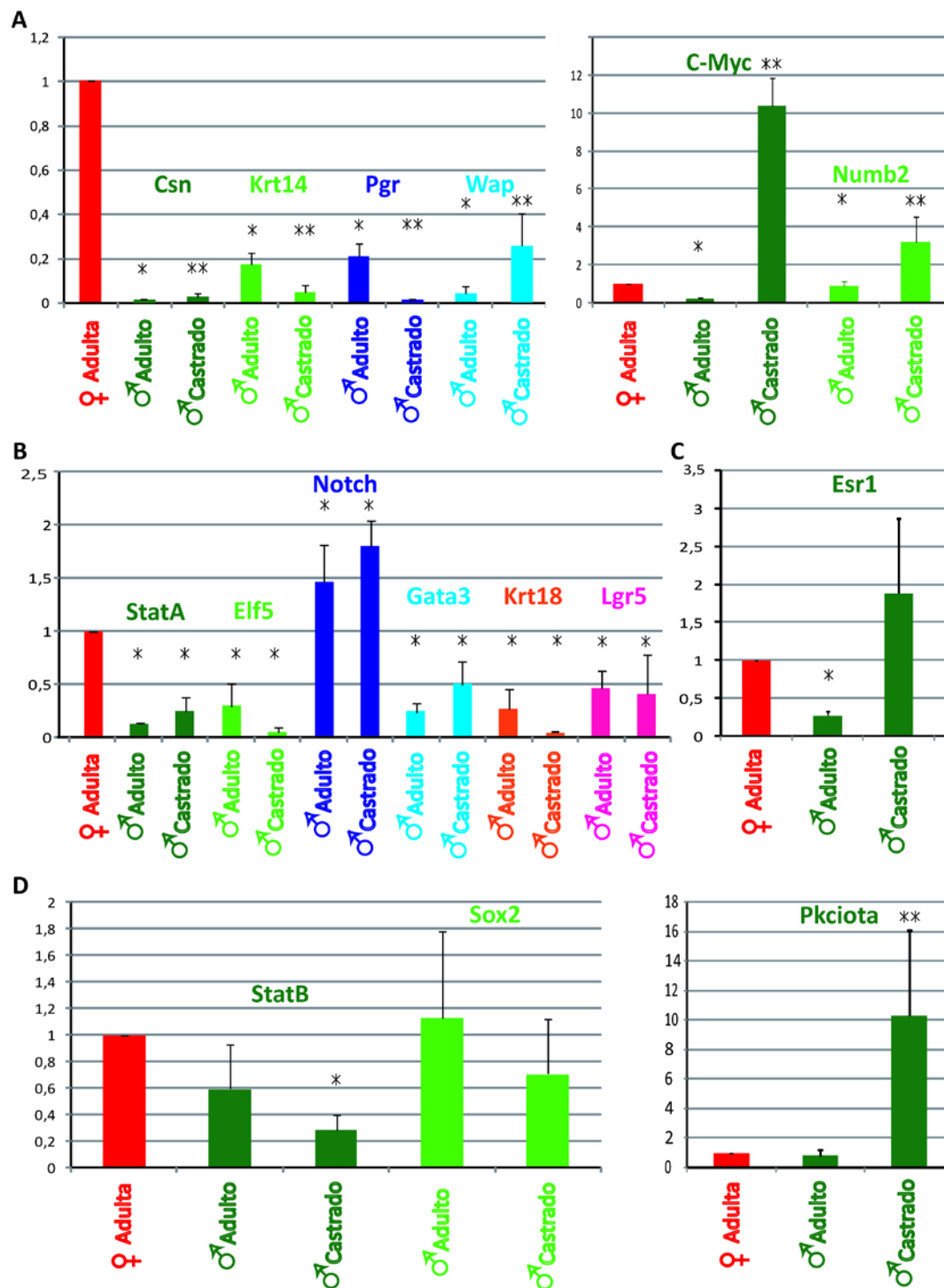
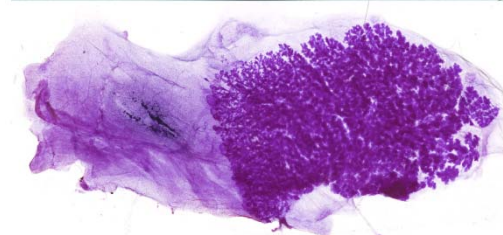
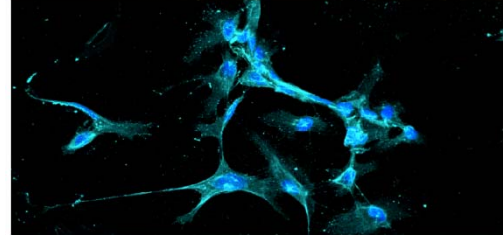
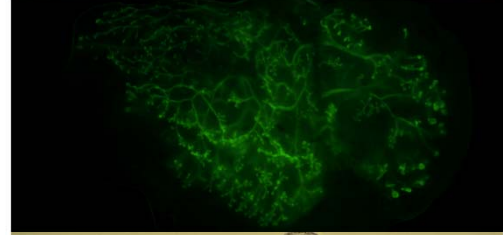
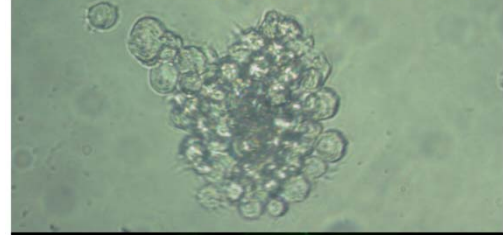
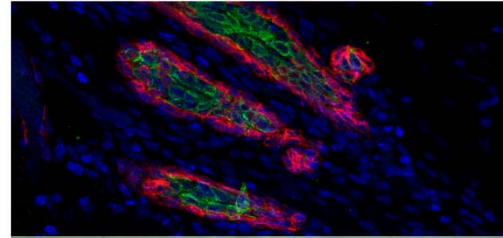
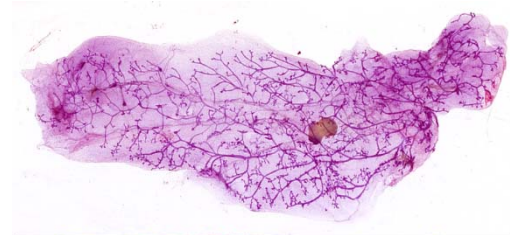


Figura 48. Representación gráfica de la expresión de genes en hembras adultas, machos adultos y machos adultos castrados a las 3 semanas de edad (machos castrados) analizados mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en hembras adultas, y se representan como media  $\pm 2$  desviaciones estándar,  $n \geq 4$ . \* La comparación con la hembra adulta es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* la comparación con la hembra adulta y con el macho adulto es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



# *DISCUSIÓN*



## Células madre adultas de la glándula mamaria (MaSCs)

En 1959 DeOme y sus colaboradores evidenciaron, en modelos de ratón, la regeneración de glándulas mamarias trasplantando fragmentos de epitelio mamario en estromas de hembras receptoras, lo que sugirió la existencia de células madre en la glándula mamaria (DeOme et al., 1959). Desde entonces, han sido muchos los experimentos realizados para identificar y aislar las MaSCs.

En nuestro laboratorio hemos estimado la frecuencia de MaECs capaces de regenerar una glándula mamaria en trasplantes seriados. Estas células representan bona-fide MaSCs, ya que poseen capacidad de autorrenovación y diferenciación. Mediante el análisis de glándulas mamarias reconstituidas a partir de distintas concentraciones de MaECs de hembra, y por dilución límite, hemos estimado que 1 célula, de cada 669 MaECs es una MaSC (frecuencia  $1/669 \pm 2SD$   $1/294-1/1522$ ). Estos resultados son muy similares a los presentados por Stingl y colaboradores, quienes describieron la identificación y el aislamiento de MaSCs, estimando mediante la realización de trasplantes en condiciones de dilución límite que en el epitelio mamario había 1 MaSC por cada 1400 MaECs (frecuencia  $1/1400 \pm 2SD$   $1/600-1/3000$ ) (Stingl et al., 2006). Además, describen que la utilización de distintos protocolos de obtención de MaECs podía dar lugar a variaciones del número de MaSCs, ya que aumentando el tiempo de digestión enzimática del epitelio mamario se obtienen más MaECs, aunque menos MaSCs, pudiendo ser las MaSCs más sensibles a dicha digestión (Stingl et al., 2006). En 2006, Shackleton y colaboradores también publicaron un manuscrito sobre la identificación y aislamiento de MaSCs. Además, demostraron que el trasplante de una sola célula epitelial CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> en una hembra receptora era capaz de regenerar una glándula mamaria completa, aunque la frecuencia obtenida no fue del 100% sino que reconstituyeron la glándula mamaria en 1 de cada 17 trasplantes realizados en estas condiciones (Shackleton et al., 2006), dato similar al que nosotros obtenemos al analizar por dilución límite las glándulas mamarias regeneradas a partir de distintas concentraciones de la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> (1 MaSC por cada 18 MaECs). De esta forma podemos concluir que la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> de las MaECs está enriquecida en MaSCs, al menos en 36 veces, en comparación con la población total de MaECs. Dicho enriquecimiento podría ser mayor, ya que no se tiene en cuenta que al trasplantar una sola célula es fácil perderla, y que al pasar las células por el citómetro de flujo el 75% de las MaSCs se mueren.

Debido a que la realización de experimentos *in vivo* para la cuantificación de las MaSCs es costoso y presenta dificultades, varios laboratorios han estado utilizando la capacidad de formación de mamosferas como una manera alternativa y sencilla de cuantificar el número de MaSCs, ya que, se había descrito que las mamosferas están enriquecidas en células indiferenciadas, y éstas son capaces de diferenciarse *in vitro* a uno, dos, o incluso los tres tipos celulares que forman el epitelio mamario (Dontu et al., 2003). Sin embargo, no se había demostrado que cada mamosfera proviene de una MaSC. En nuestro laboratorio demostramos que sólo la población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> era capaz de generar mamosferas, y que en cada mamosfera había una única célula capaz de generar nuevas mamosferas (Diaz-Guerra et al., 2012). Estos datos, junto con los

datos que muestran que una sola mamofera trasplantada en una hembra receptora es capaz de regenerar una glándula mamaria completa (frecuencia  $1/20 \pm 2SD$   $1/78,5-1/5,39$ ) incluso en trasplantes seriados, demuestran que la mamofera contiene una célula madre, y que por tanto, a partir de las células capaces de formar mamoferas se pueden cuantificar las MaSCs. Como cabe esperar, si cada mamofera contiene una MaSC, la frecuencia de regeneración tanto en experimentos utilizando células CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup>, como de mamoferas micromanipuladas, debe ser similar ( $1/18$  v.s.  $1/20$ ).

El papel de las hormonas sexuales en el desarrollo de la glándula mamaria es evidente (Briskin and O'Malley, 2010). Los ratones deficientes en receptores de estrógeno son incapaces de desarrollar una glándula mamaria adulta (Bocchinfuso et al., 2000), y las MaECs de dichos animales son incapaces de regenerar una glándula mamaria funcional en trasplantes en los que se utilizan como receptoras hembras salvajes (Mallepell et al., 2006). Asimismo, en animales deficientes en receptores de progesterona se observa la elongación de los ductos mamarios tras la pubertad, pero son deficientes en la generación de ramificaciones terciarias y en la formación de estructuras alveolares (Briskin et al., 1998). Sin embargo no se conocía el (los) mecanismo(s) de acción de los estrógenos y la progesterona a nivel celular y molecular. En nuestro laboratorio se cuantificaron las MaSCs en las distintas etapas del desarrollo mamario utilizando la capacidad de formación de mamoferas, y los datos obtenidos sugerían que las hormonas sexuales podrían estar implicadas en la expansión de las MaSCs (Diaz-Guerra et al., 2012). También mediante la cuantificación de mamoferas, los datos obtenidos en esta tesis permiten demostrar que el estrógeno es el responsable de la expansión de las MaSCs durante la pubertad, ya que no se observa expansión de las MaSCs durante la pubertad en animales deficientes en anfirregulina (AREG<sup>-/-</sup>), uno de los mediadores conocidos de la señalización por estrógeno. La expansión de las MaSCs durante la pubertad conlleva el aumento de la celularidad del epitelio mamario, que va acompañada por la elongación de los ductos (Diaz-Guerra et al., 2012). La síntesis de estrógeno por los ovarios no está restringida a la pubertad, sino que también ocurre durante los sucesivos ciclos estrales, aunque durante los ciclos estrales el estrógeno no está implicado en la expansión de las MaSCs tal y como describió Joshi y colaboradores (Joshi et al., 2010). Sin embargo, experimentos en los que hemos realizado trasplantes de MaECs de ratonas de 3 semanas y de ratonas adultas en recipientes adultos, cuyas glándulas mamarias habían sido des-epitelizadas a las 3 semanas, indican que para la regeneración de la glándula mamaria el estrógeno secretado durante los ciclos estrales son suficientes, y por tanto, que el pico de estrógeno presente durante la pubertad no es necesario para la elongación ductal, siempre y cuando existan los picos de estrógeno durante los sucesivos ciclos estrales. También se observa un pico de estrógeno al principio de la gestación, aunque está descrito que éste no está implicado en cambios aparentes de la glándula mamaria, aunque induce la expresión de PR y facilita la sensibilidad de las células lumbales a la progesterona (Beleut et al., 2010; Haslam and Shyamala, 1979; Shoker et al., 1999). Sin embargo, no consideramos ético cruzar a hembras que recientemente habían sido sometidas a una cirugía para analizar si este estrógeno sería suficiente en la regeneración de la glándula mamaria.

En las hembras silvestres, al final de la gestación se observa una expansión de las MaSCs de 3 veces en comparación con las presentes en las glándulas mamarias de hembras adultas vírgenes, siendo las hormonas sexuales liberadas durante la gestación las responsables de las divisiones simétricas de las MaSCs. La expansión de las MaSCs conlleva el aumento de la celularidad del epitelio mamario, y en este caso va acompañada por la ramificación de los ductos y la formación de las estructuras lóbulo-alveolares. Sin embargo, la expansión es transitoria, ya que tras la involución, el número de MaSCs disminuye hasta niveles similares a los de una hembra virgen (Asselin-Labat et al., 2010; Diaz-Guerra et al., 2012). En animales deficientes en anfirregulina, los cuales tienen bloqueada la ruta de señalización del estrógeno, la progesterona y la prolactina sintetizadas durante la pubertad están implicadas en la expansión de 18,8 veces de las MaSCs, y con ello en la ramificación ductal y en la formación de alveolos capaces de sintetizar leche. Además, la expansión de las MaSCs se correlaciona con el aumento de la celularidad, habiendo 1 MaSC por cada 477 MaECs, dato comparable a los obtenidos en otros análisis realizados en nuestro laboratorio, mediante los cuales se determinó que en los distintos estadios del desarrollo de la glándula mamaria existía una MaSC por cada 500 células diferenciadas (Diaz-Guerra et al., 2012). Mientras que en las hembras silvestres la expansión de las MaSCs durante la gestación estaría limitada por el espacio en el estroma, en las hembras *AREG*<sup>-/-</sup> no ocurre lo mismo; en las glándulas mamarias gestantes hay espacio en el estroma libre de epitelio, incluso después de 12 gestaciones (Ciarloni et al., 2007). Además, curiosamente, el número de MaSCs en las hembras *AREG*<sup>-/-</sup> involucionadas permanece aumentado con respecto a las hembras *AREG*<sup>-/-</sup> adultas vírgenes, aunque a partir de la segunda gestación se observan expansiones de las MaSCs transitorias con cada gestación, similares a las observadas en las hembras silvestres.

