



SMAD3, prolifération cellulaire et métastases ganglionnaires dans le cancer du sein récepteurs hormonaux positifs

SMAD3, Cell proliferation and lymph nodes metastasis in breast cancer hormone-dependent

Mohamed Oueslati ¹, Nadia Sassi ², Ilhem Bettaieb ³, Amor Gamoudi ³, Khaled Rahal ³, Ridha Oueslati ¹

1. Faculté des sciences de Bizerte
2. CHU la Rabta /Université Tunis El Manar
3. Institut Salah Azaiez

RÉSUMÉ

Introduction : Le facteur de croissance tumorale- β (TGF- β) est une cytokine multifonctionnelle impliquée dans diverses pathologies dont le cancer du sein. Le statut des récepteurs hormonaux affecte le pronostic et la survie liés à ce cancer.

Objetif : Le but de notre étude est de déchiffrer l'interaction potentielle entre le TGF- β et la distribution moléculaire des récepteurs hormonaux (RH) dans 40 cas de cancer du sein.

Méthodes : Notre étude analyse les modèles d'expression de SMAD3 et des RH (ER α , ER β et PR) dans 40 tissus mammaires tumoraux en utilisant la technique qRT-PCR. Une évaluation de l'indice de prolifération Ki-67 et du statut HER2 par immunohistochimie a été réalisée.

Résultats : Une surexpression de SMAD3 est notée dans 13 cas ($p=0,003$). Une corrélation statistiquement significative entre cette surexpression, le grade histopronostique, le Ki-67 et les métastases ganglionnaires est également notée ($p=0,003$, $p=0,001$ et $p=0,01$ respectivement). Nos résultats montrent une association significative de l'expression de SMAD3 avec les sous-groupes (ER α +, ER β +) et PR+ ($p=0,009$ et $p=0,02$ respectivement). L'expression des sous-groupes moléculaires (SMAD3+, ER α +, ER β +) et (SMAD3+, PR+) est associée à des tumeurs agressives (haut grade histopronostique : $p=0,02$ et Ki 67 élevé : $p=0,01$).

Conclusion : SMAD3 peut favoriser la prolifération cellulaire et les métastases ganglionnaires dans le cancer du sein RH +.

Mots clés: Cancer du sein; SMAD3, Récepteurs des œstrogènes, Récepteurs de la progestérone, Ki-67, Métastases ganglionnaires.

ABSTRACT

Background: Tumor Growth Factor- β (TGF- β) is a multifunctional cytokine that plays a crucial role in various biological processes. TGF- β is also involved in various pathologies including breast cancer (BC). BC is strongly dependent on hormone receptors such as Estrogen receptors (ER α , ER β) and Progesterone Receptor (PR).

Aim: To audit the potential cross-talk between TGF- β and the molecular distribution of hormone receptors (ERs and PR).

Methods: The current study analyzes the expression patterns of SMAD3, ER α , ER β and PR in 40 breast tumor tissues using qRT-PCR. Furthermore, the Ki-67 and HER2/neu status have been detected by Immunohistochemistry.

Results: Our results show a decrease in the SMAD3 expression in 27 of the 40 cases while its expression is increased in the remaining 13 cases ($p=0,003$). The over-expression of SMAD3 is associated with high tumor grades. Moreover, there is a significant positive correlation between SMAD3+ with a high proliferative index and metastases ($p=0,001$ and $p=0,01$ respectively). The SMAD3 expression relative to (ER α , ER β) subgroups shows a significant association of SMAD3+ with the (ER α +, ER β +) subgroups ($p=0,009$). The same is true for PR, our results show a significant association of SMAD3+ with PR+ ($p=0,02$). Moreover, analysis of the expression of molecular subgroups (SMAD3+, ER α +, ER β +) and (SMAD3+, PR+) compared to clinical and pathological information shows a significant association with high grade tumors, a high proliferation index ($p=0,02$, $p=0,01$ respectively) and lymph node infiltration.

