

Tesis de Posgrado

Modulación de la expresión de genes homeóticos en el desarrollo de la glándula mamaria murina

Srebrow, Anabella

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Srebrow, Anabella. (1997). Modulación de la expresión de genes homeóticos en el desarrollo de la glándula mamaria murina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2916_Srebrow.pdf

Cita tipo Chicago:

Srebrow, Anabella. "Modulación de la expresión de genes homeóticos en el desarrollo de la glándula mamaria murina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2916_Srebrow.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

Modulación de la expresión de genes
homeóticos en el desarrollo de la glándula
mamaria murina

Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires (Ciencias Biológicas)

Lic. Anabella Srebrow

DIRECTOR: Dra. Mina J. Bissell

CO-DIRECTOR: Dr. Alberto R. Kornblihtt

LUGAR DE TRABAJO:

Lawrence Berkeley National Laboratory-Universidad de California
Berkeley, California - Estados Unidos de Norteamérica.

1997

52

TITULO :

Modulación de la expresión de genes homeóticos en el desarrollo de la glándula mamaria murina.

PALABRAS CLAVES:

genes homeóticos; glándula mamaria; morfogénesis; matriz extracelular; diferenciación celular.

AUTOR:

Anabella Srebrow

TITLE:

Modulation of homeobox gene expression during mouse mammary gland development.

KEY WORDS:

homeobox-containing genes; mammary gland; morphogenesis; extracellular matrix; cell differentiation.

AUTHOR:

Anabella Srebrow

a vos,
esa personita a la que todavía no le conozco la cara

Eran blancas las plumas de los pájaros
y blanca la piel de los animales.
Azules son, ahora, los que se bañaron en un
lago donde no desembocaba ningún río, ni
ningún río nacía.
Rojos, los que se sumergieron en el lago de la
sangre derramada por un niño de la tribu
kadiueu.
Tienen el color de la tierra los que se
revolcaron en el barro, y el de la ceniza los
que buscaron calor en los fogones apagados.
Verdes son los que se frotaron sus cuerpos en
el follaje,
y blancos los que se quedaron quietos.

Eduardo Galeano/ Memoria del fuego

Gracias Alberto Kornblihtt!!!

por haberme criado desde potrilla, por tu presencia, por haberme enseñado tanto que necesitaría muchísimo lugar para detallarlo, por haberme guiado y estimulado durante toda la carrera, por enseñarme mucho más que biología molecular, por haberme abierto las puertas no sólo de la investigación sino también de la docencia y finalmente, por haberte "enojado" con mi partida, y alegrado con mi retorno.

Gracias Mina Bissell!!!

por tu apoyo constante, tu confianza, tu estímulo, tu intensísimo cariño y tu informalidad, esa que me permitió aprender no sólo en tu oficina sino en un café, en un shopping, en la peluquería o frente a una chimenea. Porque estos años en tu laboratorio me enseñaron que existen muchas maneras de entender y de hacer ciencia. Por haberme dado la oportunidad de quererte y odiarte, de discutirte hasta el hartazgo aquellos criterios no compartidos y, principalmente de crecer.

Gracias a la dirección del Lawrence Berkeley National Laboratory y del INGEBI por haberme permitido hacer uso y "abuso" de sus instalaciones.

Gracias Vivi Bernath y Andrés Muro!!!

porque fueron ustedes, quienes hace muchos años, me enseñaron el ABC del laboratorio, por toda la paciencia, los experimentos compartidos, por todo el cariño y el apoyo.

Gracias Charles Daniel, Yael Friedmann, Phyllis Strickland y Kathy....!!!

por haberme hecho sentir un integrante más de su laboratorio, por haberme ayudado en más de un momento de "desesperación", por permitirme disfrutar del campus de UCSC, pero principalmente por la tensión y la emoción de los "in situ" compartidos.

Gracias Connie Myers!!!

por haberme tomado de hija, de jefa, de compinche y de "technician" a penas transpase la puerta de entrada del "building 83", por habernos incentivado mutuamente a que la tesis había que terminarla, por tantas

horas en el cuarto de cultivo, por tantos cigarrillos inhalados como fumadora pasiva, pero aún más importante por haberme abierto la cabeza.

Gracias Peter Jones!!!

por una amistad que sobrepasó barreras idiomáticas y culturales, por tantos códigos compartidos a pesar de haber nacido en diferentes continentes y hemisferios

Gracias Nancy Boudreau, Calvin Roskelley, Christian Schmidhauser, Andre Lochter, Pierre Desprez, Valery Weiver, por lo que cada uno de ustedes me enseñó y me dejó enseñarle

Gracias Ali Ravanpay y Dinah Levy!!!

por dejarme jugar a la "maestra ciruela", por hacerme pensar tan intensamente frente a la avalancha de preguntas interminables, por su ternura, su ingenuidad y su entusiasmo.

Gracias Gustavo Pesce!!

por tan buenas discusiones a lo largo de estos años, por los chismes compartidos, por tu espontaneidad, por tu carácter podrido que a veces se parece tanto al mío, por tantos e-mails y tan largos, en fin, por todo el cariño.

Gracias Bill Johansen, Martha Franklin, Kelly Bentz, Jill Hatier y Nina Baley por estar siempre disponibles, por sacarme de más de un apuro o incomprensión, por todo el apoyo de ustedes recibido.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio de Mina Bissell por haberme soportado.

Gracias a todos los "Fibronectinos" y a todos los integrantes del INGEBI por su apoyo durante estos meses de "aterrizaje".

Gracias a todos los que con sus visitas, sus e-mails, sus cartas, sus cajas de Havanna o tarros de Chimbote, etc. me (nos) acompañaron durante estos años

Gracias Jorge!!!

por haber sido culpable del "exilio" y cómplice de la "repatriación", porque sin vos no sólo esta tesis sino muchísimas otras cosas más no hubieran sido ni serían posibles, por ese hombro en el que pude llorar cada angustia, cada frustración y por esa sonrisa que me acompañó en cada alegría y cada logro, y por infinitas cosas más que no hay por que andar detallando en una tesis doctoral.

Gracias madre, padre, hermana y demás miembros de la familia

porque creo que algo tuvieron que ver en todo esto, por haberme acompañado a lo largo de estos 30 años de la mejor manera posible, por todo el estímulo, el respeto, la confianza, y el cariño.

Indice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
I. Introducción.....	3-35
I.1 - Glándula mamaria	
I.1a - Crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria murina.....	4-9
I.1b - Rol de la matriz extracelular en el desarrollo de la glándula mamaria.....	10
I.1c - Características embrionarias de la glándula mamaria post-natal.....	11
I.2 - Células mamarias murinas en cultivo	
I.2a - Diseño de modelos de cultivo.....	12-15
I.1b - Jerarquía de señales dependientes de la matriz extracelular y regulación de la expresión génica tejido-específica.....	16-18
I.3 - Genes Homeóticos	
Generalidades.....	18-26
I.3a - Genes homeóticos como reguladores del desarrollo en mamíferos.....	27-29
I.3b - Genes homeóticos durante la vida adulta.....	29-30
I.3c - Genes homeóticos y cancer.....	31-33
I.4 - Glándula mamaria y genes homeóticos.....	33-34
I.5 - Objetivos.....	35
II. Materiales y Métodos.....	36-64
II.1 - Cultivo Celular.....	37
II.2 - Preparación de ARN.....	43-45
II.3 - Síntesis de ADN copia.....	46
II.4 - Reacciones en cadena de polimerasa (PCR) con oligonucleótidos degenerados.....	47-48
II.5 - Purificación, clonado y secuenciación de productos de "PCR".....	48-51
II.6 - Clonado de fragmentos de ADNc del gen <i>Hoxb-7</i> por "PCR".....	51-54
II.7 - Ensayos de Northern blot.....	55-56
II.8 - Hibridación "in situ".....	57-60
II.9 - Animales utilizados.....	61
II.10 - Producción de anticuerpos policlonales contra la proteína <i>Hoxb-7</i>	61-63
II.11 - "Buffers" utilizados.....	64

III. Resultados	65-105
III.1 - Identificación de ARN mensajeros de genes <i>Hox</i> en células mamarias murinas.....	66-74
III.2 - Expresión de los genes <i>Hoxa-1</i> y <i>Hoxb-7</i> en la glándula mamaria murina.....	75-77
III.3 - Localización de transcritos <i>Hoxb-7</i> en la glándula mamaria murina.....	78-80
III.4 - Los niveles de ARNm de <i>Hoxa-1</i> y <i>Hoxb-7</i> en células mamarias en cultivo disminuyen en presencia de una membrana basal exógena.....	80-83
III.5 - Consecuencias del cambio en la morfología celular sobre la expresión de los genes <i>Hoxa-1</i> y <i>Hoxb-7</i>	84-87
III.6 - Expresión de <i>Hoxa-1</i> y ciclo celular.....	87-92
III.7 - Otros posibles mecanismos regulatorios del gen <i>Hoxb-7</i>	92-97
III.8 - Expresión de <i>Hoxa-1</i> en tumores mamarios.....	97-100
III.9 - Expresión de <i>Hoxa-1</i> y <i>Hoxb-7</i> en cultivo de células tumoraes mamarias.....	101-105
 IV. Discusión	 106-118
 V. Conclusiones	 119-120
 VI. Bibliografía	 121-136

RESUMEN

Los genes homeóticos codifican para reguladores transcripcionales involucrados en la formación de patrones y las decisiones de destino celular durante la embriogénesis. Recientemente, ha despertado gran interés la función de dichos genes en tejidos adultos en continuo desarrollo así como también en procesos tumorigénicos. La mayor parte del crecimiento y morfogénesis de la glándula mamaria ocurre durante la vida subadulta y adulta del animal y ciertos estadios de la glándula postnatal presentan características de tipo embrionarias. Regulación de formación de patrones, diferenciación celular e interacciones epitelio-estroma tienen lugar una vez finalizada la embriogénesis y reocurren durante cada ciclo de preñez, lactancia e involución. Debido a que la matriz extracelular influencia el desarrollo funcional y morfogenético de la glándula mamaria, investigamos si las señales provenientes de dicha matriz podrían estar involucradas en la expresión y regulación de genes homeóticos. Mediante una estrategia basada en reacciones en cadena de polimerasa, identificamos la expresión de 5 genes homeóticos pertenecientes a dos "clusters" del complejo Hox, en células mamarias murinas en cultivo. Un gen de cada uno de estos "clusters", *Hoxa-1* y *Hoxb-7*, fue elegido para una caracterización más profunda. Encontramos que *Hoxb-7* se expresa tanto en cultivo como *in situ*, donde su expresión es regulada a lo largo del desarrollo glandular y se localiza en el epitelio mamario. *Hoxa-1* no se expresa en ningún estadio del desarrollo de la glándula murina normal pero sí se expresa en algunos tumores mamarios y en células mamarias funcionales, no malignas, cultivadas sobre plástico de cultivo. La expresión de ambos genes es reprimida cuando las células son cultivadas sobre una membrana basal reconstituída. Mientras que la regulación negativa de *Hoxb-7* requiere estrictamente la presencia de membrana basal y cierta conformación celular, la de *Hoxa-1* se logra mediante el cultivo de las células sobre un sustrato inerte antiadhesivo que permite una reorganización del citoesqueleto y concomitantemente cambios de morfología celular. En células tumorales, la expresión de *Hoxb-7* es prácticamente indetectable y la expresión de *Hoxa-1* no es regulada por ninguno de estos factores microambientales.

ABSTRACT

Homeobox-containing genes encode transcriptional regulators involved in cell fate and pattern formation during embryogenesis. Recently, their role in continuously developing adult tissues as well as in tumorigenesis has also become a subject of interest. The mammary gland undergoes most of its growth and morphogenesis in the subadult and adult animal and certain stages of the postnatal gland exhibit embryonic-like features. Regulation of pattern formation, cell differentiation and epithelial-stromal interactions take place after completion of embryogenesis and reoccur during each cycle of pregnancy, lactation and involution. Because the extracellular matrix is known to influence both functional and morphological development of the mammary gland, we asked whether the extracellular matrix signaling could be involved in the expression of homeobox genes. Using a polymerase chain reaction based-strategy, five members of two Hox gene clusters were shown to be expressed in cultured mouse mammary cells. One gene from each cluster, *Hoxa-1* and *Hoxb-7*, was chosen for further analysis. We found that *Hoxb-7* is expressed both in culture and *in situ*, where it is developmentally regulated and localized to the mammary epithelium. *Hoxa-1* is not expressed at any stage of the normal mammary gland but was shown to be expressed in some mammary tumors as well as in non-malignant and functional mammary cells on tissue culture plastic. The expression of both genes was suppressed when cells were cultured on a reconstituted basement membrane. Whereas *Hoxb-7* strictly required the basement membrane and a certain cellular conformation for suppression, *Hoxa-1* down-regulation could be mimicked by culturing the cells on an inert substratum (polyHEMA) that allows reorganization of actin cytoskeleton and thus changes in cell shape. In malignant cells the expression of *Hoxb-7* was practically undetectable and *Hoxa-1* expression was not responsive to any of these microenvironmental regulators.

I. Introducción

I.1 - LA GLANDULA MAMARIA

A diferencia de la mayoría de los órganos, los cuales para el momento del nacimiento han completado su morfogénesis y el desarrollo subsiguiente consiste meramente en el crecimiento o proliferación de estructuras preexistentes, la glándula mamaria realiza casi toda su morfogénesis durante la vida subadulta y adulta del animal.