Las MaECs de los machos también son capaces de generar mamosferas cuando se siembran en las condiciones adecuadas de cultivo (Diaz-Guerra et al., 2012), aunque no sabíamos realmente si las células capaces de generar las mamosferas eran MaSCs o no. Reconstituimos glándulas mamarias funcionales a partir de trasplantes de MaECs de macho en estromas de hembras receptoras. Además, observamos reconstituciones en trasplantes seriados, demostrando así que los machos tenían una población de MaSCs con capacidad de autorrenovación y diferenciación a todos los tipos celulares que componen el tejido cuando se encuentran en un contexto hormonal de hembra. Sin embargo, las mamas de macho trasplantadas con MaECs de hembra (o de macho) no se regeneran.

Los datos que demuestran la reconstitución de una glándula mamaria de una hembra a partir del trasplante de células de macho indican que las MaSCs de macho son capaces de responder a las señales hormonales que reciben en un momento dado. Sin embargo, para determinar si el contexto hormonal en el que hubiesen estado anteriormente era relevante o no, trasplantamos en glándulas mamarias de hembra una mezcla de MaECs de hembra y macho. Observamos que las MaSCs de las hembras son las que regeneran la mayor parte glándula mamaria, de manera que el contexto hormonal de las MaSCs previo al trasplante influye en su capacidad regenerativa.

Además, estos datos son reminiscentes del fenómeno de competición celular que se observó por primera vez en la mosca del vinagre (Morata and Lawrence, 1975), y que recientemente el grupo de Miguel Torres ha demostrado durante la embriogénesis temprana en un modelo de ratón, donde las células más aptas inducen la muerte de las menos aptas, de manera que sólo las primeras pasan a formar parte del organismo, sin embargo, cuando se impide la competición celular, las células menos aptas contribuyen a la formación del organismo (Claveria et al., 2013).

## **Tumorogénesis en la glándula mamaria**

En 20 años, la mortalidad asociada al tumor mamario ha descendido el 25%, y esto se debe a la mejora en el diagnóstico y en estrategias de tratamiento (Yue et al., 2013). Sin embargo, la incidencia se mantiene elevada, ya que el tumor de mama es el principal tumor que desarrollan las mujeres (Siegel et al., 2012). Para reducir la incidencia se requiere el desarrollo de métodos de prevención efectivos, y para esto se requiere el entendimiento del mecanismo molecular de la carcinogénesis.

Distintos trabajos han demostrado que el estrógeno aumenta el riesgo de desarrollar tumores mamarios, sin embargo, se sugieren varios y diferentes mecanismos de actuación del estrógeno en la carcinogénesis de la glándula mamaria. Mientras que algunos autores destacan que el suministro de estrógenos implica aumento en la proliferación celular en la glándula mamaria, observándose en humanos en las unidades terminales lobulares de la mama (TDLUs), lugar donde se desarrollan los tumores mamarios (Hofseth et al., 1999), sugiriendo que este mecanismo fuera el desencadenante del desarrollo tumoral (Preston-Martin et al., 1990), otros autores proponen que sean los metabolitos del estrógeno los encargados de la tumorogénesis. Dichos metabolitos producen daños en el DNA (Cavaliere et al., 2006), y en líneas celulares procedentes de tumores ER<sup>-</sup>, se ha demostrado que éstos son los encargados de la transformación maligna (Russo et al., 2006; Russo et al., 2002). Además, las mujeres con alta concentración de metabolitos del estrógeno en la orina, presentan un mayor riesgo de desarrollar tumores mamarios (Gaikwad et al., 2008; Gaikwad et al., 2009), al igual que las mujeres pre-menopáusicas con polimorfismo en los genes que metabolizan el estrógeno (Park et al., 2004). También se ha planteado que los desencadenantes de la tumorogénesis fueran factores de transcripción y microRNAs sintetizados a partir de la ruta de señalización del estrógeno (Manavathi et al., 2013). La continuada señalización por estrógeno, además de aumentar la síntesis de Ciclina D1, que en la glándula mamaria está relacionada con el desarrollo de tumores (Sabbah et al., 1999), afecta indirectamente a la reparación del DNA, retrasándola, mecanismo que da soporte a la tumorogénesis (Tommiska et al., 2008).

A día de hoy, no se conoce el mecanismo preciso de actuación del estrógeno mediando la carcinogénesis en la glándula mamaria, aunque si es conocida su función en las MaSCs. El estrógeno sintetizado durante la pubertad es el encargado de la expansión de las MaSCs, y con ello del aumento de divisiones de progenitores y células más

diferenciadas, ya que se mantiene la relación de 1 MaSC por cada 500 MaECs en todas las etapas del desarrollo de la glándula mamaria (Diaz-Guerra et al., 2012). Este mecanismo podría ser relevante en la tumorigénesis ya que las divisiones y el aumento de la celularidad aumentan la probabilidad de acumular mutaciones, y con ello el desarrollo de tumores. De esta forma, el número de MaSCs, y con ello la celularidad del epitelio mamario, presente en los machos, en las hembras prepúberes, y en las hembras adultas, proporciona una base celular que explicaría el descenso de hasta 100 veces en la frecuencia de cáncer de mama en hombres, así como en mujeres prepúberes, en comparación con mujeres adultas (Horner et al., 2009). Este descenso podría estar relacionado con la ausencia de divisiones simétricas de las MaSCs, ya que en los hombres, como en las mujeres prepúberes, no se observa aumento en el número de MaSCs (Diaz-Guerra et al., 2012).

Para analizar si la expansión de las MaSCs estaría implicada en la aparición de tumores de mama, modulamos la expansión; bien disminuyéndola, bien aumentándola, en las ratonas del modelo animal MMTV-Neu, en el que el 100% de las ratonas desarrollan tumores en un periodo de 8 meses. La ausencia de expansión de las MaSCs en ratonas MMTV-Neu, las cuales fueron ovariectomizadas a las 3 semanas de edad, implicó que sólo un bajo porcentaje de las ratonas desarrollaran tumores, y que éstos aparecieran con una cinética más lenta. Además, ovariectomizando las hembras a tiempos más tardíos se aumentaba el porcentaje de ratonas que desarrollaban tumores, y la cinética de éstos. El 63% de las ratonas ovariectomizadas a las 8 semanas de edad, las cuales habían estado expuestas a los estrógenos durante la pubertad, desarrollaron tumores con una cinética similar a las hembras control. Este porcentaje podría ser mayor, pero en esta cepa, y a esta edad, la elongación de los ductos en las hembras no ha finalizado, observándose una elongación ductal completa a tiempos más largos, y con ello la completa expansión de las MaSCs. La expansión de las MaSCs en respuesta al estrógeno liberado durante la pubertad está altamente relacionada con el desarrollo de los tumores mamarios en este modelo transgénico en el que se sobre-expresa la proteína Neu, aunque ésta deba ser activada para ser funcional. Sin embargo, en modelos transgénicos que expresan de manera constitutiva una proteína Neu activa, el papel de la expansión de las MaSCs es más restringido, ya que el 60% de las ratonas desarrollan tumores tras haber sido ovariectomizadas a las 3 semanas de edad (Hewitt et al., 2002). Esta diferencia podría explicarse de manera que las ratonas que sobre-expresan Neu inactiva necesitan una mutación adicional en dicho gen que active la proteína para inducir tumores mamarios, mientras que las ratonas que sobre-expresan la proteína activa no requieren de mutaciones adicionales. La expansión de las MaSCs en respuesta al estrógeno está relacionada con las divisiones de las MaSCs y de los progenitores, y las divisiones y el aumento de la celularidad aumentan la probabilidad de acumular mutaciones, entre otras, la mutación adicional en el gen *Neu* que lo hagan activo, y con ello el desarrollo de tumores.

El estrógeno sintetizado durante la pubertad, y con ello la expansión de las MaSCs, también está implicado en la cinética de aparición de los tumores mamarios en nuestro modelo de ratón. Sin embargo, se sugería que la relación que existía entre el

estrógeno y la cinética de los tumores podría deberse a que la ruta de señalización de ER $\alpha$  interacciona con la ruta de RTK (Smith, 1998), la cual está altamente implicada en el desarrollo de tumores mamarios, y se activa mediante la unión de un ligando desconocido al heterodímero que forma Neu con otro receptor de la familia EGF (Holbro et al., 2003).

Desafortunadamente, no hemos podido analizar si el aumento de la expansión de las MaSCs durante sucesivas pubertades tenía un efecto en tumorigenicidad, ya que los trasplantes de células MMTV-Neu en hembras receptoras FVB no generaron tumores, a pesar de que sí eran capaces de reconstituir la glándula mamaria.

Por otra parte, los machos MMTV-Neu, que tienen la misma celularidad que las hembras prepúberes, no desarrollan tumores. Sin embargo, los machos, presentan un contexto hormonal diferente al de las hembras prepúberes, ya que en ellos hay presencia de andrógenos, y se ha descrito que éstos regulan la proliferación de las MaECs actuando en balance con la concentración de estrógeno (Labrie, 2006). En hombres que tienen aumentada la actividad de la aromatasa, enzima que produce estrógenos a partir de andrógenos (Binder et al., 2005; Braunstein, 2007), y en hombres tratados con flutamida, cuya función es el bloqueo de los receptores de andrógeno (ARs) (Braunstein, 2007), se observa ginecomastia (engrandecimiento patológico de una o ambas glándulas mamarias en el hombre causado por la proliferación celular). Asimismo, el aumento del nivel de andrógenos en las mujeres suprime el desarrollo normal de las glándulas mamarias, a pesar de la presencia del nivel de estrógeno adecuado (Forsbach et al., 2000).

Además de que los andrógenos regulen la proliferación celular en la glándula mamaria, algunos tumores mamarios presentan una elevada expresión de receptores de andrógenos (ARs) (Kvinnslund and Bormer, 1982; Mercer et al., 1983; Persijn et al., 1975; Trams and Maass, 1977). Estos datos insinúan que la señalización llevada a cabo por los andrógenos podría tener un papel importante en la carcinogénesis mamaria, sin embargo, existen resultados contradictorios en el estudio de la función de los andrógenos (Dimitrakakis, 2011); los andrógenos pueden estimular/inhibir el crecimiento de las células cancerosas mamarias (Anderson et al., 1978; Hall et al., 1994; Marugo et al., 1992; Ratko et al., 1991; Schwartz, 1979). Debido a que los andrógenos son sustrato para la producción de estrógeno, y que el tratamiento a largo plazo con estrógeno aumenta el riesgo de desarrollar tumores mamarios en hombres y mujeres (Helzlsouer et al., 1994), parece que la contribución de los andrógenos al riesgo de desarrollar tumores mamarios sea a través de su conversión en estrógeno. Además, que los andrógenos actúen verdaderamente como andrógenos promoviendo los tumores mamarios es justo lo contrario a los datos clínicos, ya que los hombres, que tienen los niveles de andrógenos altos crónicamente, tienen menos del 1% de riesgo en el desarrollo de tumores de mama (Giordano et al., 2002), y que las mujeres con ovarios poliquísticos, las cuales presentan altos niveles de andrógenos, no tienen aumentado el riesgo de padecer tumores mamarios (Gadducci et al., 2005). En definitiva, todos estos datos sugieren que los andrógenos en los machos presenten un efecto protector contra el desarrollo del cáncer de mama. Las altas concentraciones de

andrógenos impiden la expansión de las MaSCs, y con ello la probabilidad de adquirir las mutaciones pertinentes para generar la MaCSC.

Relacionar la expansión de las MaSCs con tumorigénesis también podría explicar el hecho de que un mayor número de ciclos menstruales (temprana menarquia y menopausia tardía) se correlaciona con el aumento del riesgo de desarrollar tumores mamarios (Kelsey et al., 1993), ya que la progesterona sintetizada con cada ciclo estral produce una expansión transitoria de las MaSCs (Joshi et al., 2010), y cuantos más ciclos, más expansiones, y más aumentaría la probabilidad de acumular mutaciones en dichas células o en los progenitores, y por tanto desarrollar un tumor mamario. Sin embargo, con las gestaciones, a pesar de que hay expansión de las MaSCs, el proceso de diferenciación durante la gestación y el de apoptosis durante la involución de la glándula mamaria tras el destete disminuyen la susceptibilidad a la carcinogénesis (Albrektsen et al., 2005; MacMahon et al., 1970). Además, cuando la gestación se da en una edad temprana, tanto en humanos como en ratones, se reduce el riesgo de desarrollar tumores, ya que disminuye el número de células luminales con receptores hormonales y con ello la síntesis de wnt4, que disminuye el potencial de proliferación (Choudhury et al., 2013; Meier-Abt et al., 2013). Se ha sugerido que la gestación temprana también induce alteraciones a niveles hormonales, factores de crecimiento y composición del estroma (Britt et al., 2007; Russo and Russo, 2011), aunque se desconoce la ausencia de estos cambios cuando la gestación no se da a una temprana edad (Meier-Abt and Bentires-Alj, 2013).

Los estudios sobre tumorigénesis en modelos animales, además de determinar que la expansión de las MaSCs es relevante en el desarrollo de tumores, también sugieren la importancia del estroma en este proceso. Los trasplantes de MaECs de hembras MMTV-Neu en estromas de ratonas receptoras FVB regeneran las glándulas mamarias, aunque éstas no desarrollan tumores, demostrando de esta forma que el estroma de las ratonas MMTV es relevante en el desarrollo de tumores del modelo animal MMTV-Neu. También es importante el estroma al inducir tumores mamarios en rata con NMU (N-Metil-nitrosourea), ya que la transformación neoplásica de las MaECs requiere la exposición del estroma al NMU (Maffini et al., 2004). La identificación de las señales liberadas por los componentes del estroma: fibroblastos (Liao et al., 2009), adipocitos (Park and Scherer, 2012), y matriz extracelular (Lu et al., 2012), que hacen que las MaECs no desarrollen tumores, podrían sugerir nuevas líneas en la investigación contra el cáncer (Egeblad et al., 2010; Finak et al., 2008; Soto and Sonnenschein, 2011).

El fondo genético de los ratones transgénicos MMTV-Neu también influye en el desarrollo de tumores, ya que, a pesar de que la expresión del transgén Neu en homocigosis o heterocigosis no altera la cantidad de proteína Neu (Rowse et al., 1998), y de que no se detecten diferencias en el desarrollo de tumores entre hembras homocigotas o heterocigotas, siempre y cuando el fondo genético sea FVB, las hembras heterocigotas para el transgén Neu, que son 50% FVB y 50% C57Bl/6, presentan glándulas mamarias con fenotipo similar a las glándulas mamarias silvestres, y a los 20 meses aún no han desarrollado tumores. Se ha sugerido que la

cepa de ratones FVB sería defectiva en genes supresores de tumores que poseen los animales de la cepa C57B/I6, los cuales regularían la inducción tumoral (Rowse et al., 1998).