Conclusion: It is concluded that SMAD3 can promote cell proliferation and metastases in (ER α +, ER β +) and PR+ breast cancer.

Keywords: Breast cancer, SMAD3, Estrogen Receptors, Progesterone Receptor, KI-67, metastases

Correspondance

Mohamed Oueslati
Faculté des sciences de Bizerte
Email: oueslatimed84@gmail.com

INTRODUCTION

Le cancer du sein est un des cancers les plus fréquents chez la femme [1]. Son développement ainsi que sa progression impliquent la dérégulation des protéines de signalisation intracellulaire qui conduisent à une prolifération cellulaire incontrôlée et à des métastases.

Le TGF- β est un membre prototypique de la grande famille des cytokines pléiotropes [2-3-4]. Les perturbations de leurs voies de signalisation ont été liées à un ensemble de troubles du développement ainsi qu'à certaines maladies particulièrement le cancer [5]. Ces facteurs sont signalés par des ensembles spécifiques de récepteurs sérine/thréonine kinase de type I et de type II. Le TGF- β se lie au récepteur du TGF- β de type II (TbRII), qui à son tour active le récepteur du TGF- β de type I, également connu sous le nom de récepteur de l'activine, comme la kinase (ALK5). L'ALK5 activée recrute et phosphoryle les récepteurs Smads (R-Smads) SMAD2 et SMAD3 régulés par les récepteurs. Ceux-ci peuvent ensuite former des complexes hétéromères avec SMAD4, se transloqués vers le noyau et contrôler l'activation ou la répression des gènes cibles [3].

Dans le cancer du sein, le TGF- β joue un double rôle [6], il agit comme un suppresseur de tumeur aux stades précoces de la maladie lorsqu'il inhibe la croissance des carcinomes in situ via ses fonctions antiprolifératives. Cependant dans les stades avancés de la maladie, on pense que le TGF- β favorise la progression tumorale, en augmentant le caractère invasif des cellules tumorales [7-8]. D'autre part les récepteurs stéroïdiens ERs (ER α , ER β) et PR peuvent affecter la prolifération cellulaire, la tumorigenèse et les métastases dans le cancer du sein [9-10-11] et sont considérées comme des marqueurs pronostiques du développement de ce dernier [12-13].

Étant donné que la voie des récepteurs hormonaux (RE et PR) et la voie du TGF- β jouent un rôle important dans la tumorigenèse et la progression du cancer du sein, nous avons étudié l'interaction potentielle entre ces deux voies, en particulier au niveau de l'activité transcriptionnelle de SMAD3.

MÉTHODES

Patients et échantillons

Nous avons analysé 40 tissus de tumeurs mammaires malignes excisées au cours d'une tumorectomie. Des tissus sains ont été utilisés comme témoins. La présence de cellules malignes dans les échantillons a été déterminée par un histopathologiste. Chaque échantillon diagnostiqué a été divisé en deux fragments : un fragment pour l'étude immuno-histochimique et l'autre fragment a été conservé à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN. Toutes les données pathologiques,

cliniques et personnelles ont été séparées de tout identifiant personnel. Toutes les procédures suivies ont été examinées et approuvées par la commission d'éthique locale de l'Institut Saleh Azaiez (Tunisie).

Amplification par PCR

L'isolement d'ARN total et la transcription inverse ont été décrits précédemment [14]. Toutes les réactions PCR ont été réalisées à l'aide d'un système de détection de séquence ABI Prism 7700 (*Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA*). L'ADNc a été amplifié à l'aide du kit SYBR1-Green PCR Core Reagents (*Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.*). Les mélanges réactionnels utilisés pour la qPCR étaient les suivants : 10 μ l de SYBR Green (*Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.*), 6 μ l d'eau; 1 μ l d'amorce directe; 1 μ l d'amorce inverse et 2 μ l d'ADNc. Les amorces utilisées pour amplifier nos gènes cibles sont résumées dans le tableau 1. Le gène 36B4 a été utilisé comme contrôle endogène. Les niveaux relatifs d'ARNm ont été calculés sur la base des valeurs de CT et corrigés par rapport à l'expression du gène 36B4 selon l'équation $2^{-\Delta\Delta CT}$ [15]. Les niveaux relatifs d'ARNm dans le tissu témoin ont été assimilés à 1 et les autres valeurs ont été exprimées par rapport à cela.