I.1a - Crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria murina

Al nacimiento, la glándula mamaria del ratón hembra es rudimentaria, estando formada por simples cuerdas epiteliales con escasas ramificaciones. La proliferación y morfogénesis que tuvieron lugar entre el día 11 del desarrollo embrionario y el nacimiento, se detienen hasta la pubertad, momento en el cual la acción de las hormonas sexuales femeninas desencadena una ramificación "invasiva" de los ductos epiteliales a través del estroma graso. El desarrollo de un patrón de ramificación tejido-específico es el resultado de interacciones entre el tejido epitelial y el estroma (Sakakura, 1987). Una vez que todo el árbol epitelial es establecido, la proliferación celular cesa y el epitelio ductal maduro permanece en reposo hasta ser estimulado por las hormonas de la preñez (Topper y Freeman, 1980). El brote terminal del ducto en crecimiento está formado por células denominadas "CAP cells", las cuales constituyen una población totipotente capaz de proveer nuevas células mioepiteliales y ductales necesarias para el crecimiento del árbol epitelial y a su vez son las responsables de la síntesis de la lámina basal (Silberstein y Daniel 1982). La lámina basal forma parte de la membrana basal, una especialización de la matriz extracelular (MEC), compuesta principalmente por laminina, colágeno de tipo IV, entactina y proteoglicanos, que se localiza en la cara basal de los diversos tejidos

epiteliales. A lo largo de los ductos, las células epiteliales ductales están en contacto continuo con células mioepiteliales y por lo tanto separadas de la membrana basal la cual es producida por el mioepitelio y el estroma aledaño (Williams y Daniel, 1983).

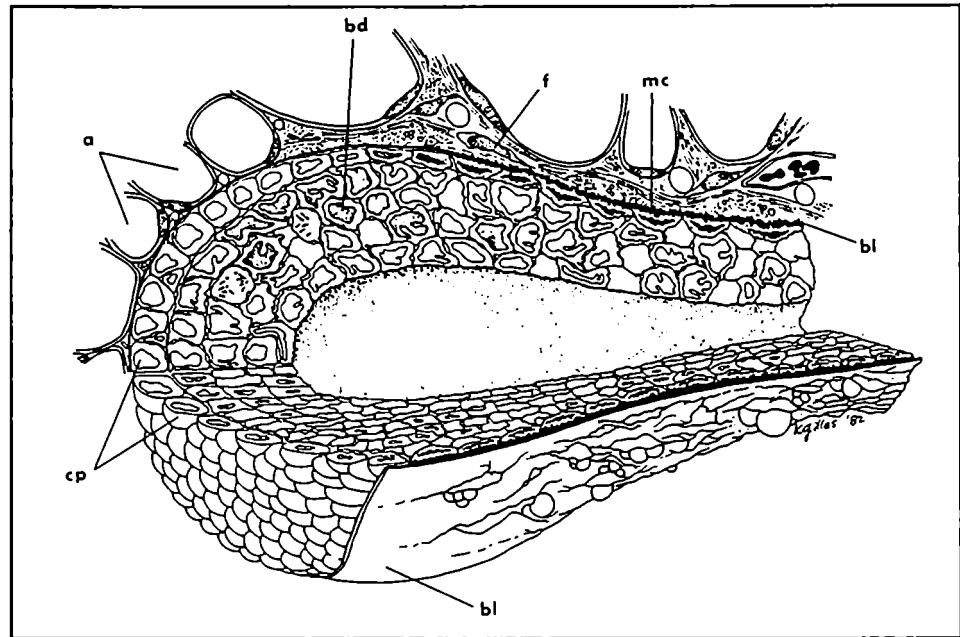


FIGURA 1. Brote terminal de un ducto mamario murino.

Esquema hecho a partir de observaciones al microscopio óptico y electrónico. Los adipocitos (**a**) se encuentran adyacentes a las células "cap" (**cp**) en el extremo del ducto. Fibrocitos (**f**) componen la túnica de tejido conectivo alrededor de la región del cuello. La lámina basal (**bl**) se representa cortada para exponer la células "cap" subyacentes. Las células "cap" son cuboidales pero se vuelven progresivamente achatadas hacia la región central del brote terminal, se diferencian en células mioepiteliales (**mc**) y se encuentran continuas a ellas en la región del cuello. La lámina basal que recubre a las células mioepiteliales en la región media es 14 veces más gruesa que la que recubre el extremo. Se observan mitosis en células "cap" y células del cuerpo ("body cells", **bd**).

(Reproducido de Williams y Daniel, 1983).

Con la preñez, comienza la formación de estructuras lobuloalveolares responsables de la producción y secreción de leche. Este proceso de crecimiento y diferenciación culmina al momento de la lactancia. La citodiferenciación está caracterizada por la ubicación basal de los núcleos, localización apical del aparato de Golgi, presencia de vesículas secretorias y micelas grasas, así como también microvellosidades bien desarrolladas en la superficie apical. El mioepitelio es discontinuo a lo largo de los pequeños ductos y forma una estructura semejante a una canasta alrededor de los lóbulos y alvéolos. De esta manera las células epiteliales secretoras se apoyan directamente sobre la lámina basal, la cual en este caso es producida por el epitelio alveolar (Williams y Daniel, 1983).

Muy prontamente luego del parto, el epitelio forma uniones estrechas apicales que sellan el lumen glandular del espacio extracelular para facilitar el transporte de fluido y estimular la secreción de proteínas de la leche. Las proteínas de la leche son secretadas hacia el lumen alveolar que se continúa con el sistema de ramificaciones ductales. Secreción polarizada y compartimentalización de proteínas de la leche son características esenciales de la glándula mamaria lactante. Durante la lactancia, las células mioepiteliales se contraen en respuesta a oxitocina forzando a los alvéolos a liberar leche hacia los ductos.

La involución de la glándula ocurre rápidamente a partir del destete. El proceso se caracteriza por la destrucción de la membrana basal, mediada por la actividad de metaloproteinasas endógenas, la remodelación de la matriz extracelular, la regulación negativa de la expresión génica característica de células epiteliales diferenciadas y la pérdida de la integridad epitelial. Los alvéolos se colapsan formando condensaciones de células epiteliales rodeadas por adipocitos. Una muerte celular programada (apoptosis) masiva elimina la mayor parte de las células epiteliales alveolares y la glándula retorna al estado de reposo, no-funcional, repoblándose de células estromales. Al comienzo de la involución, la laminina y el

colágeno tipo IV son degradados mientras que la tenascina es en cambio depositada en la matriz extracelular. Un balance preciso entre las proteinasas que degradan componentes de la matriz extracelular y los inhibidores de dichas proteinasas es indispensable para el desarrollo normal de la glándula mamaria (Talhok 1992).

FIGURA 2. (página siguiente)

Glándulas enteras ("whole mounts") (a-c) y cortes histológicos (d-g) correspondientes a los distintos estadios de desarrollo post-natal de la glándula mamaria murina.

(a) Glándula mamaria de ratón hembra de 3 semanas de edad. Antes de la pubertad, los brotes terminales son pequeños y las ramificaciones ductales son escasas. (11X)

(b) Glándula mamaria de ratón hembra de 5 semanas de edad. Nótese los brotes terminales engrosados (flecha) en el extremo de los ductos en crecimiento, el grado de crecimiento y el aumento de las ramificaciones. (11X)

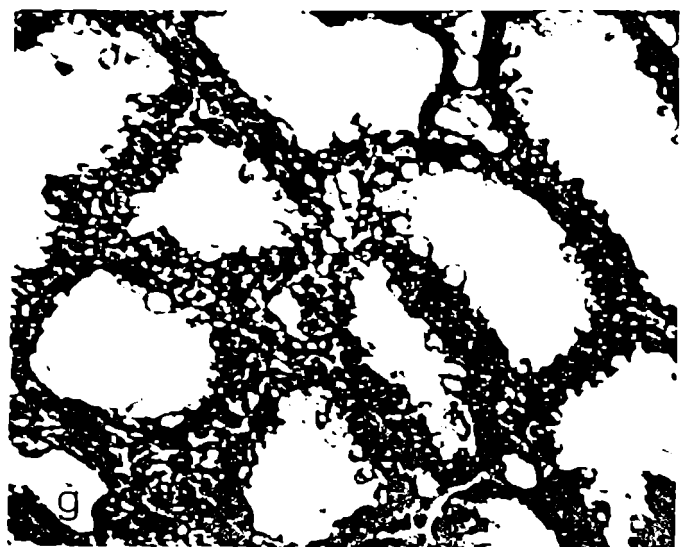
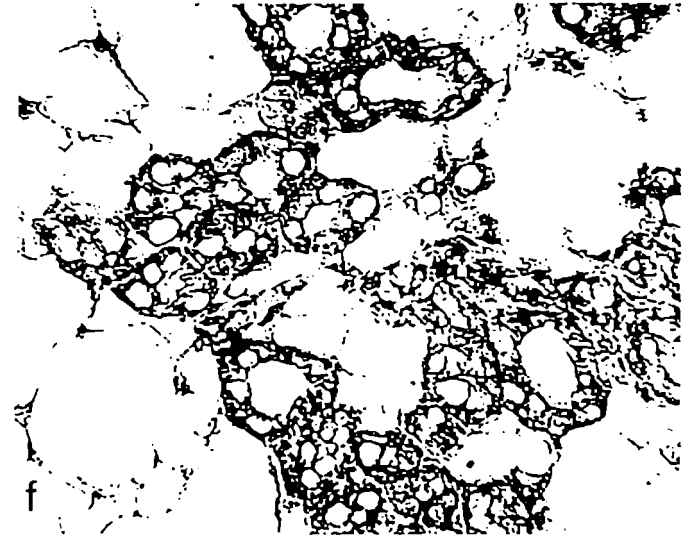
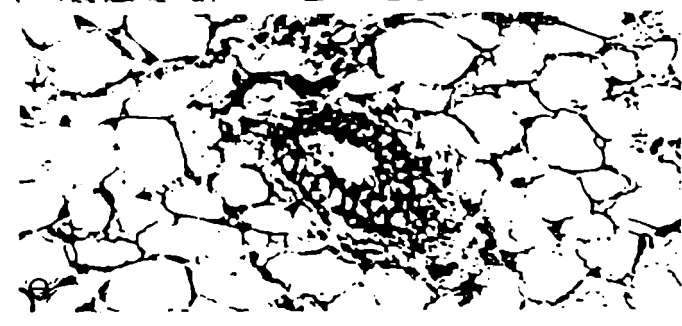
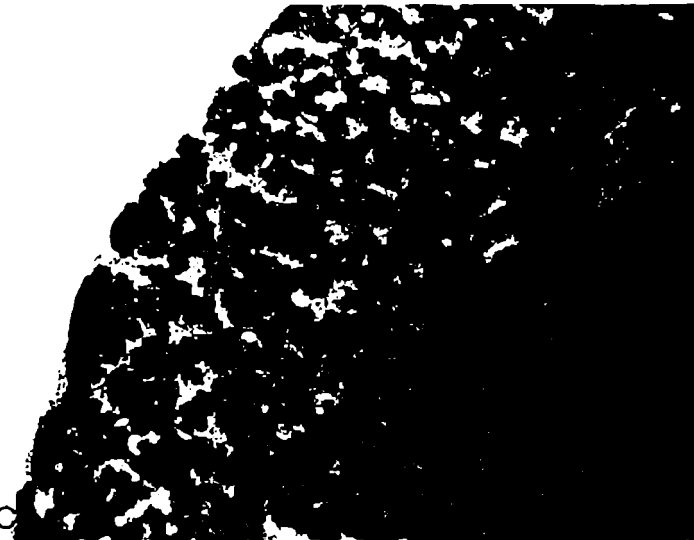
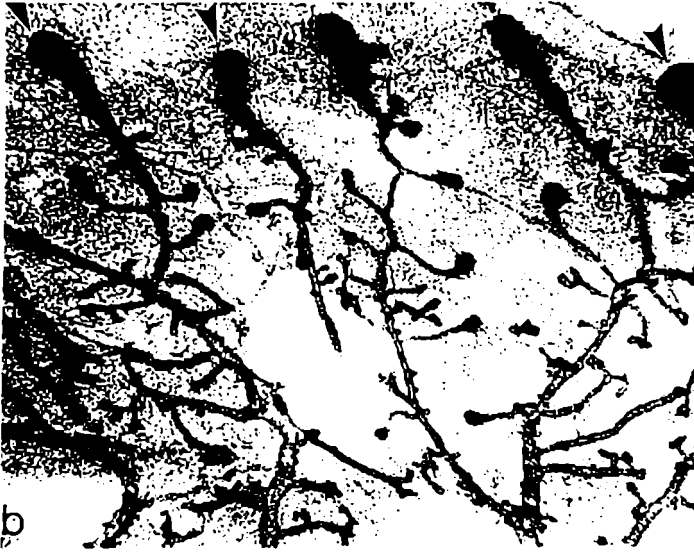
(c) Glándula mamaria de hembra preñada. Se puede observar un gran número de células alveolares las cuales son el resultado de la proliferación y diferenciación del parénquima mamario durante la preñez. (9X)

(d) Corte longitudinal de un brote terminal de glándula de ratón hembra de 5 semanas de edad mostrando una capa interna de células epiteliales y una capa externa de células "cap"(flecha). (100X)

(e) Corte de un ducto de glándula de ratón hembra de 5 semanas de edad. El ducto está delineado por una única capa de células epiteliales lumbales más una capa discontinua de células mioepiteliales. La sombra oscura en la base de las células (flecha) es queratina visualizada mediante tinción inmunohistoquímica. (110X)