### **Células tumorales mamarias (MaTCs) y células madre del cáncer de mama (MaCSCs)**

Las células que componen los tumores mamarios desarrollados en las hembras MMTV-Neu (MMTV-Neu MaTCs) desarrollan tumores cuando son trasplantadas en estromas de hembras receptoras silvestres. Además, generan tumores independientemente de que los estromas estén libres de epitelio o completamente rellenos de ductos. Sin embargo, al trasplantar una mezcla de MaTCs con MaECs de hembras adultas, se regeneran glándulas mamarias completas, las cuales presentan MaECs que derivan de las MaECs y de las MaTCS trasplantadas, y no desarrollan tumores (Booth et al., 2011; Bussard and Smith, 2012). Estos datos sugieren que las señales procedentes de estromas y de MaECs silvestres, en condiciones de trasplante, cambiarían el potencial tumorigénico de las MaTCs, y permitirían la contribución de éstas al desarrollo normal de la glándula mamaria.

Las MaTCs sembradas *in vitro*, en condiciones de crecimiento de mamosferas, generan tumorosferas (esferas no adherentes compuestas por MaCSCs y progenitores tumorales), siendo las células madre tumorales mamarias (MaCSCs) las únicas células capaces de generarlas (Ponti et al., 2005). Además, las tumorosferas se pueden obtener en condiciones de cultivo donde cada tumorosfera tenga un origen clonal, y podemos obtener, tras el trasplante de una única tumorosfera, tumores mamarios en los dos meses siguientes al trasplante con una frecuencia elevada (frecuencia  $1/1,29 \pm 2SD$   $1/1,13-1/1,56$ ). Las tumorosferas procedentes de tumores MMTV-Neu poseen un fenotipo compacto y aparentemente delimitadas por una capa celular, similar al descrito por Liu y colaboradores (Liu et al., 2007), y los tumores obtenidos tras el trasplante de una tumorosfera generan tumores en trasplantes seriados, demostrando la existencia de, por lo menos una MaCSC en cada tumorosfera. Todos estos datos nos permiten utilizar la capacidad de formación de tumorosferas como medida de cuantificación de las MaCSCs. De esta forma hemos determinado que el 0,95% de las MaTCs de un tumor desarrollado en una hembra MMTV-Neu son MaCSCs, frecuencia similar a la determinada mediante la realización de trasplantes por dilución límite (Vaillant et al., 2008). Además, podemos utilizar esta capacidad como ensayo para determinar el posible enriquecimiento en MaCSCs en distintas poblaciones de células tumorales. La población CD24<sup>+</sup> de las MaTCs está enriquecida en MaCSCs, mientras que no hay MaCSCs en la población CD24<sup>-</sup>, dato similar al obtenido por Liu y colaboradores (Liu et al., 2007). También observamos enriquecimiento en la población CD29<sup>alta</sup> y en la población C-Kit<sup>alta</sup>. Sin embargo, éstas poblaciones representan un alto porcentaje dentro de las MaTCs, y las MaCSCs sólo representan el 0,95%. Mediante dobles marcajes hemos determinado que las poblaciones CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> y CD24<sup>+</sup>C-kit<sup>alta</sup>, que representan el 5,2% y 1,71% de las MaTCs

respectivamente, están enriquecidas en MaCSCs (frecuencia  $1/261 \pm 2SD$   $1/584-1/116$ ). Datos reminiscentes de que la sobreexpresión del gen Neu en ratón transforma dos tipos de células en MaCSCs.

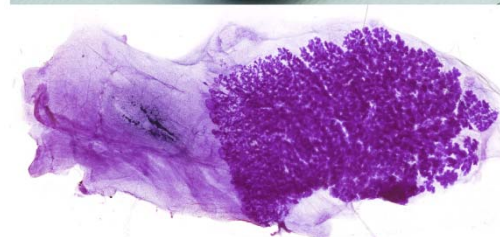
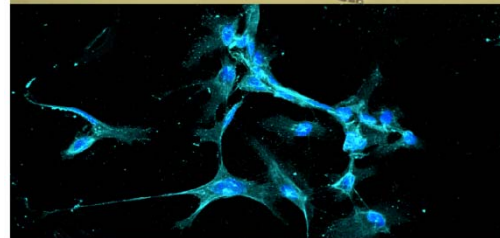
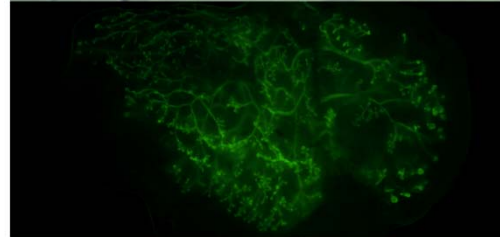
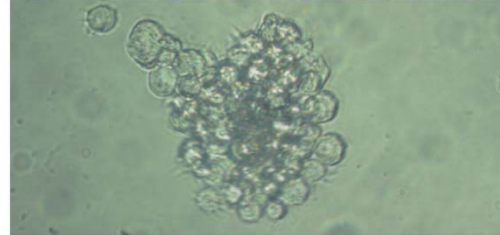
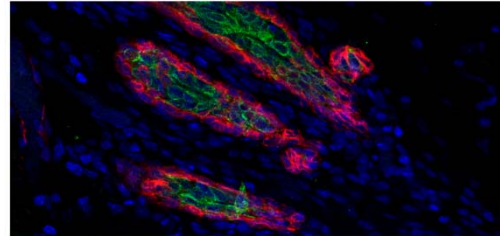
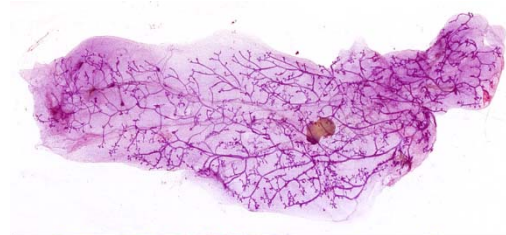
En los tumores mamarios basales generados en los ratones BRACA1<sup>-</sup>/p53<sup>+/-</sup> también se utilizan los marcadores que definen las MaSCs (CD24 y CD29) para el aislamiento de la población enriquecida en MaCSCs, siendo ésta CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> (Vassilopoulos et al., 2008). El hecho de no poder distinguir fenotípicamente entre MaSCs y MaCSCs es un gran problema a la hora de atacar a las MaCSCs sin alterar las MaSCs, sin embargo, si se determinaran diferencias entre ambos tipos celulares, se podría atacar a las MaCSCs sin alterar la homeostasis del órgano, ya que las MaSCs se mantendrían después de aplicar la terapia antitumoral. Debido a que en los tumores basales hay sobreexpresión de C-kit (Nielsen et al., 2004; Simon et al., 2004), siendo la pérdida de BRACA1 la responsable del aumento de expresión de C-kit (proteína transmembrana con actividad tirosina-kinasa) en el progenitor luminal (Smart et al., 2011), célula que origina el tumor, se ha utilizado una terapia antitumoral focalizada en la sobreexpresión de C-kit. De esta forma, se podría atacar al tumor sin alterar las MaSCs, ya que éstas no expresan C-kit. En éste caso, la terapia consistía en el bloqueo de la ruta de señalización de C-kit, sin embargo, esta terapia no tuvo éxito, y el fallo se debe a que los tumores basales tienen aumentada la expresión de Lyn (Molyneux et al., 2010). La terapia bloquea C-kit, y con ello su ruta de señalización, pero la ruta de señalización de Lyn activa la ruta de señalización de C-kit, y con ello la supervivencia de estas células (Regan et al., 2011).

Los modelos animales no siempre son representativos de lo que realmente pasa en humanos, ya que en dichos modelos, las mutaciones oncogénicas pueden ocurrir en tipos celulares distintos a los de la enfermedad humana, y la frecuencia de expresión del transgén varía dependiendo del promotor utilizado (Visvader and Lindeman, 2008). Lo mismo ocurre con el estudio de MaCSCs en líneas celulares establecidas a partir de tipos tumorales, ya que el continuo pase de las células permite cambiar las características y la adquisición de aberraciones genéticas. Recientemente se ha publicado que distintas líneas tumorales procedentes de tumores del mismo tipo diferían en formación de tumorosferas, incluso en el fenotipo y en los marcadores que expresan las células que las componen, haciendo confusa la distinción entre células tumorogénicas y no tumorogénicas (Lehmann et al., 2012). Estos datos determinan que las observaciones realizadas en modelos animales o líneas celulares se deben estudiar en los tumores primarios para validarlas. Sin embargo, los estudios de las MaCSCs mediante trasplantes a partir de tumores primarios también pueden resultar confusos ya que; al realizar xenotrasplantes las citoquinas y factores de transcripción del estroma no son los mismos, el sistema inmune puede actuar contra las células trasplantadas, los sitios de trasplante (subcutáneo o cápsulas suprarrenales) no presentan las mismas características, y que los componentes del matrigel en algunos casos favorece la tumorogénesis (Visvader and Lindeman, 2008).

## Biología de la glándula mamaria en machos

Los ratones machos, al igual que las hembras, poseen tejido epitelial mamario, aunque rudimentario, compuesto por ductos, en los que se observan células mioepiteliales que expresan  $\alpha$ -SMA y células ductales que expresan TROMA-I. Sin embargo, la expresión de TROMA-I en las células ductales desaparece totalmente a las 23 semanas de edad. Este bloqueo de la diferenciación luminal es causado por los andrógenos, ya que los machos castrados a las 3 semanas de edad no presentan dicho bloqueo. No obstante, cuando se trasplantan MaECs de macho que no expresan TROMA-I, en estromas mamarios de hembras, las MaSCs son capaces de regenerar glándulas mamarias con células ductales que expresan TROMA-I, determinando que en el contexto hormonal de hembra el bloqueo de la diferenciación luminal es reversible. Posteriormente, analizamos la expresión de genes en hembras adultas, machos adultos, que tienen bloqueada la diferenciación luminal, y machos adultos castrados a las 3 semanas de edad, en los cuales se observa la diferenciación luminal. Analizamos la expresión de los genes; *Stat5A*, *Elf5*, *Notch1* y *Gata3*, que son genes implicados en la diferenciación luminal (Asselin-Labat et al., 2007; Bouras et al., 2008; Oakes et al., 2008; Yamaji et al., 2009; Zhou et al., 2005). Su expresión variaba en los machos adultos con respecto a las hembras, dato que podría ser relevante, ya que en las hembras adultas las células ductales expresan el marcador ductal TROMA-I y en los machos adultos no. Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión entre machos adultos y machos castrados, los cuales, debido a la ausencia de andrógenos, expresan TROMA-I en las células ductales. De esta forma podemos descartar que los andrógenos actúen directa o indirectamente en la expresión de dichos genes, permitiendo así el bloqueo de la diferenciación luminal. El gen (o genes), regulado por los andrógenos y determinante del bloqueo de la diferenciación luminal, podría ser una posible diana terapéutica para los tumores luminales que se desarrollan en las células ductales (50% de los tumores mamarios) si el bloqueo en la diferenciación luminal repercutiera en el desarrollo de tumores luminales.

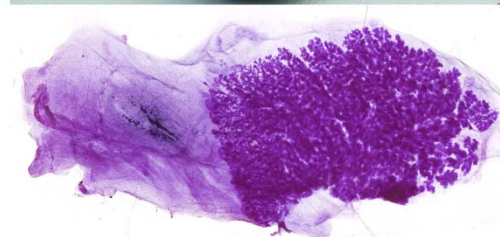
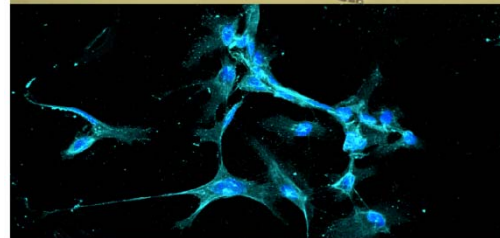
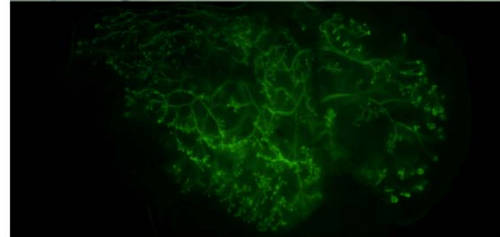
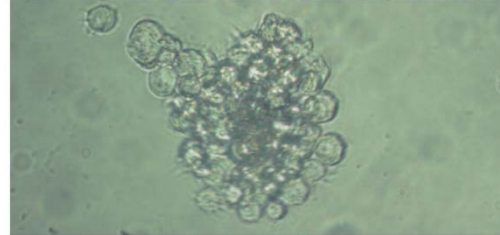
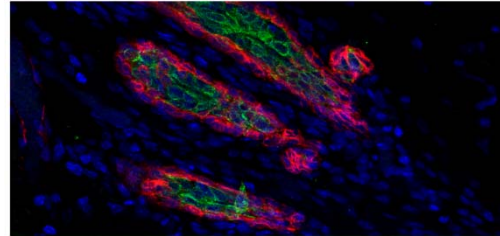
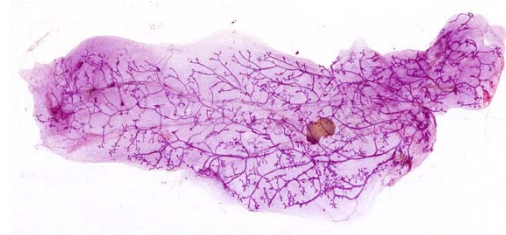
**CONCLUSIONES**