Table 1. Listes des amorces

Gènes	Séquences nucléotidiques	Tm (°C)
ER α	Sens : 5'-TGCCAAGGAGACTCGCTA-3' Anti-sens :5'-TCAACATTCTCCCTCCTC-3'	66
ER β	Sens : '-GATTTCAGAAGCCAGCCAGAG-3' Anti-sens:5'TGCCTCTCGCTAGTTGATT-3'	55
PR	Sens:'-CGGCAGTGCCCATTTCCCCTAC-3' Anti-sens:5'-CTAATCCAATCACCTCCAGATT-3'	30
SMAD3	Sens : 5'-CGGCAGTGCCCATTTCCCCTAC-3' Anti-sens :5'-CTAATCCAATCACCTCCAGATT-3'	
36B4	Sens : 5'-AATCTCCAGGGGCACCATT-3' Anti-sens :5'-CGCTGGCTCCCACTTTGT-3'	

Toutes les paires d'amorces ont été initialement validées en les testant pour des efficacités d'amplification égales. Dans ces conditions l'efficacité d'amplification était proche de 2.

Immuno-histochimie

Le marquage par Immuno-histochimie de l'oncoprotéine Her2/neu et l'indice de prolifération Ki-67 ont été testés sur l'ensemble des tumeurs. Les principaux anticorps utilisés étaient : les anticorps de souris anti-humain Her2 (CB11) et les anticorps de souris anti-humain Ki-67 (MM1) (NovoCastra, Newcastle, Royaume-Uni). Cette partie a été déjà décrite précédemment [14].

Le marquage de Ki-67 a été enregistrée par rapport au pourcentage de cellules positives (1; <14% ; 2, 14–19% et 3, ≥ 20%). Dans cette étude, le seuil de positivité a été établi à 14%.

Analyses statistiques

L'analyse des résultats impliquant l'expression de SMAD3, les récepteurs d'œstrogènes ERα et ERβ, et le récepteur de progestérone PR, ainsi que les différents paramètres histologiques et cliniques ont été réalisés en utilisant le test χ2 avec le logiciel R (i386 3.2.1). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type. P<0,05 indique une différence statistiquement significative.

RÉSULTATS

Expression de SMAD3 dans les tumeurs du sein et sa relation avec les informations cliniques et moléculaires

Nos résultats montrent que SMAD3 est principalement inhibé dans le cancer du sein. En effet, seulement 32% des cas étudiés ont présenté une sur-expression de SMAD3, alors que le niveau d'expression de SMAD3 a été diminué par rapport au niveau normal dans 68% des cas (p=0,003 ; Tableau2).

Table 2. Répartition de SMAD3+ ET SMAD3- selon les paramètres clinico-pathologiques et moléculaires

	SMAD3+ N=13	Valeur de P	SMAD3- N=17	Valeur de P
N=40	13		27	0,003
Statut ménopausique				
Pre	5	NS	12	NS
Post	8		15	
Grade SBR				
SBRI	0	0,003	8	NS
SBRII	9		12	
SBRIII	4		7	
Statut des ganglions				
N+	10	0,01	15	NS
N-	3		12	
Ki-67				
≤14%	2	0,001	15	NS
>14%	11		12	
HER2/neu				
HER2+	3	0,01	8	0,006
HER2-	10		19	

L'analyse de la relation entre l'expression de SMAD3 et les paramètres cliniques montre une forte association de SMAD3+ aux grades avancés (SBRII et SBRIII) (p=0,003). Cependant, le résultat le plus important montre que 100% des tumeurs de grade (SBRI) sont SMAD3- (Tableau 2). De plus, nos résultats montrent une corrélation positive entre SMAD3+ et l'infiltration ganglionnaire (p=0,01).