(f) Corte de un lóbulo de glándula mamaria de ratón hembra en la mitad de la preñez. Nótese la presencia de múltiples alvéolos organizados formando un lóbulo. (110X)

(g) Corte de glándula mamaria durante el período de lactancia. El estroma se encuentra completamente ocupado por alvéolos, los cuales sintetizan y secretan componentes de la leche hacia el lumen. Nótese la aparente ausencia de adipocitos. (110X)



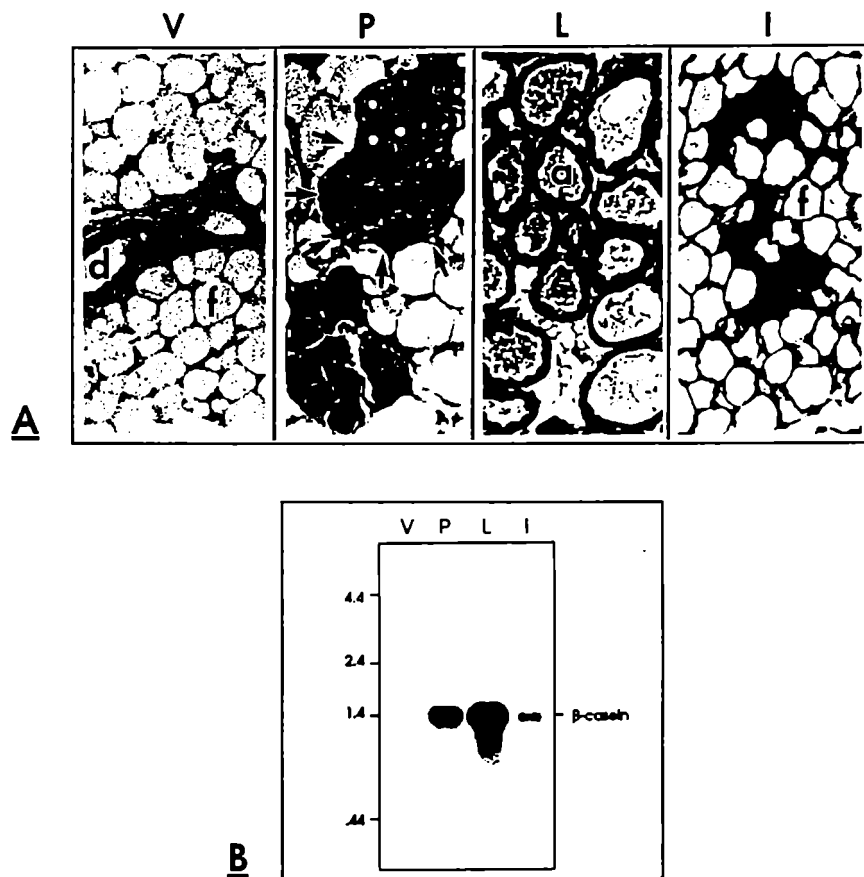


Figura 3.

Desarrollo de la glándula mamaria murina a través de los estadios de hembra virgen (V); preñada (P); lactante (L) y en involución (I).

A. Cortes transversales teñidas con hematoxilina-eosina. La glándula de hembra virgen consiste principalmente de un árbol ductal (D) inmerso en un estroma compuesto por células grasas ("fat cells"; f). Durante la preñez, la brotación de los alveolos (flechas) es lo más prominente y gradualmente reemplaza al tejido adiposo. Durante la lactancia, estructuras alveolares (a) ocupan la totalidad de la glándula. Cuando la glándula involuiona la morfología se vuelve similar a aquella observada en la glándula de ratón hembra virgen.

B. Presencia de ARNm de β -caseína en muestras de ARN total de glándulas mamarias en los estadios mencionados anteriormente, analizadas mediante ensayos de Northern blot. Se observa que la expresión comienza a detectarse durante la preñez, se hace máxima en la lactancia y luego disminuye mientras la glándula involuiona.

(Reproducido de Howlett y Bissell, 1990)

I.1b - Rol de la matriz extracelular en el desarrollo de la glándula mamaria

Con el propósito de estudiar más profundamente el papel que desempeña la membrana basal durante el desarrollo de la glándula *in vivo*, ratones transgénicos que expresan una isoforma autoactivable de la metaloproteinasa de matriz extracelular estromalisina-1 ("stromelysin-1", SL-1) fueron generados en el laboratorio de la Dra. Bissell (Simpson et al., 1994). La expresión del transgén se encuentra regulada por el promotor del gen de la proteína ácida del suero ("whey acidic protein", WAP), un promotor específico del epitelio mamario murino. Las glándulas mamarias de estos animales transgénicos presentan un desarrollo alveolar prematuro, no sólo morfológica sino también funcionalmente, ya que las glándulas de hembras transgénicas vírgenes maduras (70 días de edad) sintetizan niveles de β -caseína semejantes a aquellos observados en hembras normales (no transgénicas) de 9-12 días de preñez. A medida que las hembras transgénicas transitan por estadios de preñez, muchos de los alvéolos epiteliales se colapsan. Este fenómeno morfológico es acompañado por una disminución de la expresión de proteínas de la leche y apoptosis de células epiteliales característica de los estadios de involución. Aún se desconoce el mecanismo por el cual la expresión inapropiada de SL-1 conduce a la hiperproliferación, hiperramificación de ductos y diferenciación prematura, pero es posible especular que la acción proteolítica de esta enzima podría: a) generar o activar algún factor estimulador del crecimiento, b) destruir un factor inhibitorio o c) liberar factores de crecimiento que normalmente se encuentran secuestrados por la membrana basal (Simpson et al., 1994). Aún más sorprendente es el hecho de que estos animales transgénicos presentan una alta incidencia de tumores mamarios (Simpson et al., 1995).

I.1c - Características embrionarias de la glándula mamaria post-natal

Si bien el desarrollo morfogénico de la glándula mamaria ocurre en la vida post-natal, éste se asemeja en muchos aspectos al desarrollo embrionario: 1) durante la pubertad el crecimiento es rápido e invasivo, siendo muy similar al que ocurre durante el desarrollo de otras estructuras embrionarias ramificadas como pulmones, glándula salival y riñones; 2) el desarrollo de la glándula mamaria durante la vida adulta está determinado por influencias estromales. Esto fue demostrado mediante el trasplante de mesénquima salival embrionario en glándula mamaria adulta que resultó en el desarrollo del epitelio mamario con fenotipo de epitelio salivar (Sakakura, 1976; Sakakura, 1982). Es importante destacar que sólo en estadios juveniles, el epitelio mamario es capaz de responder a mesénquima embrionario de diverso origen ya que la preñez restringe esta plasticidad de respuesta; 3) los cambios moleculares y estructurales de la lámina basal y matriz extracelular que acompañan la formación de los ductos son de naturaleza embrionaria (Bernfield y Banerjee, 1982; Bernfield et al., 1984)

El epitelio mamario retiene cierto potencial embrionario a lo largo de los ciclos de crecimiento, diferenciación morfológica y funcional e involución. Esto se demuestra por la capacidad de un ducto que ha atravesado ya un período de crecimiento y se encuentra en estado de reposo de reiniciar un proceso morfogénico cuando se lo implanta en un estroma mamario libre de epitelio. (Faulkins y DeOme, 1958; DeOme et al., 1959).

I.2 - CELULAS MAMARIAS MURINAS EN CULTIVO

I.2a - Diseño de modelos de cultivo

Cuando células epiteliales mamarias, que se encuentran expresando proteínas de la leche, son removidas de glándulas de animales en estadios intermedios o tardíos de preñez y puestas en placas convencionales de cultivo de tejidos, pierden su capacidad de lactar (Emerman 1977; Lee 1984). Esto ocurre tan pronto como las células se adhieren y esparcen sobre la superficie de la placa formando una monocapa. Las células mantienen algunas características epiteliales tales como la expresión de proteínas de uniones adherentes, desmosomas y queratinas (Streuli 1994) y sintetizan receptores funcionales para prolactina (Ashkenaz y Bissell, comunicación personal). Sin embargo no sintetizan proteínas de la leche en respuesta a hormonas lactogénicas (hidrocortisona y prolactina).

Diversos microambientes de cultivo han sido desarrollados con el objeto de mantener la expresión de funciones diferenciadas de células mamarias epiteliales. En todos los casos el componente clave es la membrana basal. El primer modelo desarrollado fue el gel de colágeno (Emerman et al., 1977). Se pudo observar que geles de colágeno tipo I de cola de rata proveen un excelente sustrato para células epiteliales mamarias, a pesar de que al igual que con placas plásticas de cultivo, las células necesitan la presencia de suero para adherirse y esparcirse. Sobre geles de colágeno I las células forman una monocapa incapaz de diferenciarse en respuesta a hormonas lactogénicas incluso luego de varios días en ausencia de suero. Sin embargo, una simple manipulación del microambiente consistente en la "flotación" del gel por medios mecánicos (ruptura del contacto del gel con la placa de cultivo), hace que las células contraigan el gel y formen una monocapa completamente polarizada la cual deposita su propia membrana basal. Concomitantemente con la

formación de membrana basal se induce la síntesis de proteínas de la leche.

Actualmente sabemos que es esta membrana basal endógena, la responsable de la inducción de la síntesis de proteínas de la leche (Streuli y Bissell 1990; Streuli et al 1991, 1995).

Un avance aún mayor en el desarrollo de un modelo de cultivo que permitiese el mantenimiento de un fenotipo lactante surgió con la introducción de la matriz de EHS (Li et al 1987). Esta consiste en una membrana basal reconstituída, aislada de tumores Engelbreth-Holm-Swarm (Kleinman 1986) que al ser utilizada en forma de gel es un sustrato permisivo para la diferenciación morfológica y funcional de células mamarias. Alvéolos epiteliales aislados de glándulas mamarias de ratones hembra preñadas mantienen su morfología alveolar cuando son plaqueados sobre este tipo de matriz extracelular. Células tripsinizadas de monocapas formadas sobre plástico de cultivo, al ser plaqueadas sobre esta matriz forman agregados multicelulares y sufren una importante morfogénesis dando origen a estructuras alveolares formadas por una única capa de células epiteliales polarizadas con un lumen central hacia el cual son secretadas proteínas de la leche (Streuli y Bissell, 1991). Estas estructuras tridimensionales diferenciadas en cultivo son muy similares a los alvéolos observables *in vivo* (Aggeler et al., 1991). Micelas conteniendo caseína y vacuolas grasas son secretadas vectorialmente hacia el lumen, mientras que otras proteínas de la leche tales como transferrina son secretadas hacia ambos compartimentos, luminal y basal (Barcellos-Hoff et al., 1989; Aggeler et al., 1991).

Estos modelos de cultivo indican que la membrana basal provee las señales necesarias para la diferenciación morfológica y funcional de células mamarias que se encuentran ausentes en los sistemas de cultivo convencionales. Haciendo una analogía con las interacciones epitelio-mesénquima que ocurren *in vivo*, se podría especular que la membrana basal sería la superficie del componente mesenquimático

sobre la cual el tejido "respondedor" puede reorganizarse. Esta analogía, obviamente, no involucra interacciones célula-célula. La MEC sola tal vez sea capaz de iniciar una respuesta organizacional del epitelio pero, *in vivo*, éste luego va a modular el futuro comportamiento del tejido mesenquimático y así sucesivamente.

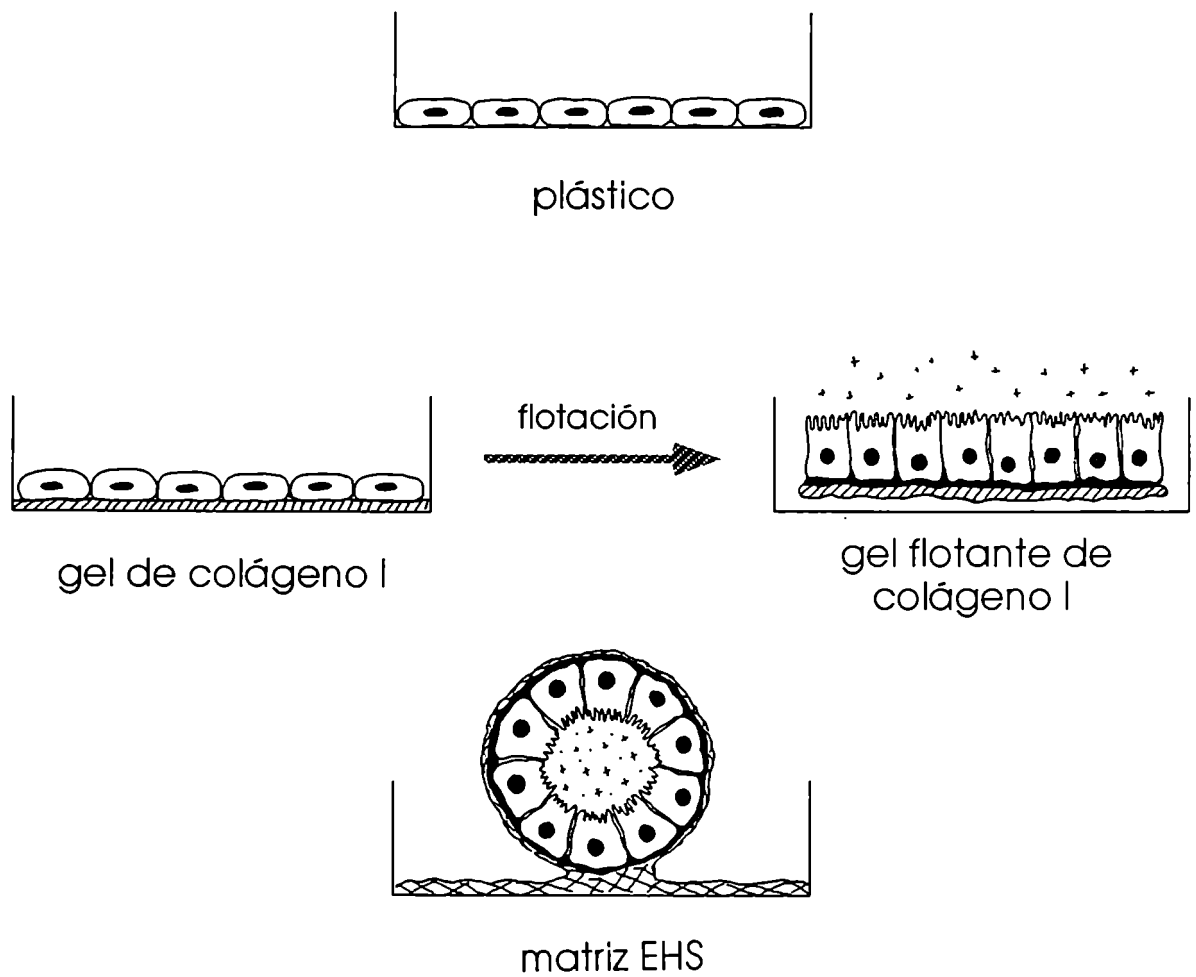


FIGURA 4.