- La población CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> de las MaECs está enriquecida en MaSCs, al menos 36 veces, en comparación con las MaECs
- Las hormonas liberadas durante el ciclo estral son suficientes para la reconstitución de una glándula mamaria. Sin embargo, el contexto hormonal del macho no permite la regeneración de la glándula mamaria.
- La mamosfera contiene una célula madre con propiedades de autorrenovación y diferenciación a todos los tipos celulares que componen el tejido mamario. Se puede utilizar la capacidad de formación de mamosferas como una manera alternativa y sencilla de cuantificar el número de MaSCs.
- Los machos, al igual que las hembras, tienen una población MaSCs capaces de desarrollar una glándula mamaria en un contexto hormonal de hembra. Las MaSCs de hembra son más aptas que las de macho en la regeneración de la glándula mamaria.
- El estrógeno es el responsable de la expansión de las MaSCs que se observa durante la pubertad.
- La expansión de las MaSCs influye en la frecuencia y la cinética de aparición de tumores en las ratonas transgénicas MMTV-Neu.
- Es necesaria, aunque no suficiente, la expresión del transgén Neu en las células epiteliales mamarias para que los ratones desarrollen tumores mamarios.
- Las MaTCs, que tienen un fenotipo distinto a las MaECs, generan tumores similares a los tumores primarios, sin importar el contexto hormonal que presenten los receptores.
- La tumorosfera contiene, al menos, una MaCSC capaz de desarrollar un tumor mamario similar al tumor primario. Se puede utilizar la capacidad de formación de tumorosferas como medida de cuantificación de las MaCSCs.
- Las poblaciones CD24<sup>+</sup>CD29<sup>alta</sup> y CD24<sup>+</sup>C-kit<sup>alta</sup> de las MMTV-Neu MaTCs están enriquecidas en MaCSCs.
- A diferencia de las hembras y de los machos prepúberes, los machos adultos carecen de marcadores de células lumbales. Los andrógenos son los responsables del bloqueo en la diferenciación luminal, y dicho bloqueo es reversible cuando los machos se castran a las 3 semanas de edad. Esta reversión también ocurre tras el trasplante de células de macho en hembras.
- En los machos, la presencia o ausencia de andrógenos no influye en la expresión de los genes; *Stat5A*, *Elf5*, *Notch1* y *Gata3*, implicados en la diferenciación luminal.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Ablett, M.P., Singh, J.K., and Clarke, R.B. (2012). Stem cells in breast tumours: Are they ready for the clinic? *Eur J Cancer* 48, 2104-2116.
- Adams, J.C., and Watt, F.M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117, 1183-1198.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.
- Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S., and Kvale, G. (2005). Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Br J Cancer* 92, 167-175.
- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L.F. (2009). Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer cell* 15, 45-56.
- Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M., and Clark, G.M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11, 155-168.
- Anderson, L.M., Teller, M.N., Budinger, J.M., and Brown, G.B. (1978). Increased incidence of mammary tumors in rats after direct or transplacental exposure to 3-hydroxyxanthine. *J Natl Cancer Inst* 61, 1411-1414.
- Andres, A.C., and Strange, R. (1999). Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 221-228.
- Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., and Mark, M. (2008). Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2433-2438.
- Asch, H.L., and Asch, B.B. (1985). Expression of keratins and other cytoskeletal proteins in mouse mammary epithelium during the normal developmental cycle and primary culture. *Dev Biol* 107, 470-482.
- Asselin-Labat, M.L., Shackleton, M., Stingl, J., Vaillant, F., Forrest, N.C., Eaves, C.J., Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2006). Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells. *J Natl Cancer Inst* 98, 1011-1014.
- Asselin-Labat, M.L., Sutherland, K.D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N.C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F.G., van der Wees, J., *et al.* (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature cell biology* 9, 201-209.
- Asselin-Labat, M.L., Vaillant, F., Sheridan, J.M., Pal, B., Wu, D., Simpson, E.R., Yasuda, H., Smyth, G.K., Martin, T.J., Lindeman, G.J., *et al.* (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 465, 798-802.
- Bailleul, B., Surani, M.A., White, S., Barton, S.C., Brown, K., Blessing, M., Jorcano, J., and Balmain, A. (1990). Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* 62, 697-708.

- Barabe, F., Kennedy, J.A., Hope, K.J., and Dick, J.E. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science (New York, NY)* *316*, 600-604.
- Barcellos-Hoff, M.H., Aggeler, J., Ram, T.G., and Bissell, M.J. (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* *105*, 223-235.
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., *et al.* (2010). Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* *6*, 25-36.
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* *457*, 608-611.
- Beatson, G. (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* *2*, 104-107.
- Beleut, M., Rajaram, R.D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Germano, D., Choi, Y., Schneider, P., and Brisken, C. (2010). Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 2989-2994.
- Binder, G., Iliev, D.I., Dufke, A., Wabitsch, M., Schweizer, R., Ranke, M.B., and Schmidt, M. (2005). Dominant transmission of prepubertal gynecomastia due to serum estrone excess: hormonal, biochemical, and genetic analysis in a large kindred. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 484-492.
- Bocchinfuso, W.P., Lindzey, J.K., Hewitt, S.C., Clark, J.A., Myers, P.H., Cooper, R., and Korach, K.S. (2000). Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* *141*, 2982-2994.
- Bonner-Weir, S., and Sharma, A. (2002). Pancreatic stem cells. *J Pathol* *197*, 519-526.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* *3*, 730-737.
- Booth, B.W., Boulanger, C.A., Anderson, L.H., and Smith, G.H. (2011). The normal mammary microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of mouse mammary tumor virus-neu-transformed mammary tumor cells. *Oncogene* *30*, 679-689.
- Booth, B.W., Mack, D.L., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R.D., Boulanger, C.A., and Smith, G.H. (2008). The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 14891-14896.
- Boulanger, C.A., Mack, D.L., Booth, B.W., and Smith, G.H. (2007). Interaction with the mammary microenvironment redirects spermatogenic cell fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 3871-3876.

- Bouras, T., Pal, B., Vaillant, F., Harburg, G., Asselin-Labat, M.L., Oakes, S.R., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2008). Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell* 3, 429-441.
- Braunstein, G.D. (2007). Clinical practice. Gynecomastia. *N Engl J Med* 357, 1229-1237.
- Bray, F., McCarron, P., and Parkin, D.M. (2004). The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res* 6, 229-239.
- Brisken, C., Ayyannan, A., Nguyen, C., Heineman, A., Reinhardt, F., Tan, J., Dey, S.K., Dotto, G.P., and Weinberg, R.A. (2002). IGF-2 is a mediator of prolactin-induced morphogenesis in the breast. *Dev Cell* 3, 877-887.
- Brisken, C., and Duss, S. (2007). Stem cells and the stem cell niche in the breast: an integrated hormonal and developmental perspective. *Stem Cell Rev* 3, 147-156.
- Brisken, C., Heineman, A., Chavarria, T., Elenbaas, B., Tan, J., Dey, S.K., McMahon, J.A., McMahon, A.P., and Weinberg, R.A. (2000). Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev* 14, 650-654.
- Brisken, C., Kaur, S., Chavarria, T.E., Binart, N., Sutherland, R.L., Weinberg, R.A., Kelly, P.A., and Ormandy, C.J. (1999). Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol* 210, 96-106.
- Brisken, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003178.
- Brisken, C., Park, S., Vass, T., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., and Weinberg, R.A. (1998). A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5076-5081.
- Britt, K., Ashworth, A., and Smalley, M. (2007). Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 14, 907-933.
- Brown, K., Strathdee, D., Bryson, S., Lambie, W., and Balmain, A. (1998). The malignant capacity of skin tumours induced by expression of a mutant H-ras transgene depends on the cell type targeted. *Curr Biol* 8, 516-524.
- Bussard, K.M., and Smith, G.H. (2012). Human breast cancer cells are redirected to mammary epithelial cells upon interaction with the regenerating mammary gland microenvironment in-vivo. *PLoS One* 7, e49221.
- Campbell, L.L., and Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 6, 2332-2338.
- Caussinus, E., and Hirth, F. (2007). Asymmetric stem cell division in development and cancer. *Prog Mol Subcell Biol* 45, 205-225.
- Cavaliere, E., Chakravarti, D., Guttenplan, J., Hart, E., Ingle, J., Jankowiak, R., Muti, P., Rogan, E., Russo, J., Santen, R., *et al.* (2006). Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochim Biophys Acta* 1766, 63-78.
- Ciarloni, L., Mallepell, S., and Brisken, C. (2007). Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5455-5460.

- Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C.E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Brisken, C., Minucci, S., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 138, 1083-1095.
- Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S., and Hynes, R.O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406, 532-535.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66, 9339-9344.
- Claveria, C., Giovinazzo, G., Sierra, R., and Torres, M. (2013). Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* 500, 39-44.
- Clemons, M., and Goss, P. (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344, 276-285.
- Cowin, P., and Wysolmerski, J. (2010). Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003251.
- Croker, A.K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B.D., Hess, D.A., and Allan, A.L. (2009). High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med* 13, 2236-2252.
- Cunha, G.R., Young, P., Christov, K., Guzman, R., Nandi, S., Talamantes, F., and Thordarson, G. (1995). Mammary phenotypic expression induced in epidermal cells by embryonic mammary mesenchyme. *Acta Anat (Basel)* 152, 195-204.
- Curtis Hewitt, S., Couse, J.F., and Korach, K.S. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2, 345-352.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., *et al.* (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 69, 1302-1313.
- Choudhury, S., Almendro, V., Merino, V.F., Wu, Z., Maruyama, R., Su, Y., Martins, F.C., Fackler, M.J., Bessarabova, M., Kowalczyk, A., *et al.* (2013). Molecular profiling of human mammary gland links breast cancer risk to a p27(+) cell population with progenitor characteristics. *Cell Stem Cell* 13, 117-130.
- Chu, E.Y., Hens, J., Andl, T., Kairo, A., Yamaguchi, T.P., Brisken, C., Glick, A., Wysolmerski, J.J., and Millar, S.E. (2004). Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development* 131, 4819-4829.
- Daniel, C.W., De Ome, K.B., Young, J.T., Blair, P.B., and Faulkin, L.J., Jr. (1968). The *in vivo* life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands: a serial transplantation study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 53-60.

Daniel, C.W., Silberstein, G.B., and Strickland, P. (1987). Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Res* 47, 6052-6057.

Daniel, C.W., and Young, L.J. (1971). Influence of cell division on an aging process. Life span of mouse mammary epithelium during serial propagation in vivo. *Exp Cell Res* 65, 27-32.

DeOme, K.B., Faulkin, L.J., Jr., Bern, H.A., and Blair, P.B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* 19, 515-520.

Diaz-Guerra, E., Lillo, M.A., Santamaria, S., and Garcia-Sanz, J.A. (2012). Intrinsic Cues and Hormones Control Mouse Mammary Epithelial Tree Size. *The FASEB Journal* *in press*.

Dimitrakakis, C. (2011). Androgens and breast cancer in men and women. *Endocrinol Metab Clin North Am* 40, 533-547, viii.

Donovan, P.J. (1998). The germ cell--the mother of all stem cells. *The International journal of developmental biology* 42, 1043-1050.

Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., and Wicha, M.S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17, 1253-1270.

Dulbecco, R., Allen, W.R., Bologna, M., and Bowman, M. (1986). Marker evolution during the development of the rat mammary gland: stem cells identified by markers and the role of myoepithelial cells. *Cancer Res* 46, 2449-2456.

Dunbar, M.E., Dann, P.R., Robinson, G.W., Hennighausen, L., Zhang, J.P., and Wysolmerski, J.J. (1999). Parathyroid hormone-related protein signaling is necessary for sexual dimorphism during embryonic mammary development. *Development* 126, 3485-3493.

Durnberger, H., and Kratochwil, K. (1980). Specificity of tissue interaction and origin of mesenchymal cells in the androgen response of the embryonic mammary gland. *Cell* 19, 465-471.

Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 18, 884-901.

Eirew, P., Stingl, J., and Eaves, C.J. (2010). Quantitation of human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative properties using a subrenal capsule xenotransplantation assay. *Nat Protoc* 5, 1945-1956.

Eirew, P., Stingl, J., Raouf, A., Turashvili, G., Aparicio, S., Emerman, J.T., and Eaves, C.J. (2008). A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nature medicine* 14, 1384-1389.

Fadok, V.A. (1999). Clearance: the last and often forgotten stage of apoptosis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 203-211.

Fata, J.E., Chaudhary, V., and Khokha, R. (2001). Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle. *Biol Reprod* 65, 680-688.

- Fata, J.E., Kong, Y.Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R.A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E.B., Lacey, D.L., *et al.* (2000). The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 103, 41-50.
- Feinleib, M. (1968). Breast cancer and artificial menopause: a cohort study. *J Natl Cancer Inst* 41, 315-329.
- Ferguson, J.E., Schor, A.M., Howell, A., and Ferguson, M.W. (1992). Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle. *Cell Tissue Res* 268, 167-177.
- Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., *et al.* (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature medicine* 14, 518-527.
- Foley, J., Dann, P., Hong, J., Cosgrove, J., Dreyer, B., Rimm, D., Dunbar, M., Philbrick, W., and Wysolmerski, J. (2001). Parathyroid hormone-related protein maintains mammary epithelial fate and triggers nipple skin differentiation during embryonic breast development. *Development* 128, 513-525.
- Forbes, J.F., Cuzick, J., Buzdar, A., Howell, A., Tobias, J.S., and Baum, M. (2008). Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 9, 45-53.
- Forsbach, G., Guitron-Cantu, A., Vazquez-Lara, J., Mota-Morales, M., and Diaz-Mendoza, M.L. (2000). Virilizing adrenal adenoma and primary amenorrhea in a girl with adrenal hyperplasia. *Arch Gynecol Obstet* 263, 134-136.
- Foulkes, W.D. (2004). BRCA1 functions as a breast stem cell regulator. *J Med Genet* 41, 1-5.
- Furth, P.A. (1999). Introduction: mammary gland involution and apoptosis of mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 123-127.
- Gadducci, A., Gargini, A., Palla, E., Fanucchi, A., and Genazzani, A.R. (2005). Polycystic ovary syndrome and gynecological cancers: is there a link? *Gynecol Endocrinol* 20, 200-208.
- Gaikwad, N.W., Yang, L., Muti, P., Meza, J.L., Pruthi, S., Ingle, J.N., Rogan, E.G., and Cavalieri, E.L. (2008). The molecular etiology of breast cancer: evidence from biomarkers of risk. *Int J Cancer* 122, 1949-1957.
- Gaikwad, N.W., Yang, L., Pruthi, S., Ingle, J.N., Sandhu, N., Rogan, E.G., and Cavalieri, E.L. (2009). Urine biomarkers of risk in the molecular etiology of breast cancer. *Breast cancer : basic and clinical research* 3, 1-8.
- Gajewska, M., Sobolewska, A., Kozlowski, M., and Motyl, T. (2008). Role of autophagy in mammary gland development. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 9, 237-249.
- Gallego, M.I., Binart, N., Robinson, G.W., Okagaki, R., Coschigano, K.T., Perry, J., Kopchick, J.J., Oka, T., Kelly, P.A., and Hennighausen, L. (2001). Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Dev Biol* 229, 163-175.

- Gidekel Friedlander, S.Y., Chu, G.C., Snyder, E.L., Girnius, N., Dibelius, G., Crowley, D., Vasile, E., DePinho, R.A., and Jacks, T. (2009). Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer cell* 16, 379-389.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., *et al.* (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555-567.
- Giordano, S.H., Buzdar, A.U., and Hortobagyi, G.N. (2002). Breast cancer in men. *Ann Intern Med* 137, 678-687.
- Goldman, J.M., Murr, A.S., and Cooper, R.L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80, 84-97.
- Gonzalez-Suarez, E., Jacob, A.P., Jones, J., Miller, R., Roudier-Meyer, M.P., Ryan Erwert<sup>1</sup>, J.P., Branstetter, D., and Dougall, W.C. (2010). RANKligandmediates progestin-inducedmammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* 468, 103-107.
- Gordon, J.R., and Bernfield, M.R. (1980). The basal lamina of the postnatal mammary epithelium contains glycosaminoglycans in a precise ultrastructural organization. *Dev Biol* 74, 118-135.
- Goss, P.E., Ingle, J.N., Ales-Martinez, J.E., Cheung, A.M., Chlebowski, R.T., Wactawski-Wende, J., McTiernan, A., Robbins, J., Johnson, K.C., Martin, L.W., *et al.* (2011). Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. *N Engl J Med* 364, 2381-2391.
- Gown, A.M. (2008). Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 21 Suppl 2, S8-S15.
- Grimshaw, M.J., Cooper, L., Papazisis, K., Coleman, J.A., Bohnenkamp, H.R., Chiapero-Stanke, L., Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J.M. (2008). Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 10, R52.
- Gudjonsson, T., Villadsen, R., Nielsen, H.L., Ronnov-Jessen, L., Bissell, M.J., and Petersen, O.W. (2002). Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev* 16, 693-706.
- Gusterson, B. (2009). Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer* 9, 128-134.
- Gyorki, D.E., Asselin-Labat, M.L., van Rooijen, N., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2009). Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. *Breast Cancer Res* 11, R62.
- Hall, R.E., Birrell, S.N., Tilley, W.D., and Sutherland, R.L. (1994). MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *Eur J Cancer* 30A, 484-490.
- Hammes, S.R., and Levin, E.R. (2007). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 28, 726-741.