Une analyse Immuno-histochimique a été réalisée pour évaluer

l'expression de HER2 et Ki-67 dans les échantillons de cancer du sein. Nos résultats montrent que SMAD3+ a été significativement associé à un Ki-67>14%. Cependant, une association négative significative a été observée entre les expressions SMAD3+ et HER2 (p=0,01 ; Tableau2). Relation entre l'expression de SMAD3 et les récepteurs hormonaux dans les tumeurs du sein.

Expressions de l'ARNm de ERα et ERβ et la relation avec SAMD3

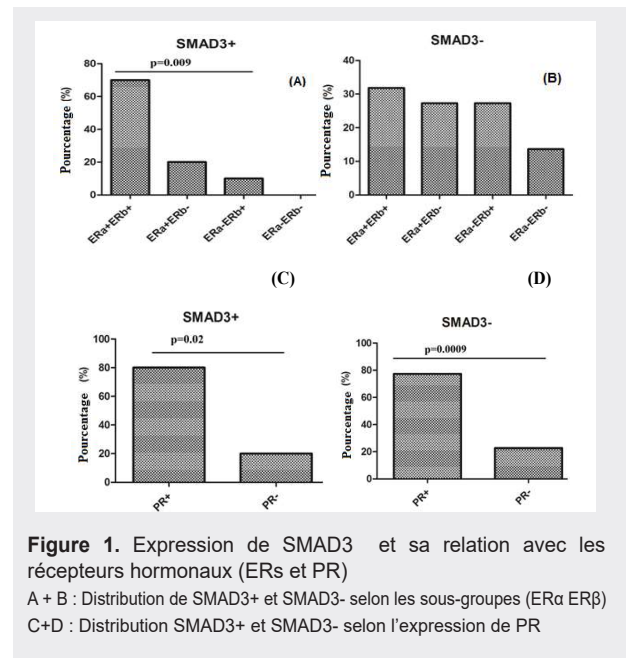
Nos résultats de qRT-PCR montrent une positivité de 68% pour ERα (p=0,003) et de 65% pour ERβ (p=0,01) dans les tumeurs du sein malignes. ERα et ERβ sont fréquemment coexprimés, en effet, le sous-groupe (ERα+, ERβ+) est significativement dominé, cependant un petit nombre d'échantillons de cancer du sein ont été (ERα-, ERβ-) (p=0,003 ; Tableau 3).

Table 3. Expressions d'ERα et ERβ et la répartition des sous-groupes (ERα ERβ) dans les tumeurs malignes du sein

ER: estrogen receptor

Statut	Nombre N= 40	Pourcentage %	Valeur de P
ERα+	27/40	67,50	p=0,003
ERβ+	26/40	65,00	p=0,01
ERα+ ERβ+	18/40	45,00	p=0,003
ERα+ ERβ-	10/40	25,00	
ERα- ERβ+	8/40	20,00	
ERα- ERβ-	4/40	10,00	

L'expression de SMAD3 (SMAD3+) a été significativement associée au sous-groupe (ERα+, ERβ+) (p=0,009 ; Figure1). En effet, 70% des tumeurs SMAD3+ sont également (ERα+, ERβ+) (Figure3).



Expression de PR et sa relation avec l'expression de SMAD3 PR est exprimé chez 78% des patients de notre cohorte. L'analyse de l'expression de SMAD3 montre qu'il existe une association statistiquement significative à la fois du SMAD3+ et du SMAD3- avec l'expression de PR (PR+); en effet, 80% des tumeurs SMAD3+ et SMAD3- sont également PR+ (P=0,02 et P= 0,0009 respectivement ; Figure1).