Representación esquemática de los distintos modelos de cultivo

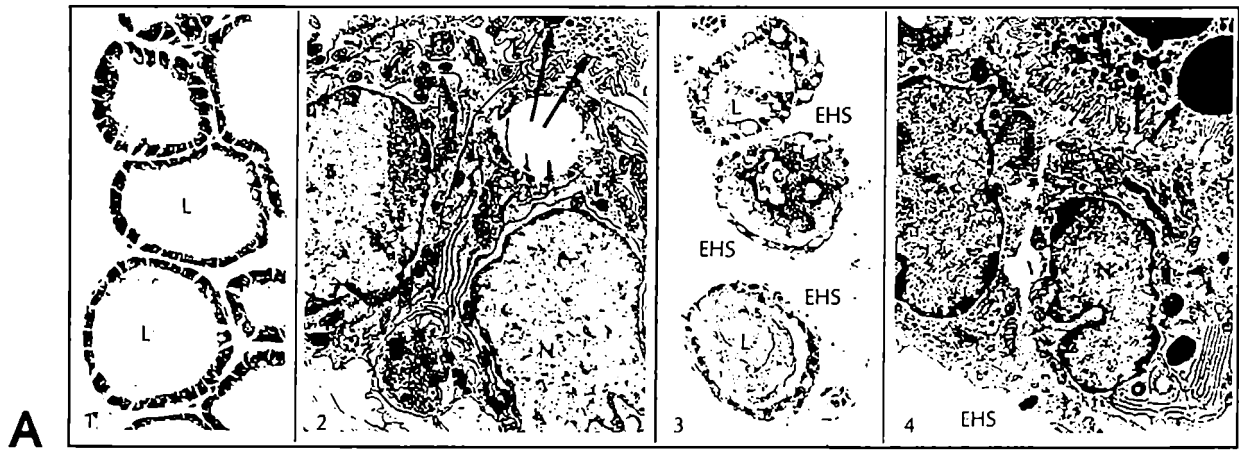


FIGURA 5.

A. Micrografías de transmisión mostrando la organización de alvéolos mamarios *in vivo* (1-2) y en cultivo en presencia de una membrana basal reconstituida o matriz EHS (3-4).

(1-3) Se muestra formación del lumen alveolar (L) tanto en glándula mamaria de ratón hembra lactante (1) como en cultivo de células mamarias murinas (3).

(2-4) (mayor magnificación) Se observa el alto grado de polarización alcanzado por las células epiteliales mamarias tanto *in vivo* (2) como en cultivo (4). Se distingue la localización basal de los núcleos (N) y las micellas conteniendo proteínas de la leche (flechas) secretadas apicalmente. (reproducido de Stoker et al., 1990).

B. Expresión de β -caseína en cultivos primarios de células epiteliales mamarias. Las células fueron cultivadas durante 6 días sobre una matriz EHS en presencia de hormonas lactogénicas y luego teñidas por inmunofluorescencia indirecta con un primer anticuerpo anti β -caseína y un segundo anticuerpo acoplado a rodamina (rojo). Los núcleos celulares fueron teñidos simultáneamente con colorante de DAPI (azul). Se observan estructuras de tipo alveolar formadas por una única capa de células encerrando un lumen hacia donde es secretada la β -caseína. (fotografía: Dr. Charles Streuli, Lawrence Berkeley National Laboratory).

I.2b -Jerarquía de señales dependientes de la matriz extracelular y regulación de la expresión génica tejido-específica

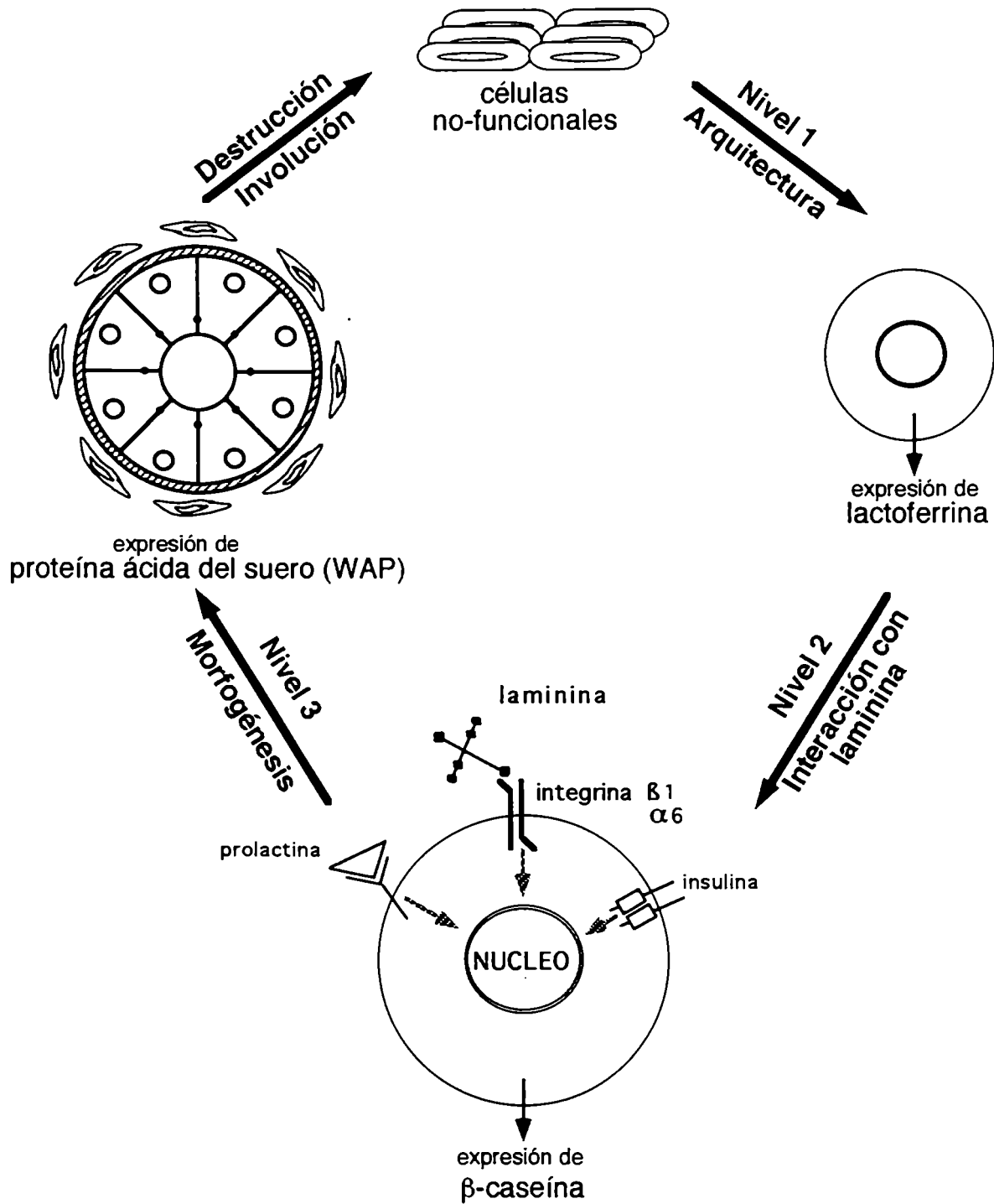


FIGURA 6
modificada de Roskelley et al., 1995.

Tal como se representa en la figura 6, es posible definir una "jerarquía de acción" de la membrana basal sobre las células epiteliales mamarias.

Un primer nivel de acción de la matriz extracelular es aquel puramente relacionado con la "arquitectura celular". En contacto con una matriz extracelular de tipo membrana basal, las células pasan de una morfología plana achatada a una conformación redondeada. Conjuntamente con este cambio morfológico se produce una reorganización del citoesqueleto y cesa la proliferación celular. Esta condición es necesaria y suficiente para la inducción de la expresión de una de las proteínas de la leche: la lactoferrina (Close y Bissell, comunicación personal). Distintas evidencias experimentales permitieron concluir que a este nivel, el efecto de la matriz extracelular es puramente mecánico y no requiere la presencia de ningún componente específico de dicha matriz.

Un segundo nivel en esta jerarquía de señales tiene lugar cuando las células no sólo adoptan una morfología redondeada, sino que además interaccionan con la laminina presente en la matriz extracelular, lo cual desencadena la inducción de la expresión de otra proteína de la leche: la β -caseína. Este nivel requiere la presencia de integrinas $\beta 1$ y $\alpha 6$ funcionales (Muschler, Roskelley y Bissell, comunicación personal) y de prolactina; y es, por otra parte, independiente de interacciones celulares así como también de la polaridad celular, ya que ocurre en células individuales redondeadas y no polarizadas, inmersas en un gel de membrana basal (matriz EHS) (Streuli et al., 1991; Roskelley et al., 1994).

Un tercer nivel de acción es aquel que se induce al plaquear las células sobre un gel de membrana basal, condición que como se mencionó anteriormente promueve un fenómeno morfogenético multicelular. Esta morfogénesis es indispensable para la inducción de la síntesis de una tercera proteína de la leche: WAP, proteína especialmente abundante en leche de roedores (Lin et al., 1995).

Finalmente, esta jerarquía de señales puede ser desmantelada mediante la

destrucción de la membrana basal, por ejemplo a través de la sobreexpresión de SL-1, una metaloproteasa de matriz extracelular. Simultáneamente, se observa la regulación positiva de la proteína ICE (enzima convertidora de interleuquina) lo cual conduce a la muerte celular programada (Boudreau et al. 1995, 1996). Por otra parte, el agregado de tenascina a células epiteliales mamarias diferenciadas en cultivo inhibe la expresión de β -caseína y desencadena la apoptosis (Jones et al. 1995; Boudreau et al 1996).

Todo esto permite reconocer el papel fundamental que tiene el microambiente en la regulación de las funciones tejido-específicas. Actualmente sabemos que las células transducen señales no sólo de hormonas y factores de crecimiento sino también de otras células y de la matriz extracelular. Estas interacciones dinámicas y recíprocas, establecen una jerarquía cuyo resultado final es la generación y perpetuación de un determinado tejido.

I.3 - GENES HOMEOTICOS

Los genes homeóticos constituyen una amplia familia génica y son en su mayoría responsables del establecimiento del plan corporal ya que determinan el destino celular y la formación de patrones durante el desarrollo embrionario.

Las proteínas codificadas por los genes homeóticos presentan localización nuclear y son capaces de interactuar con el ADN mediante un dominio característico y altamente conservado denominado "homeodominio". El homeodominio consta de 61 aminoácidos, codificado por una secuencia de 183 pb conocida como "homeobox" y su estructura terciaria presenta 3 alfa hélices, dos de las cuales se organizan formando un motivo de "helix-turn-helix" similar al observado

en otras proteínas regulatorias ya descritas en procariotas como por ejemplo el represor del fago lambda. De esta manera, los productos de los genes homeóticos funcionan como factores de transcripción regulando la expresión de otros genes "blanco" (McGinnis et al., 1984a-b; Scott y Weiner, 1984).

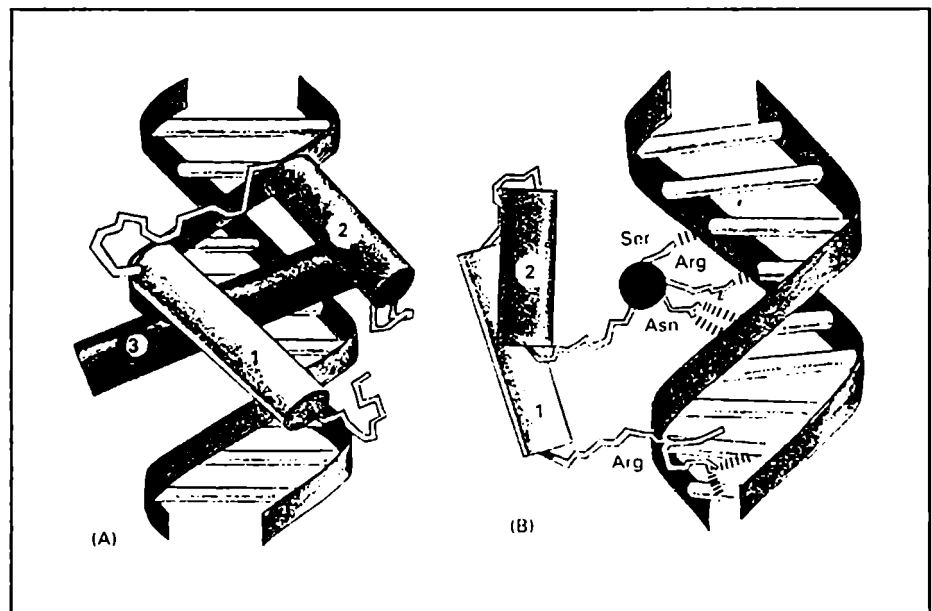


FIGURA 7.