- Hanna, J.H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143, 508-525.
- Haslam, S.Z. (1989). The ontogeny of mouse mammary gland responsiveness to ovarian steroid hormones. *Endocrinology* 125, 2766-2772.
- Haslam, S.Z., and Shyamala, G. (1979). Effect of oestradiol on progesterone receptors in normal mammary glands and its relationship with lactation. *Biochem J* 182, 127-131.
- Haslam, S.Z., and Shyamala, G. (1981). Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among the epithelial, adipose, and connective tissue components of the normal mammary gland. *Endocrinology* 108, 825-830.
- Helzlsouer, K.J., Alberg, A.J., Bush, T.L., Longcope, C., Gordon, G.B., and Comstock, G.W. (1994). A prospective study of endogenous hormones and breast cancer. *Cancer Detect Prev* 18, 79-85.
- Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2001). Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell* 1, 467-475.
- Hens, J.R., and Wysolmerski, J.J. (2005). Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Res* 7, 220-224.
- Heppner, G.H., and Miller, B.E. (1983). Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev* 2, 5-23.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., *et al.* (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 8, R76.
- Heuberger, B., Fitzka, I., Wasner, G., and Kratochwil, K. (1982). Induction of androgen receptor formation by epithelium-mesenchyme interaction in embryonic mouse mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2957-2961.
- Hewitt, S.C., Bocchinfuso, W.P., Zhai, J., Harrell, C., Koonce, L., Clark, J., Myers, P., and Korach, K.S. (2002). Lack of ductal development in the absence of functional estrogen receptor alpha delays mammary tumor formation induced by transgenic expression of ErbB2/neu. *Cancer Res* 62, 2798-2805.
- Hofseth, L.J., Raafat, A.M., Osuch, J.R., Pathak, D.R., Slomski, C.A., and Haslam, S.Z. (1999). Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 4559-4565.
- Holbro, T., Beerli, R.R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C.F., 3rd, and Hynes, N.E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8933-8938.
- Holland, E.C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R.E., and Fuller, G.N. (2000). Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 25, 55-57.

- Hollingsworth, A.B., Lerner, M.R., Lightfoot, S.A., Wilkerson, K.B., Hanas, J.S., McCay, P.B., and Brackett, D.J. (1998). Prevention of DMBA-induced rat mammary carcinomas comparing leuprolide, oophorectomy, and tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 47, 63-70.
- Hope, K.J., Jin, L., and Dick, J.E. (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 5, 738-743.
- Horner, M., Ries, L.A.G., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Howlander, N., Altekruse, S.F., Feuer, E.J., Huang, L., and Mariotto, A. (2009). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. National Cancer Institute Bethesda, MD.
- Hoshino, K., and Gardner, W.U. (1967). Transplantability and life span of mammary gland during serial transplantation in mice. *Nature* 213, 193-194.
- Hovey, R.C., Harris, J., Hadsell, D.L., Lee, A.V., Ormandy, C.J., and Vonderhaar, B.K. (2003). Local insulin-like growth factor-II mediates prolactin-induced mammary gland development. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 17, 460-471.
- Hovey, R.C., Trott, J.F., and Vonderhaar, B.K. (2002). Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 17-38.
- Howard, B.A., and Gusterson, B.A. (2000). Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 119-137.
- Hsu, Y.C., and Fuchs, E. (2012). A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 103-114.
- Hulka, B.S. (1997). Epidemiologic analysis of breast and gynecologic cancers. *Progress in clinical and biological research* 396, 17-29.
- Humphreys, R.C., Krajewska, M., Krnacik, S., Jaeger, R., Weiher, H., Krajewski, S., Reed, J.C., and Rosen, J.M. (1996). Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: a mechanism of ductal morphogenesis. *Development* 122, 4013-4022.
- Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A., and Korach, K.S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4658-4662.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., Wang, G., and Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1397-1402.
- Ismail, P.M., DeMayo, F.J., Amato, P., and Lydon, J.P. (2004). Progesterone induction of calcitonin expression in the murine mammary gland. *J Endocrinol* 180, 287-295.
- J. Russo, B.G., A.Rogers, I. H. Russo, and S. Wellings (1990). Biology of disease: Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62, 244-278.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., and Thun, M.J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57, 43-66.

- Jeselsohn, R., Brown, N.E., Arendt, L., Klebba, I., Hu, M.G., Kuperwasser, C., and Hinds, P.W. (2010). Cyclin D1 kinase activity is required for the self-renewal of mammary stem and progenitor cells that are targets of MMTV-ErbB2 tumorigenesis. *Cancer cell* 17, 65-76.
- Jiao, X., Katiyar, S., Willmarth, N.E., Liu, M., Ma, X., Flomenberg, N., Lisanti, M.P., and Pestell, R.G. (2010). c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion. *J Biol Chem* 285, 8218-8226.
- Joshi, P.A., Di Grappa, M.A., and Khokha, R. (2012). Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammapoiesis. *Trends Endocrinol Metab.*
- Joshi, P.A., Jackson, H.W., Beristain, A.G., Di Grappa, M.A., Mote, P., Clarke, C., Stingl, J., Waterhouse, P.D., and Khokha, R. (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* 465, 803-807.
- Kaaks, R., Rinaldi, S., Key, T.J., Berrino, F., Peeters, P.H., Biessy, C., Dossus, L., Lukanova, A., Bingham, S., Khaw, K.T., *et al.* (2005). Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Endocr Relat Cancer* 12, 1071-1082.
- Kelsey, J.L., Gammon, M.D., and John, E.M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15, 36-47.
- Keller, P.J., Arendt, L.M., and Kuperwasser, C. (2011). Stem cell maintenance of the mammary gland: it takes two. *Cell Stem Cell* 9, 496-497.
- Kenney, N.J., Smith, G.H., Lawrence, E., Barrett, J.C., and Salomon, D.S. (2001). Identification of Stem Cell Units in the Terminal End Bud and Duct of the Mouse Mammary Gland. *J Biomed Biotechnol* 1, 133-143.
- Key, T., Appleby, P., Barnes, I., Reeves, G., Endogenous, H., and Breast Cancer Collaborative, G. (2002). Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 94, 606-616.
- Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121, 823-835.
- Kogler, G., Sensken, S., Airey, J.A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., *et al.* (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200, 123-135.
- Kordon, E.C., and Smith, G.H. (1998). An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* 125, 1921-1930.
- Kotton, D.N., and Fine, A. (2008). Lung stem cells. *Cell Tissue Res* 331, 145-156.
- Kratochwil, K., and Schwartz, P. (1976). Tissue interaction in androgen response of embryonic mammary rudiment of mouse: identification of target tissue for testosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 4041-4044.
- Kvinnslund, S., and Bormer, O. (1982). [Clinical significance of steroid hormone receptors in breast cancer]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 102, 1866-1868.

- Labrie, F. (2006). Dehydroepiandrosterone, androgens and the mammary gland. *Gynecol Endocrinol* 22, 118-130.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- Lawson, D.A., Zong, Y., Memarzadeh, S., Xin, L., Huang, J., and Witte, O.N. (2010). Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2610-2615.
- Lehmann, C., Jobs, G., Thomas, M., Burtscher, H., and Kubbies, M. (2012). Established breast cancer stem cell markers do not correlate with in vivo tumorigenicity of tumor-initiating cells. *Int J Oncol* 41, 1932-1942.
- Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science (New York, NY)* 327, 542-545.
- Li, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K.U., Young, W.S., Hennighausen, L., and Furth, P.A. (1997). Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3425-3430.
- Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., and Reisfeld, R.A. (2009). Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One* 4, e7965.
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N.C., Pal, B., Hart, A.H., Asselin-Labat, M.L., Gyorki, D.E., Ward, T., Partanen, A., *et al.* (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature medicine* 15, 907-913.
- Liu, J.C., Deng, T., Lehal, R.S., Kim, J., and Zacksenhaus, E. (2007). Identification of tumorsphere- and tumor-initiating cells in HER2/Neu-induced mammary tumors. *Cancer Res* 67, 8671-8681.
- Liu, M., Casimiro, M.C., Wang, C., Shirley, L.A., Jiao, X., Katiyar, S., Ju, X., Li, Z., Yu, Z., Zhou, J., *et al.* (2009). p21CIP1 attenuates Ras- and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19035-19039.
- Liu, M., Sakamaki, T., Casimiro, M.C., Willmarth, N.E., Quong, A.A., Ju, X., Ojeifo, J., Jiao, X., Yeow, W.S., Katiyar, S., *et al.* (2010). The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res* 70, 10464-10473.
- Liu, S., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Foco, H., Kleer, C.G., Merajver, S.D., Dontu, G., and Wicha, M.S. (2008). BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1680-1685.
- Lu, P., Ewald, A.J., Martin, G.R., and Werb, Z. (2008). Genetic mosaic analysis reveals FGF receptor 2 function in terminal end buds during mammary gland branching morphogenesis. *Dev Biol* 321, 77-87.

- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 196, 395-406.
- Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Fenton, S.E., Troyer, K.L., Riedel, R.F., Chang, A., and Lee, D.C. (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* 126, 2739-2750.
- Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Jr., Shyamala, G., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9, 2266-2278.
- Lydon, J.P., Ge, G., Kittrell, F.S., Medina, D., and O'Malley, B.W. (1999). Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function. *Cancer Res* 59, 4276-4284.
- Ma, X.J., Salunga, R., Tuggle, J.T., Gaudet, J., Enright, E., McQuary, P., Payette, T., Pistone, M., Stecker, K., Zhang, B.M., *et al.* (2003). Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5974-5979.
- MacMahon, B., Cole, P., Lin, T.M., Lowe, C.R., Mirra, A.P., Ravnihar, B., Salber, E.J., Valaoras, V.G., and Yuasa, S. (1970). Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ* 43, 209-221.
- Maffini, M.V., Soto, A.M., Calabro, J.M., Ucci, A.A., and Sonnenschein, C. (2004). The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci* 117, 1495-1502.
- Mallepell, S., Krust, A., Chambon, P., and Brisken, C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2196-2201.
- Manavathi, B., Dey, O., Gajulapalli, V.N., Bhatia, R.S., Bugide, S., and Kumar, R. (2013). Derailed estrogen signaling and breast cancer: an authentic couple. *Endocr Rev* 34, 1-32.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91-98.
- Marugo, M., Bernasconi, D., Miglietta, L., Fazzuoli, L., Ravera, F., Cassulo, S., and Giordano, G. (1992). Effects of dihydrotestosterone and hydroxyflutamide on androgen receptors in cultured human breast cancer cells (EVSA-T). *J Steroid Biochem Mol Biol* 42, 547-554.
- Mather, I.H., and Keenan, T.W. (1998). The cell biology of milk secretion: historical notes. Introduction. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 227-232.
- Matulka, L.A., Triplett, A.A., and Wagner, K.U. (2007). Parity-induced mammary epithelial cells are multipotent and express cell surface markers associated with stem cells. *Dev Biol* 303, 29-44.
- Medina, D. (2000). The preneoplastic phenotype in murine mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 393-407.
- Meier-Abt, F., and Bentires-Alj, M. (2013). How pregnancy at early age protects against breast cancer. *Trends Mol Med*.

- Meier-Abt, F., Milani, E., Roloff, T., Brinkhaus, H., Duss, S., Meyer, D.S., Klebba, I., Balwierz, P.J., van Nimwegen, E., and Bentires-Alj, M. (2013). Parity induces differentiation and reduces Wnt/Notch signaling ratio and proliferation potential of basal stem/progenitor cells isolated from mouse mammary epithelium. *Breast Cancer Res* 15, R36.
- Mercer, R.J., Lie, T.H., Rennie, G.C., Bennett, R.C., and Morgan, F.J. (1983). Hormone-receptor assays in breast cancer. A five-year experience. *Med J Aust* 1, 365-369.
- Mitalipov, S., and Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 114, 185-199.
- Molyneux, G., Geyer, F.C., Magnay, F.A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., Mackay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., *et al.* (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 403-417.
- Molyneux, G., Regan, J., and Smalley, M.J. (2007). Mammary stem cells and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 64, 3248-3260.
- Morata, G., and Lawrence, P.A. (1975). Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*. *Nature* 255, 614-617.
- Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074.
- Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., and Conneely, O.M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9744-9749.
- Muschler, J., and Streuli, C.H. (2010). Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003202.
- Nandi, S. (1958). Endocrine control of mammary gland development and function in the C3H/He Crgl mouse. *J Natl Cancer Inst* 21, 1039-1063.
- Neville, M.C. (1999). Physiology of lactation. *Clin Perinatol* 26, 251-279, v.
- Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., *et al.* (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 5367-5374.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, NY)* 194, 23-28.
- Oakes, S.R., Hilton, H.N., and Ormandy, C.J. (2006). The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. *Breast Cancer Res* 8, 207.
- Oakes, S.R., Naylor, M.J., Asselin-Labat, M.L., Blazek, K.D., Gardiner-Garden, M., Hilton, H.N., Kazlauskas, M., Pritchard, M.A., Chodosh, L.A., Pfeffer, P.L., *et al.* (2008). The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate. *Genes Dev* 22, 581-586.
- Oftedal, O.T. (2002). The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 225-252.

- Ormandy, C.J., Naylor, M., Harris, J., Robertson, F., Horseman, N.D., Lindeman, G.J., Visvader, J., and Kelly, P.A. (2003). Investigation of the transcriptional changes underlying functional defects in the mammary glands of prolactin receptor knockout mice. *Recent Prog Horm Res* 58, 297-323.
- Outzen, H.C., and Custer, R.P. (1975). Growth of human normal and neoplastic mammary tissues in the cleared mammary fat pad of the nude mouse. *J Natl Cancer Inst* 55, 1461-1466.
- Park, J., and Scherer, P.E. (2012). Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *J Clin Invest* 122, 4243-4256.
- Park, S.K., Yim, D.S., Yoon, K.S., Choi, I.M., Choi, J.Y., Yoo, K.Y., Noh, D.Y., Choe, K.J., Ahn, S.H., Hirvonen, A., *et al.* (2004). Combined effect of GSTM1, GSTT1, and COMT genotypes in individual breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 88, 55-62.
- Pedchenko, V.K., and Imagawa, W. (2000). Estrogen treatment in vivo increases keratinocyte growth factor expression in the mammary gland. *J Endocrinol* 165, 39-49.
- Perez-Losada, J., and Balmain, A. (2003). Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 434-443.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Persijn, J.P., Korsten, C.B., and Engelsman, E. (1975). Oestrogen and androgen receptors in breast cancer and response to endocrine therapy. *Br Med J* 4, 503.
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., and Daidone, M.G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65, 5506-5511.
- Poole, A.J., Li, Y., Kim, Y., Lin, S.C., Lee, W.H., and Lee, E.Y. (2006). Prevention of Brca1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist. *Science (New York, NY)* 314, 1467-1470.
- Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A., and Henderson, B.E. (1990). Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 50, 7415-7421.
- Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B., Smith, H.O., Oprea, T.I., Sklar, L.A., and Hathaway, H.J. (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* 70, 165-190.
- Quarrie, L.H., Addey, C.V., and Wilde, C.J. (1995). Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue demonstrated by nick-end DNA labelling. *Cell Tissue Res* 281, 413-419.
- Raouf, A., Sun, Y., Chatterjee, S., and Basak, P. (2012). The biology of human breast epithelial progenitors. *Seminars in cell & developmental biology* 23, 606-612.
- Ratko, T.A., Detrisac, C.J., Mehta, R.G., Kelloff, G.J., and Moon, R.C. (1991). Inhibition of rat mammary gland chemical carcinogenesis by dietary dehydroepiandrosterone or a fluorinated analogue of dehydroepiandrosterone. *Cancer Res* 51, 481-486.