La relation des sous-groupes (SMAD3+, ERα+, ERβ+) et (SMAD3+, PR+) avec les informations cliniques et moléculaires

Afin de déterminer l'association potentielle des sous-groupes tumoraux (SMAD3+, ERα+, ERβ+) et (SMAD3+, PR+) avec les paramètres cliniques, la présence de lien entre ces derniers et le grade tumoral ainsi que les métastases ganglionnaires et le statut ménopausique a été examiné. Une association statistiquement significative a été observée entre le sous-groupe (SMAD3+, ERα+, ERβ+) et un haut grade histopronostique (p=5,6 e-05). En effet, le sous-groupe (SMAD3+, ERα+, ERβ+) est totalement absent dans le grade SBRI. De plus, nos résultats montrent une association statistiquement significative du sous-groupe (SMAD3+, ERα+, ERβ+) avec une infiltration ganglionnaire et un indice de prolifération élevé Ki-67>14% (p=0,02; Tableau4). A l'inverse, le sous-groupe (ERα+, ERβ+, SMAD3+) est en corrélation négative avec l'expression de HER2/neu (p=0,001 ; Tableau4).

Table 4. Répartition des sous-groupes de cancer du sein (ERα+ERβ+SMAD3+) et (PR+SMAD3+) selon les informations cliniques et moléculaires.

	ERα+ ERβ+ SMAD3+ N=10	PR+SMAD3+ N=11
Grade SBR		
I	0	0
II+ III	10	11
P	5,699 e ⁻⁰⁵	2,008 e ⁻⁰⁵
Status des ggs		
N+	8	7
N-	2	4
P	0,02	0,39
Ki-67		
≤14%	2	2
>14%	8	9
P	0,02	0,01
Her2/neu		
Positive	1	2
Negative	9	9
P	0,001	0,01

D'autre part, nos résultats montrent une forte association du sous-groupe (SMAD3+, PR+) avec les tumeurs de grade avancé (SBRII

et SBRIII) (p= 2e-05 ; Tableau4) et l'absence d'une association significative avec l'infiltration ganglionnaire. Cependant, la co-expression de PR et SMAD3 dans les tumeurs malignes du sein est significativement associée à un indice de prolifération élevé Ki67>14% (p=0,01 ; Tableau 4). En revanche, le sous-groupe du cancer du sein (SMAD3+, PR+) est négativement corrélé avec l'expression de HER2/neu (p=0,01 ; Tableau 4).

DISCUSSION

SMAD3 est l'un des effecteurs de la voie canonique de la cytokine TGF-β qui appartient à une large famille de facteurs de croissance. Le TGF-β est impliqué dans diverses pathologies dont le cancer, où il joue un double rôle de suppresseur ou de promoteur selon le grade de la tumeur [4]. En utilisant la technique PCR en temps réel, l'expression de SMAD3 a été étudiée dans une cohorte de tumeurs du sein. Les résultats montrent que l'expression de SMAD3 a diminué par rapport au témoin dans 68% des cas ; en revanche, son expression n'a augmenté que dans 32% des tumeurs (p=0,005 ; Tableau2). SMAD3 est principalement inhibé dans les tumeurs mammaires. Nos résultats sont en accord avec les données précédentes [16]. Cela peut expliquer son rôle clé dans la suppression tumorale par l'inhibition du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et également l'inhibition de l'expression de facteurs stimulant la croissance tel que l'oncogène c-myc [17]. L'analyse de l'expression de l'ARNm de SMAD3 par rapport au grade SBR montre que l'inhibition de SMAD3 débute au grade SBRI (stade d'initiation de la tumeur), atteint son maximum d'inhibition au grade intermédiaire (SBRII) mais diminue au grade avancé (SBRIII). Ceci peut s'expliquer par le double rôle joué par la cytokine TGF-β dans le cancer et plus précisément dans le cancer du sein. En effet, le TGF-β est un suppresseur de tumeur dans le grade tumoral primitif, ce qui explique l'inhibition de l'expression de SMAD3 dans les grades SBRI et SBRII (stades d'initialisation et de progression tumorale), alors qu'il joue le rôle de promoteur tumoral dans le grade SBRIII. Ce résultat est en accord avec des données antérieures qui ont démontré le double rôle du TGF-β [18-19-20]. De plus, nos résultats montrent une association significative de SMAD3 avec l'infiltration ganglionnaire (p=0,02 ; Tableau2) ce qui démontre l'implication de SMAD3+ dans les métastases. Ce résultat est en concordance avec l'étude, de Petersen (2010) qui