El esquema muestra un homeodominio interactuando con su sitio específico de unión en el ADN.

(A) El homeodominio está plegado en tres alfa hélices que interactúan entre sí mediante uniones hidrofóbicas.

(B) La región conteniendo la hélice 2 y 3 se asemeja a un motivo de tipo "helix-turn-helix", con la hélice de reconocimiento (roja) en contacto con el surco mayor.

(Reproducido de Alberts et al., 1994)

Como muchos factores de transcripción, las proteínas codificadas por los genes homeóticos controlan una gran variedad de decisiones celulares. Lo que los torna muy particulares es su función a nivel multicelular, es decir su habilidad para actuar en forma conjunta transformando una población celular en una serie de patrones únicos. Las mismas proteínas pueden generar patrones completamente diferentes cuando se expresan en diferentes especies o incluso a diferentes tiempos o en diferentes regiones de un mismo organismo. En *Drosophila*, por ejemplo, los genes homeóticos determinan la formación tanto de alas como de antenas. En vertebrados, estos genes diversifican las vértebras a lo largo del eje central del cuerpo y a su vez influyen la formación de dígitos en los miembros (Kenyon, 1994).

Cuando la interacción de las proteínas homeóticas con el ADN es analizada *in vitro*, se observa que dichas proteínas presentan muy poca especificidad en su capacidad de "binding" ya que todas comparten un sitio de unión de secuencia consenso 5'- TNAT(G/T)(G/A)-3'. Esto resulta extraño dado que las mismas tienen acciones tan específicas *in vivo*. O'Farrell y colaboradores utilizaron un oligonucleótido de secuencia 5'- TAATTG -3' como sonda sobre una biblioteca de expresión de ADNc y aislaron genes que codifican para 17 proteínas homeóticas diferentes (Kalionis y O'Farrell, 1993). Por otra parte, diversas secuencias de "binding" para proteínas homeóticas, incluida aquella utilizada en el experimento anterior, fueron usadas para dirigir la expresión del gen reportero lacZ *in vivo*, a partir de un promotor neutro (Vincent et al., 1990). Sorprendentemente, sólo una de las secuencias de "binding" utilizadas dirigió la expresión de lacZ en una pequeña subpoblación celular en embriones de *Drosophila*. Es muy posible que parte de esta especificidad esté dada por la presencia de "cofactores" proteicos, tales como *exd/pbx*, *teashirt* y *DEAF-1*, capaces de modular la acción de las proteínas homeóticas (Peifer y Wieschaus, 1990. Rauskolb et al., 1993. Zeng et al., 1994. Roder et al., 1992.)

Los genes homeóticos y las proteínas por ellos codificadas pueden dividirse en diferentes clases según la homología de secuencias dentro y fuera del homeobox. Una de estas clase, "Antennapedia", es la responsable de lo que Bateson observó más de un siglo atrás (1894) y denominó "transformaciones homeóticas". Dichas transformaciones, identificadas en *Drosophila*, producen anomalías de desarrollo, en las cuales una parte del cuerpo se desarrolla con las características fenotípicas de otra. Los dos ejemplo más conocidos de mutaciones homeóticas son: 1) la mutación en el gen *Antennapedia* (*Antp*) que resulta en la aparición de patas en donde normalmente deben generarse antenas, en la cabeza de *Drosophila* y, 2) la mutación en el gen *Ultrabithorax* (*Ubx*), la cual transforma el tercer segmento torácico en otro segundo segmento torácico, generando una mosca con dos pares de alas (figura 8).

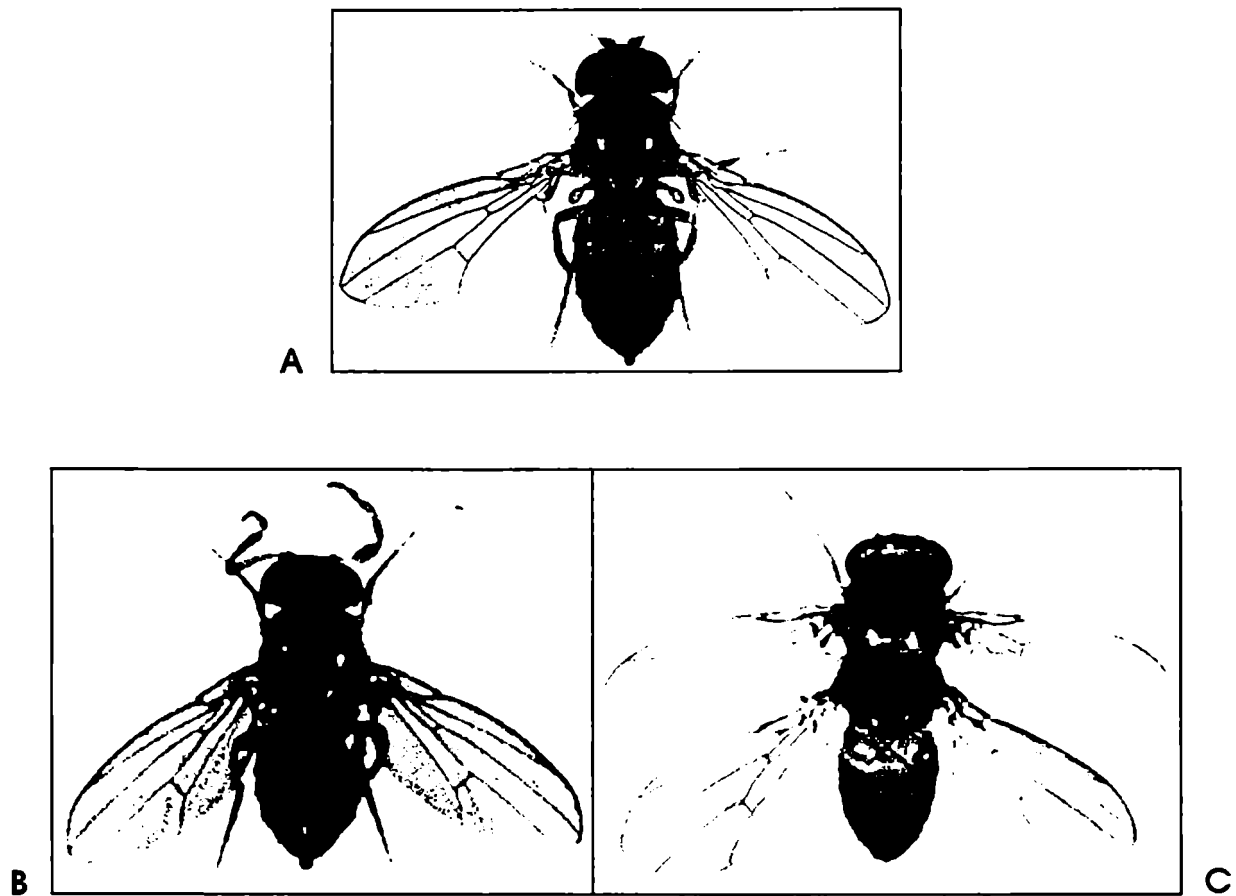


FIGURA 8. Mutaciones homeóticas en *Drosophila melanogaster*.

(A) Vista dorsal de una mosca adulta normal.

(B) Mosca adulta cuyas antenas han sido reemplazadas por patas debido a una mutación en el gen homeótico *Antennapedia* que causa la expresión de dicho gen en la cabeza.

(C) Mosca adulta con cuatro alas, resultado de tres mutaciones simultáneas en la región reguladora del gen homeótico *Ultrabithorax*.

(Reproducido de Alberts et al., 1994; Gilbert, 1994.)

Esta clase "Antennapedia" incluye a todos los genes que codifican homeodominios que comparten un 60% o más de identidad con el homeodominio del gen *Antennapedia* de *Drosophila* y además contienen un pequeño motivo conservado YPWM (Tyr-Pro-Trp-Met) codificado por el exón localizado 5' con respecto al exón que codifica para el homeodominio. En *Drosophila*, los ocho genes pertenecientes a esta clase (*labial*; *proboscipedia*; *Deformed*; *Sex combs reduced*; *Antennapedia*; *Ultrabithorax*; *abdominal A* y *abdominal B*) mapean en los complejos Antennapedia y Bithorax los cuales se denominan colectivamente complejo homeótico HOM u HOM-C. Todos los genes del complejo HOM se encuentran en el mismo cromosoma y la organización de los mismos presenta una característica destacable denominada "colinealidad espacial y temporal". Esto significa que los genes se encuentran organizados en el cromosoma en el mismo orden en que se definen sus dominios de expresión a lo largo del eje anteroposterior del embrión. Genes localizados más 3' se expresan más anteriormente mientras que genes localizados más 5' dentro del cromosoma se expresan más posteriormente. A su vez, genes más 3' tienen expresión más temprana mientras que los localizados más 5' se expresan más tardíamente a lo largo del desarrollo.

Posteriormente a la caracterización de los genes homeóticos en *Drosophila*, se pudo identificar la existencia y expresión de este tipo de genes en una amplia variedad de organismos multicelulares, incluyendo metazoos como esponjas (Degnan et al., 1995); hidra (Schummer et al., 1992; Shenk et al., 1993); nematodos (Kenyon, 1991) y mamíferos entre los que se incluyen ratones y humanos, así como también en hongos y en plantas (Weigel y Meyerowitz, 1994). En el genoma humano y murino, los genes del tipo Antennapedia, conocidos como genes "HOX" ("*Hox*" en ratón y "HOX" en humanos), presentan similitudes sorprendentes con los genes del complejo HOM de *Drosophila*, en cuanto a sus secuencias codificantes, su organización a lo largo del cromosoma y su patrón de expresión. Los 38 genes HOX hasta el momento identificados, se encuentran agrupados en cuatro complejos génicos no-ligados o

"clusters": Hox a (cromosoma 6 del ratón y 7 del humano); Hox b (cromosoma 11 del ratón y 17 del humanos); Hox c (cromosoma 15 del ratón y 12 del humano) y Hox d (cromosoma 2 del ratón y del humano). Dentro de cada "cluster" los genes se numeran consecutivamente a partir del extremo 3'. Los "clusters" son homólogos entre sí y se supone fueron generados mediante procesos de duplicación; presentan similitudes en sus secuencias codificantes (tanto dentro como fuera del homeobox), en el ordenamiento relativo de los genes y en sus espacios intergénicos (Graham et al 1989; Duboule y Dolle 1989). Cuando los "clusters" son alineados unos contra otros, los genes que se encuentran en posiciones equivalentes en diferentes cromosomas forman subfamilias. Dentro de cada subfamilia los genes se describen como "parálogos" (por ej.: todos los genes número 4 son genes parálogos). Los genes *Hox* así como se describió para los genes HOM-C, presentan también "colinealidad espacial y temporal" (Dolle y Duboule, 1989; Dolle et al., 1989; Izpisúa-Belmonte et al., 1991).