- Rebbeck, T.R., Lynch, H.T., Neuhausen, S.L., Narod, S.A., Van't Veer, L., Garber, J.E., Evans, G., Isaacs, C., Daly, M.B., Matloff, E., *et al.* (2002). Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* *346*, 1616-1622.
- Regan, J.L., Kendrick, H., Magnay, F.A., Vafaizadeh, V., Groner, B., and Smalley, M.J. (2011). c-Kit is required for growth and survival of the cells of origin of Brca1-mutation-associated breast cancer. *Oncogene*.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105-111.
- Reynolds, B.A., and Rietze, R.L. (2005). Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods* *2*, 333-336.
- Richards, R.C., and Benson, G.K. (1971). Involvement of the macrophage system in the involution of the mammary gland in the albino rat. *J Endocrinol* *51*, 149-156.
- Richardson, K.C. (1949). Contractile tissues in the mammary gland, with special reference to myoepithelium in the goat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* *136*, 30-45.
- Richert, M.M., Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W., and Anderson, S.M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *5*, 227-241.
- Richert, M.M., and Wood, T.L. (1999). The insulin-like growth factors (IGF) and IGF type I receptor during postnatal growth of the murine mammary gland: sites of messenger ribonucleic acid expression and potential functions. *Endocrinology* *140*, 454-461.
- Robinson, G.W. (2007). Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nat Rev Genet* *8*, 963-972.
- Rowse, G.J., Ritland, S.R., and Gendler, S.J. (1998). Genetic modulation of neu proto-oncogene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res* *58*, 2675-2679.
- Russo, I.H., Medado, J., and Russo, J. (1989). Endocrine influences on the mammary gland Integument and Mammary Glands, 252-266.
- Russo, I.H., and Russo, J. (1996). Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* *104*, 938-967.
- Russo, I.H., and Russo, J. (2011). Pregnancy-induced changes in breast cancer risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *16*, 221-233.
- Russo, J., Fernandez, S.V., Russo, P.A., Fernbaugh, R., Sheriff, F.S., Lareef, H.M., Garber, J., and Russo, I.H. (2006). 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *FASEB J* *20*, 1622-1634.
- Russo, J., Lareef, M.H., Tahin, Q., Hu, Y.F., Slater, C., Ao, X., and Russo, I.H. (2002). 17Beta-estradiol is carcinogenic in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* *80*, 149-162.
- Russo, J., and Russo, I.H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas* *49*, 2-15.
- Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J., and Redeuilh, G. (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 11217-11222.

- Sakakura, T., Kusano, I., Kusakabe, M., Inaguma, Y., and Nishizuka, Y. (1987). Biology of mammary fat pad in fetal mouse: capacity to support development of various fetal epithelia in vivo. *Development* 100, 421-430.
- Santini, D., Schiavon, G., Vincenzi, B., Gaeta, L., Pantano, F., Russo, A., Ortega, C., Porta, C., Galluzzo, S., Armento, G., *et al.* (2011). Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One* 6, e19234.
- Scheel, C., Eaton, E.N., Li, S.H., Chaffer, C.L., Reinhardt, F., Kah, K.J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A.L., *et al.* (2011). Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 145, 926-940.
- Scheffe, J.H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T., and Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)* 84, 901-910.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.
- Schwartz, A.G. (1979). Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H(Avy/a) mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone. *Cancer Res* 39, 1129-1132.
- Sennikov, S.V., Temchura, V.V., Trufakin, V.A., and Kozlov, V.A. (2002). Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor produced by intestinal epithelial cells on functional activity of hemopoietic stem cells. *Bull Exp Biol Med* 134, 548-550.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84-88.
- Shoker, B.S., Jarvis, C., Clarke, R.B., Anderson, E., Hewlett, J., Davies, M.P., Sibson, D.R., and Sloane, J.P. (1999). Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. *Am J Pathol* 155, 1811-1815.
- Siegel, R., Naishadham, P., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62, 10-29.
- Silberstein, C.W.D.a.G.B. (1987). Postnatal development of the rodent mammary gland. Plenum Press, 3-36.
- Silberstein, G.B., and Daniel, C.W. (1982). Glycosaminoglycans in the basal lamina and extracellular matrix of the developing mouse mammary duct. *Dev Biol* 90, 215-222.
- Silberstein, G.B., Flanders, K.C., Roberts, A.B., and Daniel, C.W. (1992). Regulation of mammary morphogenesis: evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by transforming growth factor-beta 1. *Dev Biol* 152, 354-362.
- Silberstein, G.B., Van Horn, K., Shyamala, G., and Daniel, C.W. (1994). Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens. *Endocrinology* 134, 84-90.

- Simon, R., Panussis, S., Maurer, R., Spichtin, H., Glatz, K., Tapia, C., Mirlacher, M., Rufle, A., Torhorst, J., and Sauter, G. (2004). KIT (CD117)-positive breast cancers are infrequent and lack KIT gene mutations. *Clin Cancer Res* 10, 178-183.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.
- Sleman, K.E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C.M., and Smalley, M.J. (2006). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res* 8, R7.
- Sleman, K.E., Kendrick, H., Robertson, D., Isacke, C.M., Ashworth, A., and Smalley, M.J. (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol* 176, 19-26.
- Smalley, M., and Ashworth, A. (2003). Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer* 3, 832-844.
- Smart, C.E., Wronski, A., French, J.D., Edwards, S.L., Asselin-Labat, M.L., Waddell, N., Peters, K., Brewster, B.L., Brooks, K., Simpson, K., *et al.* (2011). Analysis of Brca1-deficient mouse mammary glands reveals reciprocal regulation of Brca1 and c-kit. *Oncogene* 30, 1597-1607.
- Smith, C.L. (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 58, 627-632.
- Smith, G.H. (1996). Experimental mammary epithelial morphogenesis in an in vivo model: evidence for distinct cellular progenitors of the ductal and lobular phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 39, 21-31.
- Smith, G.H. (2005). Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development* 132, 681-687.
- Smith, G.H., and Boulanger, C.A. (2002). Mammary stem cell repertoire: new insights in aging epithelial populations. *Mech Ageing Dev* 123, 1505-1519.
- Smith, G.H., and Medina, D. (1988). A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J Cell Sci* 90 ( Pt 1), 173-183.
- Smith, G.H., and Medina, D. (2008). Re-evaluation of mammary stem cell biology based on in vivo transplantation. *Breast Cancer Res* 10, 203.
- Smith, G.H., Pauley, R.J., Socher, S.H., and Medina, D. (1978). Chemical carcinogenesis in C3H/StWi mice, a worthwhile experimental model for breast cancer. *Cancer Res* 38, 4504-4509.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.
- Soto, A.M., and Sonnenschein, C. (2011). The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory. *Bioessays* 33, 332-340.

- Spalding, K.L., Bhardwaj, R.D., Buchholz, B.A., Druid, H., and Frisen, J. (2005). Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 122, 133-143.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science (New York, NY)* 241, 58-62.
- Sternlicht, M.D. (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* 8, 201.
- Sternlicht, M.D., Sunnarborg, S.W., Kouros-Mehr, H., Yu, Y., Lee, D.C., and Werb, Z. (2005). Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development* 132, 3923-3933.
- Stingl, J., Eaves, C.J., Kuusk, U., and Emerman, J.T. (1998). Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast. *Differentiation* 63, 201-213.
- Stingl, J., Eaves, C.J., Zandieh, I., and Emerman, J.T. (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 67, 93-109.
- Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*.
- Strain, A.J., and Crosby, H.A. (2000). Hepatic stem cells. *Gut* 46, 743-745.
- Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A., and Friis, R.R. (1992). Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development* 115, 49-58.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tan, W., Zhang, W., Strasner, A., Grivennikov, S., Cheng, J.Q., Hoffman, R.M., and Karin, M. (2011). Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 470, 548-553.
- Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S.J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res* 15, 4234-4241.
- Tanos, T., Rojo, L.J., Echeverria, P., and Brisken, C. (2012). ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Res* 14, 210.
- The Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)* 282, 1145-1147.
- Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.

- Tlsty, T.D., and Coussens, L.M. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 1, 119-150.
- Tommiska, J., Bartkova, J., Heinonen, M., Hautala, L., Kilpivaara, O., Eerola, H., Aittomaki, K., Hofstetter, B., Lukas, J., von Smitten, K., *et al.* (2008). The DNA damage signalling kinase ATM is aberrantly reduced or lost in BRCA1/BRCA2-deficient and ER/PR/ERBB2-triple-negative breast cancer. *Oncogene* 27, 2501-2506.
- Topper, Y.J., and Freeman, C.S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60, 1049-1106.
- Trams, G., and Maass, H. (1977). Specific binding of estradiol and dihydrotestosterone in human mammary cancers. *Cancer Res* 37, 258-261.
- Vaillant, F., Asselin-Labat, M.L., Shackleton, M., Forrest, N.C., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2008). The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 68, 7711-7717.
- Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., and Blanpain, C. (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 479, 189-193.
- Vassilopoulos, A., Wang, R.H., Petrovas, C., Ambrozak, D., Koup, R., and Deng, C.X. (2008). Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumors using markers for normal mammary stem cells. *Int J Biol Sci* 4, 133-142.
- Vecchi, M., Confalonieri, S., Nuciforo, P., Vigano, M.A., Capra, M., Bianchi, M., Nicosia, D., Bianchi, F., Galimberti, V., Viale, G., *et al.* (2008). Breast cancer metastases are molecularly distinct from their primary tumors. *Oncogene* 27, 2148-2158.
- Veltmaat, J.M., Mailleux, A.A., Thiery, J.P., and Bellusci, S. (2003). Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation* 71, 1-17.
- Veltmaat, J.M., Van Veelen, W., Thiery, J.P., and Bellusci, S. (2004). Identification of the mammary line in mouse by Wnt10b expression. *Dev Dyn* 229, 349-356.
- Vintersten, K., Monetti, C., Gertsenstein, M., Zhang, P., Laszlo, L., Biechele, S., and Nagy, A. (2004). Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis* 40, 241-246.
- Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 23, 2563-2577.
- Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.
- Visvader, J.E., and Smith, G.H. (2011). Murine mammary epithelial stem cells: discovery, function, and current status. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Wagner, K.U., Boulanger, C.A., Henry, M.D., Sgagias, M., Hennighausen, L., and Smith, G.H. (2002). An adjunct mammary epithelial cell population in parous

- females: its role in functional adaptation and tissue renewal. *Development* 129, 1377-1386.
- Walden, P.D., Ruan, W., Feldman, M., and Kleinberg, D.L. (1998). Evidence that the mammary fat pad mediates the action of growth hormone in mammary gland development. *Endocrinology* 139, 659-662.
- Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K.D., Walker, D., Yu, H., Halili, M.V., Hu, Y.P., Price, S.M., Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2009a). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 461, 495-500.
- Wang, Y., Yang, J., Zheng, H., Tomasek, G.J., Zhang, P., McKeever, P.E., Lee, E.Y., and Zhu, Y. (2009b). Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. *Cancer cell* 15, 514-526.
- Watson, C.J., Oliver, C.H., and Khaled, W.T. (2011). Cytokine signalling in mammary gland development. *J Reprod Immunol* 88, 124-129.
- Watt, F.M., Lo Celso, C., and Silva-Vargas, V. (2006). Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev* 16, 518-524.
- Weigelt, B., Glas, A.M., Wessels, L.F., Witteveen, A.T., Peterse, J.L., and van't Veer, L.J. (2003). Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15901-15905.
- Wiesen, J.F., Young, P., Werb, Z., and Cunha, G.R. (1999). Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development* 126, 335-344.
- Williams, J.M., and Daniel, C.W. (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol* 97, 274-290.
- Wiseman, B.S., and Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science (New York, NY)* 296, 1046-1049.
- Wu, K., Jiao, X., Li, Z., Katiyar, S., Casimiro, M.C., Yang, W., Zhang, Q., Willmarth, N.E., Chepelev, I., Crosariol, M., *et al.* (2011). Cell fate determination factor Dachshund reprograms breast cancer stem cell function. *J Biol Chem* 286, 2132-2142.
- Yager, J.D. (2012). Mechanisms relating estrogens to breast cancer. *Transl Endocrinol Metab* 3, 1-19.
- Yamaji, D., Na, R., Feuermann, Y., Pechhold, S., Chen, W., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (2009). Development of mammary luminal progenitor cells is controlled by the transcription factor STAT5A. *Genes Dev* 23, 2382-2387.
- Young, L.J., Medina, D., DeOme, K.B., and Daniel, C.W. (1971). The influence of host and tissue age on life span and growth rate of serially transplanted mouse mammary gland. *Exp Gerontol* 6, 49-56.
- Youssef, K.K., Van Keymeulen, A., Lapouge, G., Beck, B., Michaux, C., Achouri, Y., Sotiropoulou, P.A., and Blanpain, C. (2010). Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nature cell biology* 12, 299-305.

Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J., *et al.* (2007). let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 131, 1109-1123.

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

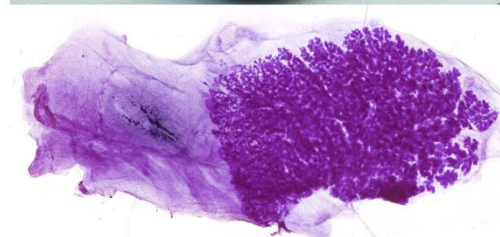
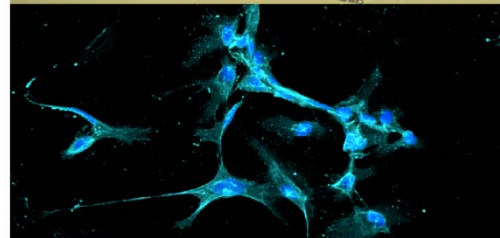
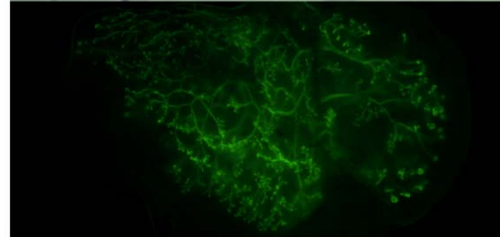
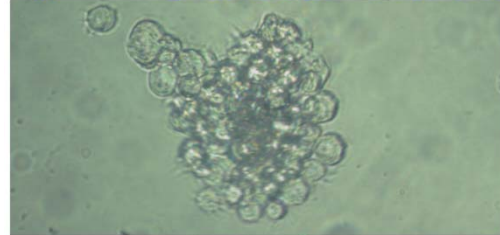
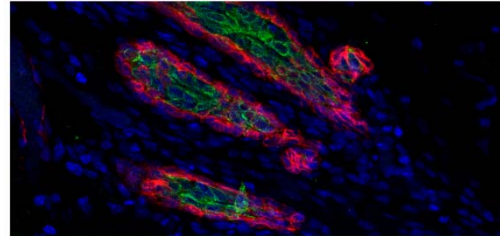
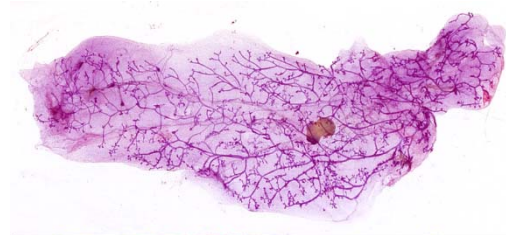
Zhou, J., Chehab, R., Tkalcevic, J., Naylor, M.J., Harris, J., Wilson, T.J., Tsao, S., Tellis, I., Zavarsek, S., Xu, D., *et al.* (2005). Elf5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation. *EMBO J* 24, 635-644.