a montré que l'induction par le TGF- β de gènes cibles clés impliqués dans les métastases osseuses du cancer du sein dépendait de SMAD3 [21]. De plus, l'expression de SMAD3 (SMAD3+) est significativement associée à Ki67>14% ($p=0.02$; Tableau 2). Nos résultats sont en accord avec ceux retrouvés par Zhong et al. (2014). En effet, ils ont montré dans ce travail que SMAD3 favorise la prolifération cellulaire suite à une stimulation par le microRNA « miR-193b » [22].

D'autre part, les résultats de la présente étude indiquent que ER α et ER β ont été retenues dans la majorité des cas de cancer du sein. De plus, ER α et ER β sont majoritairement coexprimés dans notre série de tumeurs malignes du sein ($p=0,01$; Tableau 3). Ceci est en accord avec les études, de Murphy (2003) et Skliris (2008) qui ont montré que ER α et ER β sont souvent coexprimés dans les tumeurs malignes du sein [23-24]. De même, les résultats de cette étude révèlent que la PR est fortement exprimée dans notre cohorte de cancer du sein ($P=2,13e-5$). Nos résultats sont concordants avec les rapports précédents. En effet, Hop et al. (2004) et Yip et Rhodes (2014) ont montré que plus de 60% des tumeurs du sein sont PR+ [12-25].

Afin d'établir une relation claire entre la voie canonique du TGF- β et les récepteurs hormonaux dans le cancer du sein, le statut SMAD3 a été analysé en fonction des récepteurs hormonaux. Nos résultats montrent une forte association de SMAD3+ avec la co-expression de ER α et ER β ($p=0.009$; Figure 1). Ces résultats montrent qu'il existe une interaction potentielle entre la voie canonique du TGF- β et les récepteurs des œstrogènes. Ceci est en accord avec des études précédentes. En effet, ces études ont prouvé l'interaction entre les récepteurs des œstrogènes et la voie du TGF- β . Ainsi, Mastuda et al. (2001) ont montré qu'il existe une interférence entre le TGF- β et les récepteurs d'œstrogènes signalant via SMAD3 [26-27].

La présente étude a démontré une association significative de SMAD3- et SMAD3+, avec l'expression de PR dans notre cohorte de tumeurs du sein ($p=0,009$, $p= 0,02$ respectivement ; Figure 1). Ceci peut s'expliquer par le double rôle joué par le récepteur PR dans le cancer du sein. En effet, lorsque SMAD3 est inhibé, PR induit le développement tumoral. Des études antérieures suggèrent un impact majeur de la progestérone et des progestatifs dans la transformation maligne des cellules souches mammaires [28] ; ainsi que du récepteur PR qui est impliqué dans la tumorigenèse de la glande mammaire [29-30]. De plus, PR est impliqué dans la progression et les métastases du cancer du sein [31-32].