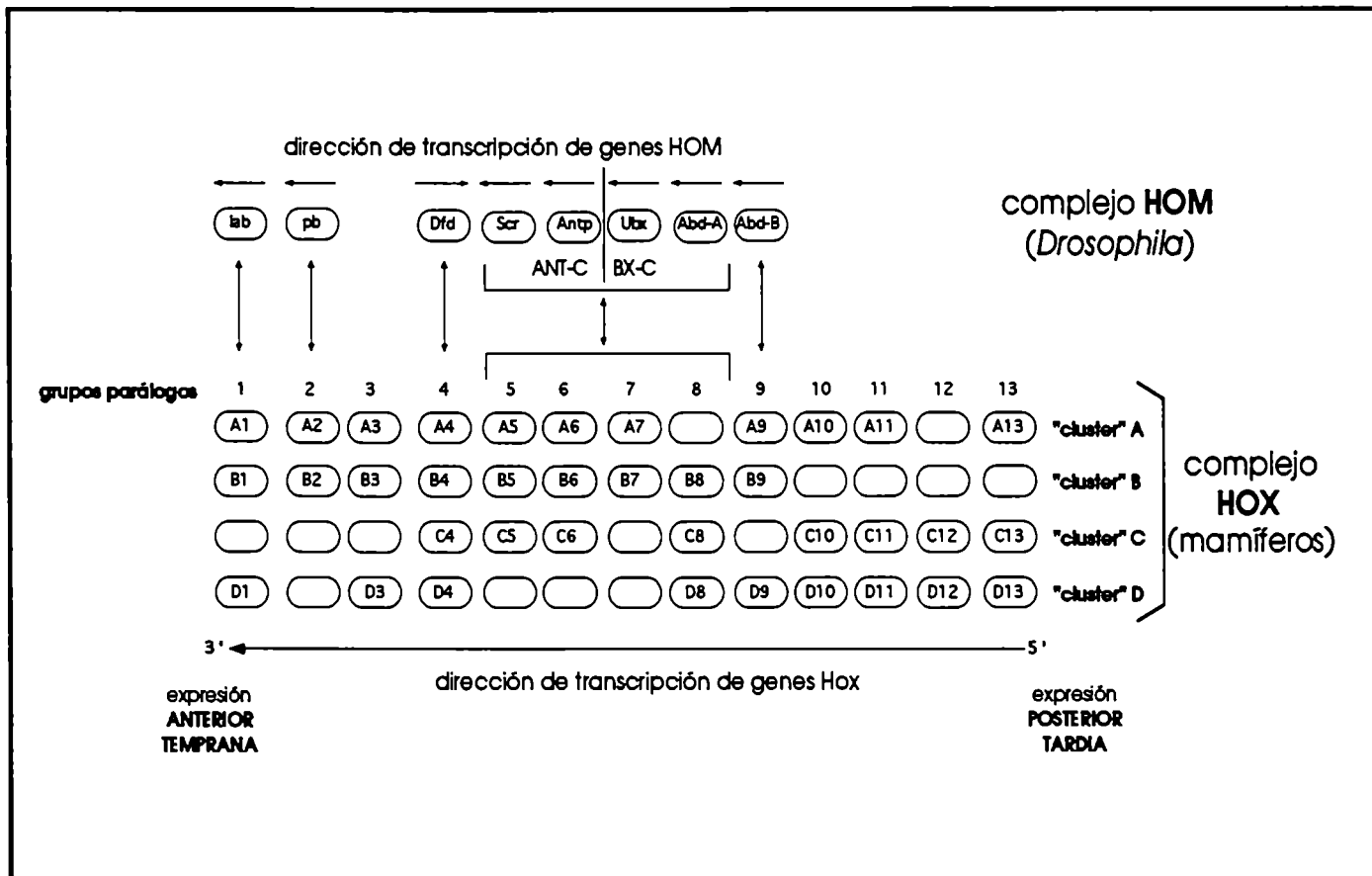


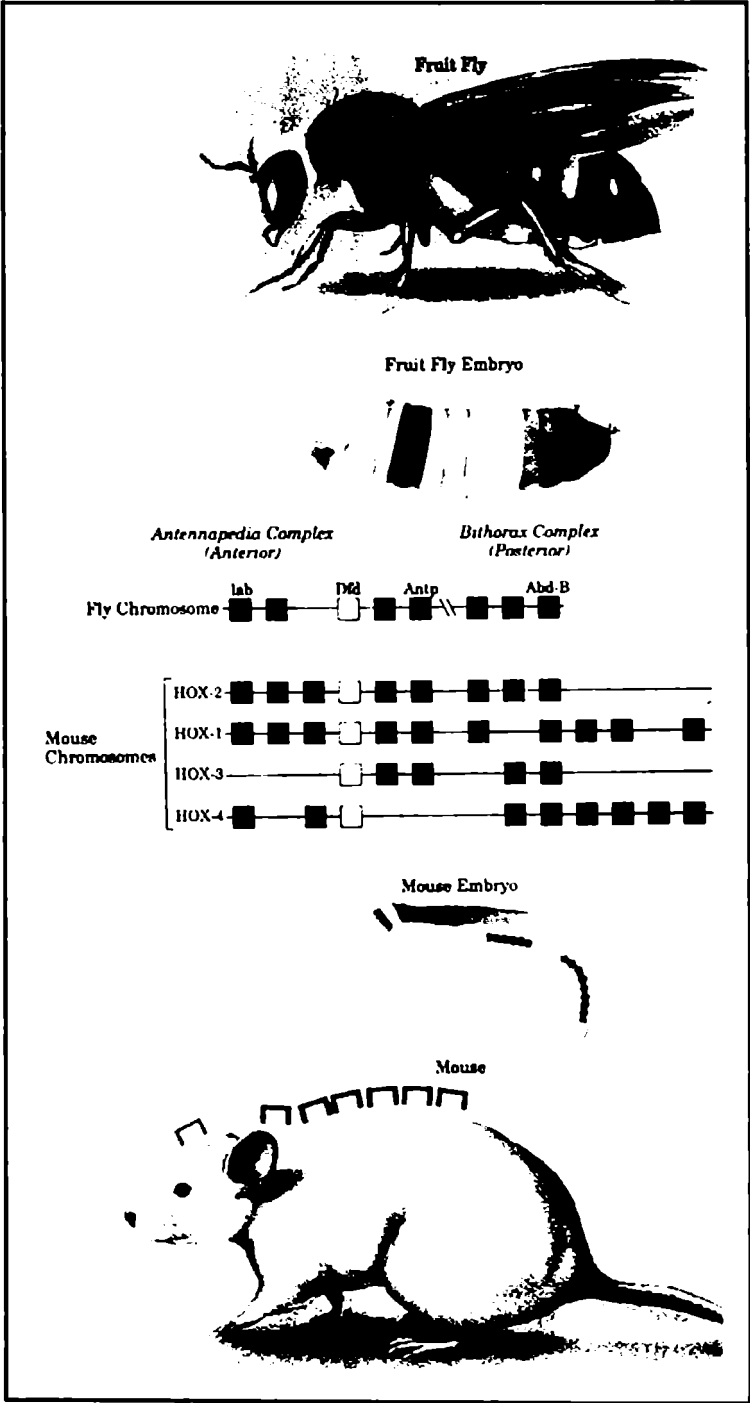
FIGURA 9.

Los cuatro "clusters" del complejo Hox de mamíferos alineados con los complejos Antennapedia y Bithorax (HOM-C) de *Drosophila*.

(A) Cada columna de genes representa genes "parálogos". Los óvalos vacíos indican que el gen correspondiente aún no ha sido descrito en ratón o en humanos. Las flechas en ambos sentidos alinean a los parálogos de mamíferos con su gen homólogo en *Drosophila* según la similitud de secuencias. Existen 4 grupos (5-8) en la región correspondiente a los genes *Scr*, *Antp*, *Ubx* and *Abd-A*, para los cuales no se ha determinado aún una relación más exacta. (Modificado de Scott, 1992)

(B) (página siguiente)

Tanto en *Drosophila* como en mamíferos, los patrones de expresión de los genes a lo largo del eje corporal antero-posterior se correlacionan con su ubicación en el genoma. (Reproducido de: "From Egg to Adult" - Howard Hughes Medical Institute, 1992, pág. 22)



B

I.3a - Genes homeóticos como reguladores del desarrollo en mamíferos

La mayoría de los genes homeóticos de vertebrados fueron clonados mediante la hibridación cruzada con secuencias homeóticas homólogas de *Drosophila* (Carrasco et al., 1984; Scott et al., 1989). En mamíferos, debido a la falta de mutaciones de desarrollo, la información sobre la función de los genes homeóticos fue recabada en muchos casos, a través de experimentos de sobreexpresión o expresión ectópica en animales transgénicos o bien de delección completa (fenotipo "nulo") de un gen, mediante recombinación homóloga en células embrionarias (McGinnis y Krumlauf, 1992).

Por lo general, tanto la sobreexpresión de ciertos genes *Hox* como la pérdida de función de otros resultan en la letalidad embrionaria. En la mayoría de los casos, los embriones presentan defectos de desarrollo severos (Balling et al., 1989; Wolgemuth et al., 1989; Jegalian y De Robertis, 1992). Entre ellos se pueden mencionar defectos del tubo neural, malformaciones craneofaciales y esqueléticas, aparición de un número extra de vértebras y modificación de la morfología de las mismas. Es interesante destacar que alguno de los fenotipos observados en ratones transgénicos o de fenotipos nulos para determinados genes homeóticos son semejantes a ciertas malformaciones congénitas humanas sugiriendo que el estudio de las funciones de los genes *Hox* podría proporcionar explicación sobre los mecanismos moleculares responsables de las mismas. Tal es el caso de los ratones homocigotas para la delección del gen *Hoxa-3* (*Hox1.5*) los cuales mueren al momento del nacimiento o tan sólo sobreviven unas pocas horas. Estos animales neonatos presentan una forma corporal aberrante, son atímicos, aparatiroides y poseen una variedad de defectos cardiovasculares y esqueléticos (Chisaka y Capecchi, 1991). Dichas anomalías son reminiscentes de la enfermedad congénita humana conocida como "Síndrome de DiGeorge".

La aparición de desarreglos morfológicos como resultado de la expresión aberrante de ciertos genes homeóticos en ratón, indicaría que así como ocurre en *Drosophila*, estos genes juegan un papel importante como reguladores del desarrollo embrionario en vertebrados.

La organogénesis en vertebrados depende en gran parte de interacciones recíprocas entre células epiteliales y células mesenquimáticas adyacentes, resultando en la transformación morfológica de uno o ambos tipos celulares. Un gran número de evidencias experimentales indica que los genes homeóticos, tanto los pertenecientes al complejo Hox como otros más divergentes, cumplirían un papel importante durante la organogénesis actuando en muchos casos como reguladores de dichas interacciones tisulares (Sassoon, 1992).

Datos de localización del ARN mensajero del gen *Hoxb-5* (*Hox-2.1*) mediante técnicas de hibridación in situ indican que durante la morfogénesis pulmonar este gen se expresa únicamente en aquellas células mesenquimáticas que rodean a los ductos epiteliales en ramificación (Krumlauf et al., 1987).

Por otra parte, la expresión del gen homeótico *Msx-1* durante el desarrollo de los miembros depende de la interacción entre el ectodermo y el tejido mesenquimático subyacente. Al removerse el ectodermo, el crecimiento del miembro cesa y comienza una diferenciación celular precoz conjuntamente con la pérdida de expresión del gen *Msx-1* (Muneoka y Sassoon, 1992; Robert et al., 1991).

También se han podido identificar ciertos genes homeóticos cuya expresión es indispensable para el desarrollo de un órgano o tejido en particular. La expresión de los genes homeóticos *Pit-1* y *Gsh-1* es necesaria para el desarrollo normal de la hipófisis y del eje hipotálamo-hipofisario. Ratones mutantes para el gen *Pit-1* carecen de diversos tipos celulares de la hipófisis anterior (Camper et al., 1990; Li et al., 1990). Por otra parte, ratones homocigotas para una delección específica del gen *Gsh-1*

presentan una hipófisis anterior de tamaño reducido con una marcada disminución del número de células somatotropas y lactotropas presentes en la misma. Los niveles de las hormonas hipofisarias ("GH" u hormona de crecimiento, prolactina y "LH" u hormona luteinizante) se ven severamente disminuídos y al mismo tiempo se observa la ausencia de expresión de GHRH (hormona liberadora de la hormona de crecimiento) en el hipotálamo de ratones mutantes *Gsh-1* (Hung et al., 1996). La proteína homeótica IPF 1/PDX 1 es necesaria para el desarrollo del páncreas y ratones homocigotas para la delección del gen *pdx 1* carecen de dicho órgano (Jonsson et al., 1994). En estos animales mutantes, el desarrollo del epitelio pancreático se encuentra totalmente inhibido, sin embargo el tejido mesenquimático correspondiente se desarrolla normalmente (Ahlgren et al., 1996).

I.3b - Genes homeóticos durante la vida adulta

Si bien los genes *Hox* han sido activamente examinados durante el desarrollo embrionario, la expresión y función de los mismos en tejidos adultos ha recibido considerablemente menos atención. La mayoría de los tejidos presentan al momento del nacimiento un desarrollo morfogénético avanzado o incluso completo. Sin embargo en algunos como el tracto reproductor femenino y la glándula mamaria, gran parte de la diferenciación morfológica y funcional tiene lugar postnatalmente. Este tipo de tejido, como así también aquellas poblaciones celulares sometidas a intensos procesos de proliferación y diferenciación celular durante toda la vida de un organismo resultan posibles candidatos para la acción de genes homeóticos y han despertado en los últimos años el interés de muchos grupos de investigación .

Sassoon y colaboradores demostraron que durante la embriogénesis, el gen homeótico *Msx-1* se expresa a lo largo de todo el ducto de Müller en ratones hembra.

Sin embargo, postnatalmente, la expresión se restringe al epitelio adulto uterino y es regulada negativamente cada vez que la implantación embrionaria tiene lugar al comienzo de la preñez. Por otra parte, experimentos de recombinación de tejidos epiteliales y mesenquimáticos de diverso origen, han permitido establecer que la expresión de este gen en el epitelio uterino depende absolutamente de la presencia de mesénquima uterino y al mismo tiempo se asocia con la inducción y el mantenimiento de la diferenciación epitelial uterina (Pavlova et al., 1994)

La función de los genes homeóticos durante la vida postnatal ha sido caracterizada en el sistema hematopoyético de mamíferos. Se observa que los patrones de expresión de los genes homeóticos son específicos de linaje y en algunos casos, la desregulación de la expresión puede inhibir la diferenciación normal de un determinado linaje celular (Lawrence et al., 1994; Giampaolo et al., 1994). Han y colaboradores demostraron, por ejemplo, que la inhibición de la expresión del gen homeótico *Hoxb-7*, mediante oligonucleótidos antisentido específicos, inhibe la diferenciación de linajes mieloides pero no la de linajes eritroides ni megacariocíticos a partir de células precursoras provenientes de médula ósea murina (Wu et al., 1992).

James y Kazenwadel (1991) estudiaron la expresión de genes homeóticos en el epitelio intestinal adulto y detectaron que diferentes genes del complejo Hox presentan distintos niveles de expresión a lo largo de las regiones anatómicas del intestino adulto (duodeno, yeyuno, íleon, colon proximal, colon distal). Por otra parte, identificaron dos genes homeóticos no pertenecientes al complejo Hox, denominados *Cdx-1* y *Cdx-2*, cuya expresión es específica de intestino adulto.