Zhu, L., Gibson, P., Currie, D.S., Tong, Y., Richardson, R.J., Bayazitov, I.T., Poppleton, H., Zakharenko, S., Ellison, D.W., and Gilbertson, R.J. (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457, 603-607.

Zumoff, B. (1998). Does postmenopausal estrogen administration increase the risk of breast cancer? Contributions of animal, biochemical, and clinical investigative studies to a resolution of the controversy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 217, 30-37.



**ANEXOS**



# Intrinsic cues and hormones control organ size in the mammary gland

Eva Diaz-Guerra<sup>1</sup>, M. Angeles Lillo<sup>1</sup>, Silvia Santamaria<sup>1</sup> and Jose A. Garcia-Sanz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biologicas, Spanish National Research Council (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu, 9 E28040 Madrid Spain

Corresponding author: Jose A. Garcia-Sanz

CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu, 9 E-28040 Madrid, Spain. Phone: +34918373112; Fax:

+34915360432; Email: [jasanz@cib.csic.es](mailto:jasanz@cib.csic.es)

Mammary gland organ size control

Character Count: 27,472

## **Abstract**

The mammary gland was used as model to analyze organ size control since during puberty and reproductive cycles undergoes large morphological changes. Mammary gland cellularity was strictly dependent on mammary stem cell number, even following an expansion of the mammary stem cell pool (20-fold at puberty and a transient three-fold during pregnancy). Ovariectomies and male-derived transplants demonstrated that the mammary stem cell expansion was hormone-dependent. Male-derived mammary stem cells generated functional mammary glands, developing alveolar structures and secreting milk after parturition. Taken together, these data suggest an organ size control mechanism combining intrinsic cues throughout the organism's life with extrinsic hormone signals at particular developmental stages. This mechanism might have strong implications on mammary tumorigenesis

Keywords: **Adult stem cells / organ size control / mammary gland / hormones / symmetric stem cell divisions**

## Introduction

Mechanisms controlling organ and indirectly organism size remain largely unknown (Potter & Xu, 2001). While the mechanisms controlling organ size in insects and mammals turned out to be different, the signaling pathways employed are conserved. Indeed, whereas insect organ size changes correlate with cell size (Stevenson et al, 1995), in mammals parallel with cell number (Conlon & Raff, 1999). However, the signaling pathways either restricting organ size such as Hippo (Zhao et al, 2007) or required for attaining proper size such as myc seem to be conserved (Martins et al, 2008; Stocker & Hafen, 2000; Trumpp et al, 2001). In mammals, two distinct control mechanisms have been unraveled using conditional cell ablation (Stanger, 2008). One of them depends on an intrinsic program established during early embryogenesis as represented by pancreatic development, in which growth factors play only a limited role (Stanger et al, 2007). Conversely, the other exemplified by the liver, largely relies on external cues (Stanger et al, 2007). The mammary gland is an ideal model to analyze organ size determination since (i) it undergoes most of its development after birth under the control of systemic hormones (Briskin & Duss, 2007); (ii) large remodeling and architectural changes occur with each reproductive cycle (Molyneux et al, 2007); and (iii) mouse mammary cells positive for the either the combination CD24 (HSA) and CD29 ( $\beta_1$  integrin) or CD24 and CD49f ( $\alpha_6$  integrin) have been identified as *bona-fide* mammary stem cells (MaSCs), since single cells were able to reconstitute a functional organ upon transplantation, demonstrating their self-renewal and differentiation capacity (Shackleton et al, 2006; Stingl et al, 2006). MaSCs can also be maintained undifferentiated in culture, as non-adherent mammospheres, which in turn can differentiate into the three mammary epithelial cell types (ductal, myoepithelial or alveolar) (Dontu et al, 2003).

In the present study, we pursued the idea that the analysis of total cellularity and MaSC number during postnatal mammary gland development and the reproductive cycle might unravel clues on organ size control mechanisms. Our data evidenced a 20-fold increase on MaSCs after puberty and an extra 3-fold with each reproductive cycle; an expansion that can only be explained by symmetric stem cell divisions. Analyses where hormone signals were modulated by ovariectomy, or where male mammary cells were transplanted into recipient females, demonstrated the role of hormones controlling MaSC symmetric divisions. Furthermore, our data show that male MaSCs in the appropriate hormonal context are fully functional, being able to reconstitute the mammary gland and secrete milk at parturition. Thus, making them indistinguishable from a female mammary gland. Taken together these data allowed us to propose a model for mammary gland organ size control with clear implications on mammary tumorigenesis

## **Results**

### **MaSC number can be estimated from the frequency of mammosphere-generating cells**

We first determined by limiting dilution analysis (LDA) that only the MaSC population (CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>) generated mammospheres at high frequency (1/13.2), whereas the remaining cell populations (CD24<sup>-</sup>CD29<sup>-</sup>, CD24<sup>-</sup>CD29<sup>+</sup> or CD24<sup>+</sup>CD29<sup>-</sup>) were unable to do so ( $\leq 1/1 \times 10^5$ ) (Figure 1A). Since FACS itself decreased the frequency of viable cells by 2.6-fold (Figure 1B), it could be estimated that about 20% of the CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> cells were able to generate mammospheres (Figure 1C). Mammary epithelial cells and primary mammospheres displayed different CD24 and CD29 staining profiles (Figure 1D), a consequence of MaSC and progenitor cell enrichment. The stem cells within the mammosphere retained their potential, since they were able to either remain undifferentiated, generating secondary mammospheres (Figure 1E) or to

differentiate into the three mammary epithelial cell types (Figure 1F). LDA revealed that each mammosphere contained a single cell able to give rise to new mammospheres (Figure 1E), indicating that in these conditions, MaSC underwent strict asymmetric cell divisions. These data, together with the indication that only the MaSCs population was able to generate mammospheres, suggested that MaSC number could be estimated from the frequency of mammosphere-generating cells.

### **MaSC expansion during postnatal development and the reproductive cycle**

Mammary gland morphogenesis occurs mainly postnatally, undergoing huge changes during postnatal development (from weeks 3 to 8) and with each reproductive cycle. These changes were reflected in both organ size and cellularity changes (range  $0.46 \times 10^6$  -  $14.6 \times 10^6$  cells/mouse) (Figure 2A-B, Supplementary Figure 1 online). The stem cell frequency, however, remained unchanged (range  $1/460$  -  $1/830$ ) (Figure 2C). Significant changes in MaSC number (total cellularity times stem cell frequency) were detected when comparing mammary glands from prepubescent (3-week-old mice) with either adult or pregnant females (20- and 60-fold, respectively) (Figure 2D). In addition, during involution (retraction of the mammary gland after ending breast-feeding), the decrease in cellularity was accompanied by an equivalent reduction of stem cell number as determined on mammosphere-generating cell assays by LDA (Figure 2D), reaching levels similar to adult, non-pregnant females. Thus, apparently the MaSC niche was highly dynamic, with cell number changes at certain hormone-orchestrated developmental stages, indicating symmetric stem cell divisions, which increased the MaSC pool.

Correlation analysis between mammary gland cellularity and stem cell number unraveled that, for all conditions analyzed, mammary gland cellularity was strictly dependent on stem cell number (Figure 2E). This relation was maintained not only during postnatal development or the

reproductive cycle from different mouse strains (FVB/NJ, C57Bl/6), but also in genetically modified mice such as MMTV-neu transgenics (Guy et al, 1992), a breast cancer model (not shown). These data allowed to estimate that, within the mammary gland, for each stem cell there were ~500 cells devoid of stem cell properties (Figure 2E). Suggesting that each stem cell underwent at least nine divisions to generate the fully differentiated progeny. The data in Figure 2E also demonstrate that there was a good correlation between organ cellularity and stem cell number, despite the large cellularity changes at particular developmental time-points (puberty, pregnancy) associated with hormonal signals. This allowed envisaging that estrogens and progesterone might play a role on MaSC expansion, leading to a net increase in their number and, as consequence, in mammary gland cellularity.

### **Female reproductive hormones play a role on MaSC expansion**

To investigate the role of female reproductive hormones in MaSC number during postnatal development, 3-, 5-, 6- or 8-week-old mice were bilaterally ovariectomized and maintained until they were 9-week-old (Supplementary Figure 2A online). Ovariectomy effects were confirmed by the blockade on mammary gland development, which was dependent on time of ovariectomy (Figure 3A and Supplementary Figure 2B online). Nine-week-old animals ovariectomized at the onset of puberty (3-week-old) had a number of stem cells comparable to 3-week-old animals (Figures 2A and 3A). The number of MaSCs increased in animals where the ovariectomy was delayed (5-, 6-, or 8-week-old) (Figure 3B) and correlated with total cellularity of these glands (Figure 3C); suggesting that hormonal signals were involved in MaSC expansion during postnatal development.

## **Male MaSC in an appropriate hormonal context reconstituted a functional mammary gland**

To further corroborate the role of hormones in MaSC expansion (symmetric cell divisions), we analyzed the male mammary gland, which is devoid of the hormonal signals required for MaSC expansion. The epithelial structure of the mammary gland from adult males and 3-week-old females were equivalent, although male structures lacked terminal end buds (Figure 4A and Supplementary Figure 3 online). Male mammary epithelial cells were able to generate mammospheres, equivalent to the female-derived ones (Figure 4B,C). Male mammary gland cellularity (Figure 4D) and stem cell number (Figure 4F) were also similar to 3-week-old females, as could be envisaged by the lack of appropriate hormonal signals in both. The stem cell frequency in all three cases was similar (Figure 4E). These data raised the question whether, in an appropriate hormonal context, male MaSCs could undergo symmetric stem cell divisions and generate a mammary gland equivalent to adult females. Thus, a similar number of GFP mice-derived male and female mammary cells were transplanted into the left and right cleared-fat pads from 3-week-old recipient females, respectively. Two months after transplantation recipient females were crossed and analyzed the day of parturition. Whole mounts of the transplants show that both male- and female-derived donor cells were able to reconstitute the mammary glands (Figure 5A). The donor origin of the reconstituted structures was demonstrated by immunohistochemical analyses in both female- and male-derived transplants, since they were GFP<sup>+</sup>. They contained ductal (TROMA<sup>+</sup>), myoepithelial (SMA<sup>+</sup>) and alveolar (NaPi-11b<sup>+</sup>) cells, with the expected architecture. Furthermore, both female-derived and male-derived transplants contained milk-secreting cells ( $\beta$ -casein<sup>+</sup>) (Figure 5B). The ability of both female- and male-derived transplants to secrete milk was confirmed by western blot (Figure 5C). In addition,

quantitative analyses corroborated that male-derived mammary gland reconstitutions involved a cellularity increase ( $11 \pm 8.8$  fold, mean $\pm$ SD), concomitant with a  $27 \pm 23.8$  fold increase in stem cell number (mean $\pm$ SD), with a positive correlation ( $R^2=0.898$ ) between total cellularity and stem cell number on the reconstituted glands (Figure 5D). These data indicate that, despite variations in the reconstitution extent (reflected in larger standard deviation values, as compared to the endogenous mammary glands), with the appropriate hormonal context, male MaSCs underwent symmetric stem cell divisions and reconstituted a functional mammary gland, secreting milk after parturition.

## **Discussion**

The data presented here indicate that MaSC number could be estimated from the frequency of mammosphere-generating cells since MaSCs but not progenitor cells were able to generate new mammospheres, as initially suggested by Shackleton and coworkers (Shackleton et al, 2006); and LDA analyses demonstrated that in culture, MaSCs underwent strict asymmetric cell divisions, as initially suggested by the uneven distribution of the fluorescent dye PKH-26 or the protein Numb 2 in these cells (Cicalese et al, 2009). MaSC number during postnatal mammary gland development showed a 20-fold expansion, which correlated with the morphologic and architectural changes detected in the organ as well as with total cellularity. This increase in the MaSC pool, indicative of symmetric MaSC divisions, also takes place, although to a lower extent (three-fold) during the reproductive cycle, as demonstrated here, and recently reported by Asselin-Labat and coworkers (Asselin-Labat et al, 2010). In addition, our data demonstrate that the increase during pregnancy is transient, since the MaSC pool retracts following involution. An expansion and retraction of the MaSC pool has also been reported during the estrous cycle (Joshi et al, 2010). Changes in the Stem Cell pool have been described during embryonic development,

following tissue damage or stress responses, but not for postnatal physiological responses, (Morrison & Kimble, 2006; Wilson et al, 2008). Thus, the huge changes in the MaSC pool during normal physiological responses might reflect a highly dynamic MaSC niche, which might expand or retract in response to hormone signals.

Transplantation experiments using steroid hormone receptor-deficient mice demonstrated that female reproductive hormones control mammary gland development-associated morphogenic changes (Mallepell et al, 2006), where estrogens are required for ductal elongation and progesterone for side branching (Brisken et al, 1998), although their mechanism of action remained elusive. The role of hormones controlling the expansion of the MaSC pool during postnatal development was suggested by the correlation between the number of MaSC and total cells on adult mice bilaterally ovariectomized throughout puberty. This was further corroborated by experiments demonstrating that male-derived mammary gland cells transplanted into female recipients were able to reconstitute a fully functional mammary gland, able to secrete milk following parturition and indistinguishable from female-derived transplants. These data are consistent with the observations on human male transsexuals, where a combination of progestative anti-androgens and estrogens led to developing a mammary gland morphologically and histologically similar to the female breast, although it could not be functionally tested (Kanhai et al, 2000). A similar role for hormones has been described during pregnancy (Asselin-Labat et al, 2010) and the estrous cycle (Joshi et al, 2010).