L'analyse des sous-groupes de cancer du sein (SMAD3+, ER α +, ER β +) et (SMAD3+, PR+) selon les informations

cliniques et moléculaires montre une différence significative dans la distribution selon le grade SBR ($p=0,001$ et $p= 0,0008$ respectivement). Cependant, nos résultats montrent que seul le sous-groupe (SMAD3+, ER α +, ER β +) est significativement associé à l'infiltration ganglionnaire et aux métastases ($p=0,032$; tableau4). SMAD3 joue un rôle indispensable dans la transition épithélium-mésenchyme (EMT) et dans l'amélioration de la migration cellulaire et de la transcription de facteurs favorables à la métastase [33]. D'autre part, la co-expression de ER α et ER β dans les tumeurs du sein est associée à une infiltration des ganglions et à des métastases [34-14]. Par conséquent, les effets de SMAD3 dans la transition épithélium-mésenchyme, la migration cellulaire et les métastases peuvent être renforcés par la co-expression des récepteurs d'œstrogènes ER α et ER β . De plus, les sous-groupes de cancer du sein (SMAD3+, ER α +, ER β +) et (SMAD3+, PR+) sont significativement associés à un indice de prolifération élevé (Ki-67>14%) ($p=0,03$ et $p=0,01$ respectivement ; Tableau 3). Les récepteurs des œstrogènes (ER α et ER β) et PR peuvent induire la prolifération cellulaire dans le cancer du sein [9-35]. Des études antérieures ont montré que le TGF- β peut stimuler la signalisation œstrogénique via une interaction physique directe entre SMAD3 et ER [26]. Dans la présente étude, il a été découvert que SMAD3 peut stimuler et améliorer l'activité proliférative des récepteurs hormonaux. Enfin, nos résultats montrent une association négative significative entre les sous-groupes de cancer du sein (SMAD3+, ER α +, ER β +) et (SMAD3+, PR+) avec l'expression de Her2/neu dans notre cohorte de tumeurs mammaires malignes. Ceci peut être utilisé comme un marqueur à la sensibilité hormonale.

CONCLUSION

Les résultats de la présente étude suggèrent que SMAD3 est principalement inhibé dans les tumeurs du sein. Ceci explique comment SMAD3 peut jouer le rôle de suppresseur de tumeur. Lorsque SMAD3 est surexprimé, il est coexprimé avec les récepteurs des œstrogènes (ER α et ER β) et le récepteur de la progestérone (PR). Les sous-groupes de cancer du sein (SMAD3+, ER α +, ER β +) et (SMAD3+, PR+) sont associés à des tumeurs de haut grade, à un indice de prolifération élevé et à une infiltration ganglionnaire. Nous pouvons conclure que SMAD3 peut interagir avec les ERs (co-expression d'ER α et ER β) et PR pour induire la progression tumorale, la

prolifération cellulaire et la métastase dans les tumeurs malignes mammaires. Des études in vitro et in vivo seront nécessaires pour confirmer nos résultats préliminaires.

Remerciements

Les auteurs remercient le chef du laboratoire de recherche en Immuno-Rhumatologie, le Dr Ilhem CHEOUR qu'a nous permet de réaliser des manipulations de qRT-PCR au sein de son honorable laboratoire. Les auteurs remercient également le Pr. Khemais BEN RHOUMA et Mr Ridha BEN YOUNES pour la révision linguistique de ce papier. La présente étude a été financée par l'unité IMEC, la Faculté des Sciences de Bizerte, l'Université de Carthage et le Ministère Tunisien de l'Enseignement Supérieur.