I.3c - Genes homeóticos y cancer

Conceptualmente, existe una estrecha relación entre los procesos embrionarios y carcinogénicos, así como también entre los genes que regulan ambos procesos. Tanto el desarrollo normal como el desarrollo tumoral requieren continua proliferación celular, capacidad de migración, capacidad para invadir tejidos aledaños y para adquirir un suministro vascular adecuado.

En general, las células malignas o transformadas se encuentran relativamente indiferenciadas. Se ha podido demostrar que la desregulación de ciertos genes homeóticos puede prevenir o retrasar la diferenciación celular normal, manteniendo a las células en un estado proliferativo, no diferenciado.

Sassoon y colaboradores demostraron, mediante ensayos de transfección transiente, que la sobreexpresión del gen *Msx-1* en la línea celular de mioblastos F3, resulta en un bloqueo de la diferenciación celular, la cual ocurre normalmente en esta línea celular cuando las condiciones de cultivo son modificadas de alto a bajo suero. Las células que expresan altos niveles de *Msx-1* sufren un cambio en la morfología celular y pierden la dependencia de anclaje para la proliferación. Por otra parte, los clones de células con mayor nivel de expresión del gen *Msx-1* producen tumores del tipo fibrosarcoma cuando son inyectados subcutáneamente en ratones atímicos "nude". Todos estos datos sugieren que el gen *Msx-1* podría ser potencialmente oncogénico (Song et al., 1992).

La relación entre genes homeóticos y cancer mejor documentada es la que se observa en el caso de ciertas leucemias. La leucemia linfoblástica aguda de células T o "T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)" se encuentra frecuentemente asociada con translocaciones cromosómicas. Algunas de las translocaciones más frecuentes involucran sitios de ruptura en el cromosoma 10 que tienen lugar en la región regulatoria 5' del gen homeótico humano, *tcl-3*, resultando en la desregulación y

sobreexpresión de dicho gen (Lu et al., 1991; Hatano et al., 1991)

Pbx 1 es un gen homeótico divergente, recientemente caracterizado, localizado en el cromosoma 1. En el caso de leucemia infantil linfoblástica aguda de células pre-B ("pre-B ALL"), translocaciones cromosómicas generan una proteína quimérica que contiene el dominio de transactivación del factor de transcripción E2A fusionado a la región C-terminal de *Pbx 1* (conteniendo la zona de unión al ADN), creándose así un nuevo factor de transcripción capaz de inducir proliferación, apoptosis y linfomas malignos en ratones transgénicos (Dedera et al., 1993).

Por otra parte, se demostró que la sobreexpresión del gen homeótico humano *HOXB 8* inhibe ciertas vías del programa de diferenciación mieloide (Perkins et al., 1990). Células NIH 3T3 transfectadas con un vector de expresión para el gen *HOXB 8* sufren cambios morfológicos y pierden la inhibición por contacto. La inyección subcutánea de estas células transfectadas en ratones atímicos "nude" genera fibrosarcomas y los animales mueren 4 a 6 meses post-inyección, mientras que la inyección de estas células directamente en el hígado genera tumores aún más agresivos que causan la muerte de los animales inyectados en tan solo 6 semanas (Aberdam et al., 1991).

Los patrones de expresión de los 38 genes HOX fueron analizados en ciertos tejidos adultos normales como riñón, mucosa intestinal y pulmón y en sus equivalentes neoplásicos (Cillo, 1994-95). Estos trabajos permitieron concluir que cada tejido u órgano analizado tiene un patrón de expresión característico y que dichos patrones se encuentran alterados en los cánceres correspondientes (Cillo et al., 1992; De Vita et al., 1993).

Blatt y Sachs (1988) estudiaron 59 leucemias mieloides murinas y encontraron que en 55 de ellas existe una deleción en el cromosoma 2 que resulta en la pérdida del gen *Hoxd-3* (*Hox-4.1*) sugiriendo que el mismo podría ser candidato a gen supresor de tumores. Sin embargo aún no se ha podido descartar que sea consecuencia de la

pérdida de otro gen presente también dentro de la región delecionada.

Todos estos datos sugieren que los genes homeóticos no sólo deben ser considerados en el contexto del desarrollo embrionario sino también en organismos adultos, en donde parecerían estar involucrados en el mantenimiento de estadios diferenciados y de funciones proliferativas normales de los tejidos maduros así como también en la regeneración de algunos de ellos. De esta manera, podrían también desempeñar un papel importante en los procesos oncogénicos.

"It is known that nature works constantly with the same materials. She is ingenious to vary only the forms. As if, in fact, she were restricted to the same primitives ideas, one sees her tend always to cause the same elements to reappear, in the same number, in the same circumstances, and with the same connections".

E. Geoffroy Saint-Hilaire (1807)

I.4 - GLANDULA MAMARIA Y GENES HOMEOTICOS

El desarrollo de la glándula mamaria presenta características semejantes al desarrollo de otras estructuras embrionarias, y así como éstas, podría también estar regulada por genes homeóticos.

La regresión de la glándula luego del destete se caracteriza por una muerte celular programada. Dado que los genes homeóticos están involucrados en la determinación de destinos celulares, podrían también tener un papel regulatorio durante el proceso de involución.

Por otro lado, diversos genes homeóticos están involucrados en procesos tumorigénicos y por lo tanto también podrían estar involucrados en el desarrollo de tumores mamarios.

La morfogénesis de la glándula mamaria está determinada por interacciones entre tejido epitelial y mesenquimático. Los factores regulatorios de esta interacción aún no se conocen por completo, pero ya que los genes homeóticos participan en diversos procesos que involucran interacciones tisulares (Izpisua-Belmonte 1992; Davidson 1991; Robert 1991) resultan candidatos atractivos.

La glándula mamaria retiene la plasticidad de transitar por repetidos ciclos de crecimiento, morfogénesis y diferenciación funcional, en el transcurso de cada preñez y lactancia. Por otra parte, las células epiteliales mamarias son capaces de recapitular este evento morfogenético cuando son cultivadas en condiciones apropiadas. Estas observaciones sugieren la existencia de moléculas regulatorias específicas capaces de sensor e integrar la variedad de señales provenientes del microambiente celular (células vecinas, matriz extracelular, factores de crecimiento, hormonas, etc.), y procesarlas coordinadamente de modo de asegurar el mantenimiento del destino de cada célula y la identidad del tejido. Los genes homeóticos podrían ser buenos candidatos para la orquestación de este complejo fenómeno de desarrollo, donde forma y función están dinámicamente interrelacionados.

I.5 - OBJETIVOS

El primer objetivo de esta tesis fue identificar si alguno o algunos de los genes homeóticos "*Hox*", se expresan en células mamarias en cultivo así como también en la glándula mamaria murina. Para ello llevamos a cabo ensayos de "RT-PCR" a partir de ARN mensajero de líneas celulares mamarias funcionales.

A continuación, tratamos de definir los patrones de expresión de los genes cuyos ARN mensajeros fueron detectados mediante los ensayos arriba mencionados, durante los diferentes estadios de desarrollo de la glándula mamaria. Paralelamente, nos propusimos investigar la existencia de posibles interacciones entre estos genes homeóticos y la matriz extracelular que pudiesen estar involucradas en la regulación orquestada del desarrollo morfogénico y la homeostasis de la glándula mamaria. Para ello estudiamos la expresión y regulación de dichos genes en un modelo de cultivo de células mamarias murinas capaces de diferenciarse morfológica y funcionalmente en respuesta a una matriz extracelular exógena y hormonas lactogénicas.

II. Materiales Y Métodos

II.1 - CULTIVO CELULAR

Cepas y líneas celulares utilizadas

- **CID-9:**

subpoblación heterogénea de células mamarias murinas, enriquecida en células epiteliales mediante la tripsinización diferencial y sucesiva de la cepa COMMA-1D (Danielson et al., 1984; Schmidhauser et al., 1990). Estas células depositan y organizan su propia membrana basal cuando son cultivadas sobre un sustrato maleable (geles "flotantes" de colágeno tipo I o matriz EHS-matrigel). Dicha membrana basal endógena, conjuntamente con hormonas lactogénicas (prolactina e hidrocortisona) estimula la diferenciación morfológica y funcional de estas células, proceso que se caracteriza por la formación de estructuras multicelulares tridimensionales semejantes a alvéolos glandulares capaces de producir y secretar proteínas de la leche (β -caseína; α -caseína; lactoferrina; transferrina)

- **SCp2:**

línea epitelial, homogénea, queratina-positiva y vimentina-negativa, aislada de la cepa CID-9 mediante clonado por diluciones sucesivas. A diferencia de la cepa parental, estas células son incapaces de organizar una membrana basal endógena pero sin embargo se diferencian morfológica y funcionalmente en respuesta a una matriz extracelular de tipo membrana basal exógena (rica en laminina) y hormonas lactogénicas (Desprez et al., 1993).

- **TCL-1:**

línea celular proveniente de un adenocarcinoma mamario metastásico originado en un ratón de la cepa CD-1, transgénico para un alelo que codifica para una isoforma auto-activable de la proteasa de matriz extracelular estromalisina 1

("stromelysin 1" -SL1- o "matrix metalloproteinase 3" -MMP3-) (Sympson et al.,1994; Lochter et al., 1997).

Un pequeño trozo de tejido mamario tumoral (0.5 mm X 0.5 mm X 0.5 mm) fue estirpado del ratón portador y colocado bajo la piel de un ratón atímico "nude". Luego de 47 días, cuando el tumor había alcanzado un tamaño de 11 mm X 13 mm X 8 mm, fue estirpado, cortado en pequeños trozos, y cultivado en medio DMEM/F12 conteniendo 10% v/v suero fetal bovino (FBS, BRL), 5 µg/ml insulina y 50 µg/ml gentamicina.

Posteriormente, estos cultivos fueron enriquecidos en células epiteliales mamarias por tripsinización diferencial de la misma manera que se procedió para el aislamiento de la cepa CID-9 a partir de la cepa COMMA1-D (Schmidhauser et al., 1990). Las células fueron mantenidas en el medio arriba descrito y repicadas 10 veces luego de lo cual la concentración de suero en el medio de cultivo fue reducida a 5%.

Mantenimiento de cepas y líneas celulares (condiciones de proliferación)

Todas las células arriba mencionadas fueron crecidas en medio de cultivo DMEM-F12 (mezcla 1:1 de Dulbecco's modified Eagle's medium y Hann's F12 (Gibco/BRL) conteniendo 5% suero fetal bovino inactivado por calor (FBS; Sigma), insulina(5 µg/ml; Sigma) y el antibiótico gentamicina (10 µg/ml; UC San Francisco). Sucesivos repiques fueron realizados cuando las monocapas celulares alcanzaban una subconfluencia aproximada del 80%, mediante la tripsinización con una solución conteniendo 0.05% tripsina pancreática y 0,2 g/l EDTA, en 1X PBS.

Diferenciación de cepas y líneas celulares

Para el desarrollo de todos los experimentos, con excepción de los que así lo

indican, 5×10^4 células/cm² fueron plaqueadas en medio DMEM-F12 suplementado con 2% FBS, insulina, gentamicina y hormonas lactogénicas (3 µg/ml prolactina, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease, Bethesda y 1 µg/ml hidrocortisona, Sigma). Luego de las primeras 24 horas y posteriormente cada 48 horas (dependiendo de la duración de los experimentos) el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco de la misma composición que el utilizado para el plaqueo pero libre de suero.

(El agregado de suero en el momento de plaqueo se debe a que el mismo es necesario para la adhesión de las células epiteliales al plástico de las placas de cultivo).

Sustratos

- **membrana basal reconstituída (matriz EHS o "Matrigel"):**

Este material de matriz extracelular del tipo membrana basal deriva de tumores "Elhem Holm Swarm" (EHS) que se repican y mantienen *"in vivo"* mediante la inoculación sucesiva de ratones. Para los experimentos aquí descritos se utilizaron indistintamente dos preparaciones de membrana basal, una generada en el laboratorio de acuerdo al protocolo descrito por Kleimann y colaboradores (1986) y la otra conocida como "MATRIGEL" (basement membrane matrix), la cual es producida comercialmente por la compañía Collaborative Biomedical Products. Las concentraciones proteicas de las distintas preparaciones usadas fueron de aproximadamente 15 mg/ml.

Este material de matriz extracelular fue utilizado en 2 estados diferentes según el experimento realizado:

- como sustrato en estado de "gel"

1 ml de material de membrana basal, a 4 °C, fue utilizado para cubrir la superficie

de placas de cultivo de 100 mm de diámetro mantenida sobre hielo para garantizar el estado líquido y nativo de la mezcla proteica. Una vez recubiertas, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos para permitir la gelificación de la preparación proteica y luego se les agregó medio de cultivo hasta el momento de siembra de las células para evitar la deshidratación y/o desnaturalización del sustrato.

- disuelto en el medio de cultivo a diferentes concentraciones (1 ó 10% v/v)

En estas condiciones el material proteico forma un precipitado observable al microscopio óptico que se deposita sobre la monocapa celular. Luego de sembradas sobre placas plásticas de cultivo, las células fueron incubadas por 24 horas para lograr la adhesión y "spreading" celular luego de lo cual, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco con el complemento hormonal deseado, carente de suero y con 1 ó 10% v/v de preparación de membrana basal (dependiendo de cada experimento). La concentración de matiz EHS/Matrigel fue mantenida en los sucesivos cambios del medio de cultivo.