Furthermore, the strict interdependence between stem cell number and total cellularity suggested that in the mammary gland there is an intrinsic program controlling organ size similar to the one described for the pancreas (Stanger et al, 2007). These data, however, were at odds with transplantation experiments where a functional mammary gland could be reconstituted from a

single MaSC (Shackleton et al, 2006), which would rather be compatible with a mechanism of organ size control strictly relying on exogenous cues, as described for the liver (Stanger et al, 2007). This apparent discrepancy could be explained by a third mechanism of organ size control, combining intrinsic cues with extrinsic hormone signals (Figure 6). Intrinsic signals would be transmitted during most of the organism's life, leading to asymmetric MaSC divisions and maintenance of a constant stem cell pool size. In particular developmental windows, however, hormones controlling female puberty and pregnancy would act as extrinsic cues leading to a substantial increase in MaSC number. This would involve a switch from asymmetric towards symmetric MaSC divisions and a concomitant increase in organ cellularity. Such a mechanism might turn potentially relevant to understand mammary tumorigenesis, since it provides a cellular basis for the 100-fold decreased mammary cancer frequency in males as well as in prepubertal females, as compared to adult females (Horner et al, 2009), which might be related to the lack of hormone-driven symmetric MaSC divisions. Conversely, it might help explaining the increase in breast cancer incidence that accompanies pregnancy (Asselin-Labat et al, 2010) or the decrease in breast cancer risk associated with ovariectomy. Taken together, these data argue for therapeutic interventions on breast cancer patients where the MaSC function or number is suppressed.

## **Materials and Methods**

### ***Mice***

All animal experiments were conducted using FVB/NJ wild type, or MMTV-neu<sup>+/+</sup> (Guy et al, 1992) or C57Bl/6 GFP<sup>+/+</sup> (Okabe et al., 1997), or Rag2<sup>-/-</sup> (Shinkai et al., 1992) mice bred at and maintained in our animal facility according to institutional, Spanish and European Union guidelines. Efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

### ***Mammary Cell Preparation***

Mammary tissue from pairs 2-5 was mechanically dissociated and digested (4 h, 37°C, 225 rpm) with 1.5 U/g Collagenase A (Roche Diagnostics GmbH) in 1.8 ml/g DMEM-F12 culture media (Gibco, Invitrogen Co.) supplemented with 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 250 ng/ml Amphotericin B, 100 µg/ml Gentamycin, 5x10<sup>-5</sup>M β-mercaptoethanol, 2 mM Gln, 1x B27 devoid of retinoic acid (Invitrogen), 2 µg/ml Heparin, 2 ng/ml bFGF (provided by Dr. G. Gimenez) and 200 ng/ml EGF (Miltenyi, Biotech). The resulting cell suspension was washed 3 times with 1 x PBS, 5 mM EDTA and 1% (w/v) BSA (800 g, 5 min). Red blood cells were lysed with NH<sub>4</sub>Cl-lysis buffer, samples were sieved through a 40 µm mesh and directly centrifuged (134 g, 1 min). A single cell suspension was obtained by passing the sample repeatedly through a 25G needle.

### ***Mammosphere cultures and differentiation***

Mammary gland single cell suspensions in serum free DMEM:F12 (Gibco) complete media were plated on ultralow attachment plates (Corning, Acton, MA, USA) at 10,000 viable cells/cm<sup>2</sup> and cultured (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity) for 7–10 days. Differentiation assays were performed as described (Dontu et al., 2003). For LDA, cells were plated at 100, 300, 1000 or 3000 cells/well (24 wells/group) and plates were scored 10-14 days latter.

### ***Transplantation, Ovariectomies and Mammary Gland Analyses***

A similar number of male- or female-derived GFP-expressing cells (range 17000 - 64000) were transplanted into Rag2<sup>-/-</sup> syngeneic recipients (Shackleton et al., 2006). GFP<sup>+</sup> mammary outgrowths were visualized after parturition using a fluorescence-dissecting microscope (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Germany) and then processed for immunohistochemistry. The effect of hormones on mammary gland development was ascertained on 9 week-old females that

underwent bilateral ovariectomy at 3, 5, 6 or 8 weeks. For whole mounts, mammary glands spread on glass slides were fixed in Carnoy's fixative, hydrated, stained in carmine alum (Sigma), dehydrated, cleared in xylene and mounted with Permount (Fisher).

#### ***Flow cytometry analysis and sorting***

Flow cytometry analyses were carried out gating on propidium iodide negative cells, on a XL flow cytometer and the Expo32 software (Coulter, Miami, FL). Cells were sorted using a FACS Vantage (BD Biosciences) directly onto 96-well plates.

#### ***Immunocytochemistry and Immunohistochemistry***

For immunocytochemistry cells were grown on type IV collagen-coated coverslips, fixed with methanol (-20°C, 20 min), blocked with 10% goat serum (1 h, RT) and stained with primary antibodies (4°C, overnight, 4°C), followed by incubation with the appropriate secondary antibodies (1 h, RT) and mounted with a mowiol:DAPI mix. The antibodies and dilutions used are described in Supplemental Table I Online. For immunohistochemistry, paraformaldehyde-fixed (4%, 2 h, 4°C) mammary gland were embedded in paraffin. Tissue sections (6 µm) were dewaxed, followed by heat-induced antigen retrieval, microwaving sections in 10 mM sodium citrate, pH 6.0 for 20 min. Blocking, stainings, washes and mounting of the samples were done as described for immunocytochemistry. Cells and tissue sections were analyzed with a Leica TCS SP5 AOBS confocal microscope (Mannheim, Germany).

#### ***Preparation of Tissue Lysates and Immunoblotting***

Tissues from male- and female-derived transplants were pulverized under liquid nitrogen, lysed in RIPA. Protein concentrations were determined with the Thermo Scientific protein assay using BSA as a standard. Proteins were run on a 12% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore) (10 V, 30 min). After blocking with 5% (w/v) skim milk/PBS or 5% (w/v) BSA/PBS

(1 h, RT), membranes were incubated with the appropriate primary and secondary antibodies (see Supplemental Table I Online) and revealed using an ECL kit (EuroClone).

### ***Statistical analyses***

Data were analyzed using the SPSS 15.0 software (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). Normal distribution of the samples was determined with the Kolmogorov-Smirnov test. Data were analyzed using the Student's t test. The Pearson's correlation was determined on log-transformed data. Statistical significance was assumed when  $p < 0.05$ .

For LDA, analyses were done using the WEHI Bioinformatics facility online (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/index.html>). The single-hit assumption (Bonnetfoix et al, 1996) was not rejected for any dilution series ( $p > 0.05$ ).

### ***Supplementary data***

Supplementary data are available at The EMBO Journal Online (<http://www.embojournal.org>).

## **Acknowledgements**

We thank E.W. Müllner, Z. Garcia, G. Elvira, P. Perez-Arnaiz and M.L. Martinez for critically reading the manuscript. A. Silva for helpful comments, critical discussions and continuous support. C. Brisken and R. Clarke for teaching us to purify and grow mammospheres. M.I. Gallego for helpful comments and sharing reagents, P. Lastres for FACS analyses, R. Vernal for statistical analyses. We are grateful to the personnel at the CIB-CSIC animal facility for animal care and the CNB-CSIC histology service for sample processing. G. Gimenez kindly provided the bFGF and J. Biber the NaPi 11b antisera. The work in the authors' laboratory was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2009-07974, RD06/0010/1010) and the CSIC (PIE200420E586). The authors declare no competing financial interests.

## References

Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM, Pal B, Wu D, Simpson ER, Yasuda H, Smyth GK, Martin TJ, Lindeman GJ, Visvader JE (2010) Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*

Bonnefoix T, Bonnefoix P, Verdiel P, Sotto JJ (1996) Fitting limiting dilution experiments with generalized linear models results in a test of the single-hit Poisson assumption. *J Immunol Methods* **194**(2): 113-119

Brisken C, Duss S (2007) Stem cells and the stem cell niche in the breast: an integrated hormonal and developmental perspective. *Stem Cell Rev* **3**(2): 147-156

Brisken C, Park S, Vass T, Lydon JP, O'Malley BW, Weinberg RA (1998) A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(9): 5076-5081

Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, Faretta M, Ronzoni S, Giulini B, Brisken C, Minucci S, Di Fiore PP, Pelicci PG (2009) The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* **138**(6): 1083-1095

Conlon I, Raff M (1999) Size control in animal development. *Cell* **96**(2): 235-244

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS (2003)  
In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells.  
*Genes Dev* **17**(10): 1253-1270

Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ (1992) Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(22): 10578-10582

Horner M, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, M.P. E, Stinchcomb DG, Edwards BK. (2009)  
SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD,  
. National Cancer Institute, Bethesda, MD, Vol. based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009., p. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2006/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/).

Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, Di Grappa MA, Mote P, Clarke C, Stingl J, Waterhouse PD, Khokha R (2010) Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*

Kanhai RC, Hage JJ, van Diest PJ, Bloemena E, Mulder JW (2000) Short-term and long-term histologic effects of castration and estrogen treatment on breast tissue of 14 male-to-female transsexuals in comparison with two chemically castrated men. *Am J Surg Pathol* **24**(1): 74-80

Mallepell S, Krust A, Chambon P, Briskin C (2006) Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(7): 2196-2201

Martins RA, Zindy F, Donovan S, Zhang J, Pounds S, Wey A, Knoepfler PS, Eisenman RN, Roussel MF, Dyer MA (2008) N-myc coordinates retinal growth with eye size during mouse development. *Genes Dev* **22**(2): 179-193

Molyneux G, Regan J, Smalley MJ (2007) Mammary stem cells and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* **64**(24): 3248-3260

Morrison SJ, Kimble J (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**(7097): 1068-1074

Potter CJ, Xu T (2001) Mechanisms of size control. *Curr Opin Genet Dev* **11**(3): 279-286

Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE (2006) Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439**(7072): 84-88

Stanger BZ (2008) The biology of organ size determination. *Diabetes Obes Metab* **10** Suppl 4: 16-22

Stanger BZ, Tanaka AJ, Melton DA (2007) Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* **445**(7130): 886-891

Stevenson RD, Hill MF, Bryant PJ (1995) Organ and cell allometry in Hawaiian *Drosophila*: how to make a big fly. *Proc Biol Sci* **259**(1355): 105-110

Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li HI, Eaves CJ (2006) Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*

Stocker H, Hafen E (2000) Genetic control of cell size. *Curr Opin Genet Dev* **10**(5): 529-535

Trumpp A, Refaeli Y, Oskarsson T, Gasser S, Murphy M, Martin GR, Bishop JM (2001) c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* **414**(6865): 768-773

Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lio P, Macdonald HR, Trumpp A (2008) Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**(6): 1118-1129

Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL (2007) Inactivation of YAP oncoprotein by the

Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*

**21(21): 2747-2761**

## Figure Legends

**Figure 1** Self-renewal and differentiation properties of mouse MaSCs (CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>). **(A)** A mammary gland-derived single cell suspension was stained with a combination of CD24 and CD29 monoclonal antibodies. The CD24<sup>-</sup>CD29<sup>-</sup>, CD24<sup>-</sup>CD29<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>CD29<sup>-</sup> and CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> cell populations were sorted and plated at limiting dilution, determining mammosphere frequencies on each of them. Data represented as mean (line)  $\pm$ SD (gray area). **(B)** Mammosphere frequencies from mammary gland-derived single cell suspensions prior to (unsorted) or after FACS sorting (sorted), to determine frequency changes due to cavitation forces. Data represented as in A. **(C)** CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> cells grown as mammospheres. **(D)** Staining pattern of a mammosphere-derived single cell suspension for CD24 and CD29. **(E)** Limiting dilution analysis to determine the number of cells in a mammosphere able to generate new mammospheres. Data represented as mean (line)  $\pm$ SD (gray area). **(F)** Differentiation of mammosphere cells towards myoepithelial (cytokeratin14<sup>+</sup>), ductal (cytokeratin18<sup>+</sup>) or alveolar (NaPi-11b<sup>+</sup>) cells.

**Figure 2** MaSC quantification during postnatal development and reproductive cycle. MaSC frequency was estimated from the number of mammosphere generating cells (Figure 1). **(A)** Details of the mammary gland structure on female mice at different developmental and reproductive cycle stages. Kinetic analyses during development and the reproductive cycle can be seen in Supplementary Figure 1 Online. **(B)** Total number of mammary epithelial cells, **(C)** Stem cell frequencies, and **(D)** estimation of MaSC number during postnatal development and the reproductive cycle of the mammary gland. Data in B, C and D are represented as mean  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ . \* all comparisons were statistically significant ( $p < 0.05$ ), \*\* all comparisons, except with involution, were statistically significant ( $p < 0.05$ ); \*\*\* all comparisons, except with adult, were

statistically significant ( $p < 0.05$ ). **(E)** Mammary gland cellularity was plotted against stem cell number on the different postnatal and reproductive cycle stages. The Pearson's correlation was determined on log-transformed data,  $n = 27$ ,  $p < 0.01$ .

**Figure 3** Effects of hormone signals on postnatal mammary gland development. The effect of estrogens on mammary gland development was determined on bilaterally ovariectomized wild-type females (ovariectomized 3, 5, 6 or 8-week-old) and analyzed on 9-week-old animals. **(A)** Details of whole mounts of 9-week-old females ovariectomized at different ages (experimental design and whole mounts from all the animals are shown in Supplementary Figure 2 Online). In these animals, **(B)** Stem cell number and **(C)** total cellularity were determined. The data in B and C are represented as percentage ( $\pm$  SD) over non-ovariectomized controls ( $n = 4$ ).

**Figure 4** Analysis of MaSC in male mammary gland. **(A)** Details of the mammary gland structures comparing male and female mice. The corresponding whole mounts can be seen in Supplementary Figure 3 Online. **(B)** Male-derived mammospheres from wild-type **(C)** and GFP-transgenic mice. Inset in C shows the bright field picture of the mammosphere. **(D)** Comparison of total number of mammary epithelial cells, **(E)** stem cell frequencies and **(F)** estimated stem cell number in 3-week-old and adult females versus adult males. Data represented as mean  $\pm$ SD,  $n \geq 4$ . \* statistically significant with adult female ( $p < 0.05$ ), \*\* all comparisons were statistically significant ( $p < 0.05$ ).

**Figure 5** Male MaSCs are able to reconstitute a functional mammary gland. **(A)** Representative whole mounts of female mammary glands transplanted with GFP-donor cells from female or male analyzed under UV light in a dissecting microscope ( $n > 6$ ). **(B)** Tissue sections were analyzed by confocal microscopy. The donor origin of the analyzed structures (insets) was demonstrated by their expression of GFP. Immunohistochemical stainings with antibodies that

specifically identify ductal (TROMA-1), myoepithelial (SMA) or alveolar (NaPi-11b) cells were performed on female-derived and male-derived transplants. **(C)** Western blot showing the expression of  $\beta$ -casein in both male and female-derived transplants. **(D)** Total cellularity and stem cell number were evaluated on a series of male-derived reconstituted transplants.

**Figure 6** Model describing organ size control in the mammary gland. The mammary gland is still rudimentary at birth, containing only a few MaSCs generated during embryonic development. In the absence of estrogens and progesterone, the stem cell number will be maintained throughout the organism's life (ER<sup>-/-</sup> females, ovariectomized females, males) (cyan). At puberty, hormones  $\square$  induce symmetric MaSC divisions, increasing 20-fold their number (pink). Hormone signals during each reproductive cycle will transiently increase an additional three-fold MaSC number (red), returning after involution to values similar to adult females. The changes during the estrous cycle are not depicted.

## **Tables**

[Insert Tables here. Each table on its own page.]

[Insert Running heads here]

Mammary gland organ size control