RÉFÉRENCES

- Harris L, Fritsche H, Mennel R et al. American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287–5312.
- Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 2007; 98: 1512–1520.
- John B Pawlak , Gerard C Blobe. TGF- β superfamily co-receptors in cancer. *Dev Dyn*.2022 Jan;251(1):137-163
- Massague J.TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008; 134: 215–230.
- Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(8):1741-1750
- Reiss M, Barcellos-Hoff MH. Transforming growth factor- β in breast cancer: a working hypothesis. *Breast Cancer Res Treat*1997; 45: 81–95.
- Off M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF- β 1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev*1996; 10: 2462–2477.
- Welch DR, Fabra A, Nakajima M.Transforming growth factor β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:7678–7682.
- Lin Z, Reierstad S, Huang CC, Bulun SE. Novel estrogen receptor alpha binding sites and estradiol target genes identified by chromatin immunoprecipitation cloning in breast cancer. *Cancer Res*2007; 67: 5017 5024.
- Skliiris GP, Leygue E, Curtis Snell L, Watson PH, Murphy LC. Expression of oestrogen receptor beta in oestrogen receptor alpha negative human breast tumours. *Br J Cancer*2006; 95: 616 626.
- Jensen EV, Cheng G, Palmieri C et al. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*2001; 98: 15197 16202.
- Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG et al. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res*2004; 10(8): 2751-2760.
- Punglia RS, Kuntz KM, Winer, EP, Weeks JC, Burstein HJ. The impact of tumor progesterone receptor status on optimal adjuvant endocrine therapy for postmenopausal patients with early-stage breast cancer: a decision analysis. *Cancer*2006; 106: 2576-2582.
- Oueslati M, Bettaieb I, Sassi N et al. ER α and ER β co-expression: An indicator of aggressive tumors and hormonal sensitivity. *Oncol Lett*2017; 14(2):1675-1682.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(T)). *Method*2001; 25: 402 408.
- Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, Rimm DL, Camp RL, Haffty BG. Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer Res*2002; 62:497–505
- Coffey RJ Jr, Bascom CC, Sipes NJ, Graves-Deal R, Weissman BE, Moses HL. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol*1998; 8(8): p.3088-93.
- Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGFbeta- induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*2009; 19(2): p. 156-72
- Dumont N, Arteaga CL. Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell*2003 3(6): p. 531-6.
- Chaudhury A, Howe PH. The tale of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: a soigné enigma. *IUBMB Life*2009; 61(10):929-39.
- Petersen M, Pardali E, van der Horst G et al. Smad2 and Smad3 have opposing roles in breast cancer bone metastasis by differentially affecting tumor angiogenesis. *Oncogene* 2010; 29(9):1351-61
- Zhong Q , Wang T, Lu P, Zhang R, Zou J, Yuan S . miR-193b promotes cell proliferation by targeting SMAD3 in human glioma. *J Neurosci Res* 2014; 92(5):619-26.
- Chen P, Li B, Ou-Yang L. Role of estrogen receptors in health and disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13:839005.
- Skliiris GP, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: estrogen receptor beta as a therapeutic target. *J Steroid Biochem Mol Biol*2008; 109 (1–2):1–10.
- Yip CH, Rhodes A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncol*2014; 10: 2293-301
- Matsuda T, Yamamoto T, Muraguchi A, Saatcioglu F. Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3. *J Biol Chem*2001; 276(46):42908-14.
- Ichiaki I, Aki H, Mitsutoshi W et al .Estrogen inhibits transforming growth factor beta signaling by promoting Smad2/3 degradation. *J Biol Chem*. 2010, 285(19):14747-55
- Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG et al. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*2010; 465(7299):803-7
- Britton T, Mark ES , Nagarajan K , Frank Z S. Progesterone and Breast Cancer. *Endocr Rev*. 2020 Apr 1;41(2):320-344
- Lanari C, Lamb CA, Fabris VT et al. The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*2009; 16(2):333-50.
- Piasecka D, Skladanowski AC, Kordek R, Romańska HM, Sądej R. Aspects of progesterone receptor (PR) activity regulation - impact on breast cancer progression. *Postepy Biochem*2015; 61(2):198-206.
- Hilton HN, Doan TB, Graham JD et al. Acquired convergence of hormone signaling in breast cancer: ER and PR transition from functionally distinct in normal breast to predictors of metastatic disease. *Oncotarget*2014; 5(18):8651-64.
- Millet C, Zhang YE. Roles of Smad3 in TGF- β signaling during carcinogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*2007; 17(4):281-93.

34. Speirs V, Parkes AT, Kerin MJ et al. Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: Poor prognostic factors in human breast cancer? *Cancer Res*1999; 59: 525-528.
35. Faivre EJ, Lange CA. Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol*2007; 27(2):466-80.