- poliHEMA [poli(2-hidroxietil metacrilato)]

En los experimentos en los que se evaluó el efecto del cambio de morfología celular independientemente del agregado de matriz extracelular exógena, la superficie de las placas de cultivos fue cubierta con una solución de 10 mg/ml de poly(2-hidroxietil metacrilato) ("poliHEMA") en 95% etanol. Al evaporarse el etanol, este polímero inerte de carga neutra forma una fina película rígida, ópticamente invisible que se une fuertemente a las placas y reduce la carga electrostática negativa de las mismas, convirtiéndolas en "anti-adhesivas". Cada placa de cultivo de 100 mm de diámetro fue incubada con 5 ml de solución en estufa seca a 37 °C durante al menos 48 hs para garantizar la completa evaporación del etanol. Previamente a su

utilización para cultivos celulares, las placas fueron lavadas repetidas veces con medio de cultivo DMEM-F12.

Las células plaqueadas sobre placas pre-tratadas con 10 mg/ml de poliHEMA permanecen en suspensión y por lo tanto para los sucesivos cambios de medio de cultivo, las mismas deben ser transferidas a un tubo estéril, centrifugadas en centrífuga clínica (800 - 1000 rpm), resuspendidas en medio fresco y transferidas nuevamente a la placa original.

Ensayo de proliferación celular (incorporación de bromo deoxi-uridina)

La síntesis de ADN, como índice de proliferación celular, fue medida mediante ensayos de incorporación del análogo de timidina, bromo deoxi-uridina (BrdU), al ADN celular.

Las células fueron sembradas sobre placas plásticas de cultivo, en medio DMEM-F12, 2% FCS y hormonas lactogénicas en las concentraciones ya indicadas, y mantenidas en estas condiciones por 24 horas.

Posteriormente, el medio de cultivo fue cambiado por medio DMEM-F12 fresco, carente de suero, con prolactina e hidrocortisona en las concentraciones indicadas anteriormente pero conteniendo distintas concentraciones de insulina: 0 - 0,25 - 1,25 - 5 μ g/ml. Luego de 12 horas de incubación en estas condiciones, se agregó al medio de cultivo BrdU en una concentración final de 10 μ M y se continuó el cultivo por otras 12 horas adicionales.

Luego de la incubación con BrdU durante 12 horas se procedió a la detección del nucleótido modificado utilizando el kit de la compañía Boehringer Mannheim (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I), mediante el protocolo que se detalla a continuación:

Detección de BrdU incorporada:

- 1) Las células fueron lavadas repetidas veces con 1X PBS y fijadas con una solución de 70% etanol en 50 mM glicina pH 2,0, a -20 °C por 30 minutos.
- 2) Se lavaron nuevamente con 1X PBS repetidas veces (10-15 minutos cada vez)
- 3) Se bloquearon con una solución de 0,1% P/v BSA, 10% V/v suero en 1X PBS, a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 4) Se lavaron con 1X PBS repetidas veces
- 5) Las células fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos con anticuerpo de ratón anti-BrdU diluído 1:10 en BUFFER DE INCUBACIÓN (66 mM Tris HCl; 0,66 mM MgCl₂; 1 mM 2-mercaptoetanol)
- 6) Se lavaron con 1X PBS repetidas veces
- 7) Las células fueron incubadas a 37 °C por 30 minutos con un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, unido a fluoresceína, diluído 1:10 en 1X PBS. A partir de este paso , las muestras fueron mantenidas en oscuridad.
- 8) Se lavaron con 1X PBS repetidas veces
- 9) Los núcleos celulares fueron teñidos con el colorante de DAPI diluído 1:10000 en 1X PBS durante 3 minutos a temperatura ambiente
- 10) Se realizaron varios lavados con 1X PBS y se montaron los preparados con "mounting medium".
- 11) Los preparados fueron observados bajo microscopio de fluorescencia.

Se examinaron diversos campos visuales y se calcularon los índices de proliferación mediante el recuento de células totales en cada campo (núcleos teñidos con colorante de DAPI), versus el número de células positivas para la incorporación de BrdU (núcleos marcados con fluoresceína).

II.2 - PREPARACION DE ARN

Preparación de ARN total de células en cultivo

Para la purificación de ARN de células en cultivo se utilizó el método de "fenol ácido" descrito por Chomczynski y Sacchi (1987) con algunas modificaciones, tal como se indica a continuación:

- 1) Las células fueron lavadas con medio libre de suero.
- 2) El medio fue removido y se agregó 3 ml de solución A (*) (por placa de 100 mm de diámetro).
- 3) Las células fueron colectadas en una jeringa pasándolas al menos 5 veces a través de una aguja de calibre 22 y luego transferidas a un tubo de centrifuga (Falcon) de 15 ml.
- 4) Se agregó 0,3 ml de 2M NaOAc pH 4; vortex.
- 5) Se agregó 3 ml de fenol saturado en agua pH 4 - 4,5; vortex.
- 6) Se agregó 0,6 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1); vortex.
- 7) Se incubó en hielo durante 15 - 30 minutos.
- 8) Se centrifugaron las muestras en frío a 6000 rpm, durante 20 - 30 minutos.
- 9) La fase acuosa fue transferida a un tubo de centrifuga de 15 ml limpio, combinada con un volumen de isopropanol y agitada vigorosamente (vortex).
- 10) Se mantuvieron las muestras a -20 °C al menos por 2 horas.
- 11) Se centrifugaron a 4 °C, a 6000 rpm, durante 20 - 30 minutos y el sobrenadante fue descartado rápidamente (el precipitado es muy inestable).
- 12) Se agregó 0,5 ml de solución A: isopropanol (1:1) al precipitado obtenido en el paso anterior, y sin necesidad de redissolver el precipitado, éste fue transferido a tubo de microcentrifuga y mantenido a - 20 °C durante 2 horas.
- 13) Se centrifugaron las muestras en frío, a 12000 rpm, durante 15 minutos.
- 14) Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con etanol 75%, luego de

lo cual se dejó secar al aire.

15) El precipitado del paso anterior fue combinado con 0,5 ml de 0,5% P/v SDS/H₂O y congelado a - 20 °C.

16) Las muestras fueron incubadas a 60 °C durante 10 minutos y agitadas vigorosamente (vortex).

17) Se midió la absorbancia 260/280 de una dilución 1/100 de cada muestra. Las mediciones fueron realizadas por triplicado y se calculó la concentración promedio.

18) Cuando fue necesario, la cantidad deseada de muestra fue precipitada agregando 0,1 vol. de 2M NaOAc y 2,5 vol. de etanol 100%.

(*) solución A: 4 M GuSCN; 25 mM citrato de sodio pH 7; 0,5% P/v sarkosil + 7µl/ml de β-mercaptoetanol.

La integridad del material obtenido fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa.

Preparación de ARN total de glándula mamaria

Para la purificación de ARN de tejido mamario se utilizó el reactivo Trizol ("Total RNA Isolation Reagent" - Gibco/BRL) y el protocolo sugerido para el mismo. Dicho protocolo se basa también en el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Las glándulas fueron extirpadas, fragmentadas e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido hasta el momento de la preparación.

Purificación de ARN poli(A)⁺

1) Se resuspendieron 100 mg de Oligo(dT) celulosa (Boehringer Mannheim) en 1-2 ml de 1X BUFFER DE SIEMBRA (10 mM TRIS HCl pH 7,6; 0,25 M NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,05% P/v SDS).

- 2) Se montó una columna descartable de plástico de 10 ml de capacidad (Bio Rad) y ésta fue rellena con la resina preparada en el punto 1.
- 3) La columna fue lavada con:
 - a) 5 ml de H₂O previamente tratada con DEPC (dietilpirocarbonato)
 - b) 5 ml de: 0,1 M NaOH/ 5 mM EDTA
 - c) H₂O tratada con DEPC. Este lavado fue repetido hasta tanto el pH del percolado resultó menor que 8.
- 4) La columna fue lavada con 10 ml de buffer de siembra 1X.
- 5) El ARN a sembrar fue precipitado y disuelto en H₂O tratada con DEPC, a una concentración final aproximada de 1 mg/ml.
- 6) La muestra de ARN fue combinada con 1 volumen de buffer de siembra 2X e incubada a 65 °C durante 5 minutos.
- 7) Se dejó enfriar la muestra hasta temperatura ambiente y se sembró sobre la columna.
- 8) Se recolectó el percolado en un tubo esteril, y se repitieron con este material los pasos 6 y 7.
- 9) Se repitió el paso 8 una vez más.
- 10) La columna fue lavada con 20 ml de buffer de siembra 1X.
- 11) El ARN poli(A)⁺ fue eluido con 2 aplicaciones de 1 ml de H₂O tratada con DEPC, colectándose cada ml en un tubo esteril.
- 12) Se midió absorbancia a 260/280 nm de las fracciones colectadas, utilizándose una cubeta previamente tratada con 20% SDS y lavada con H₂O libre de RNAsas, de modo tal de poder recuperar el material utilizado en la medición. Se calculó la concentración del material obtenido.
- 13) Se precipitó el ARNm en alícuotas de 5 µg cada una, a -20 °C, mediante el agregado de 1/10 vol de NH₄OAc y 3 vol de EtOH 100%.

II.3 - SINTESIS DE ADN copia (ADNc)

Se realizó a partir de 5 µg de ARN poly(A)⁺ mediante la utilización del kit de la compañía Amersham "cDNA Synthesis System Plus" y de acuerdo al protocolo que se detalla a continuación:

1) En un tubo de microcentrifuga se mezcló:

buffer de síntesis de 1ª cadena (5X)	10 µl
solución de pirofosfato de sodio	5 µl
inhibidor de ribonucleasas	5 µl
dNTPs	5 µl
oligo dT	5 µl
ARNm	X µl
H ₂ O	Y µl
transcriptasa reversa	100 U
volumen final de reacción	50 µl

2) Se incubó a 42 °C durante por lo menos 40 minutos.

3) Se colocó el tubo de reacción en hielo.

4) Los 50 µl de la reacción anterior fueron combinados con:

buffer de reacción de 2ª cadena	93.5 µl
[α-32P]dCTP (opcional)	A µl
ribonucleasa H de <u>E. coli</u>	4 U
DNA polimerasa I de <u>E. coli</u>	115 U
H ₂ O	B µl
volumen final de reacción	250 µl

5) Se mezcló e incubó a 12 °C durante 60 minutos.

6) Se incubó a 22 °C durante 60 minutos.

7) Se incubó a 70 °C durante 10 minutos.

- 8) La reacción fue colocada en hielo y se agregaron 10 U de ADN polimerasa de T4.
- 9) Luego de mezclar se incubó a 37 °C durante 10 minutos.
- 10) La reacción fue frenada mediante el agregado de 10 µl de EDTA 0,25M pH 8,0.
- 11) El ADNc fue purificado mediante extracciones de fenol/cloroformo y precipitado con NH₄OAc 4M y EtOH 100%.

II.4 - REACCIONES EN CADENA DE POLIMERASA (PCR) CON OLIGONUCLEOTIDOS DEGENERADOS

Las reacciones de PCR con primers degenerados fueron realizadas inicialmente variando diversos parámetros tales como: concentración final de MgCl₂ (1-1,2-1,4-1,6-1,8-2-3 mM), concentración final de primers (1-1,8 µM de cada uno), temperatura de hibridación (37 °C-40 °C-42 °C), número de ciclos (30-35-40-2 X 35), hasta encontrarse las condiciones óptimas que se detallan a continuación:

- Se desnaturalizó 1/10 del producto de la reacción de síntesis de ADNc (ver II.3) por calentamiento durante 10 minutos
- Se combinó con:
 - 1µM final de cada oligonucleótido degenerado
 - 1/10 de volumen de reacción de 10X PCR buffer II (Perkin-Elmer)
 - 2 mM final de MgCl₂
 - 200 µM final de cada dNTP
 - 2,5 unidades de enzima "Taq DNA polymerase" (Perkin-Elmer)
- Se repitió el siguiente ciclo de temperaturas durante 35 veces:
 - 95 °C, 1 minuto
 - 40 °C, 1 minuto
 - 70 °C, 30 segundos

- al finalizar los 35 ciclos, se incubó 10 minutos a 70 °C.
- las muestras fueron mantenidas a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Los oligonucleotidos utilizados fueron:

"ELEKEF" ("E"): 5'-CGCGGATCCGARYTNGARAARGARTT-3' ó

5'-GGAATTCCGARCTNGARAARGARTT-3';

"KIWFQN" ("K"): 5'-CCCAAGCTTIR-TTYTGRAACCADATYTT-3';

"WFQNR" ("W"): 5'-CGGGATCCCGNCGRTTYTGRAACCA-3'.

(R=G/A; Y= C/T; D=G/A/T ; N= A/C/G/T)

Las regiones subrayadas corresponden a sitios para enzimas de restricción introducidos en la secuencia para facilitar el clonado de los fragmentos amplificados.

II.5 - PURIFICACION, CLONADO Y SECUENCIACION DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (1,5-2% P/v agarosa, 0,04% P/v bromuro de etidio, en buffer TAE 1X). Las bandas correspondientes a fragmentos de ADN de la longitud esperada fueron escindidas del gel y el ADN presente en el taco de agarosa fue purificado mediante el uso del kit QIAEX (QIAGEN).

El vector de clonado (pBluescript KSII- Stratagene) y los fragmentos de ADN producidos mediante reacciones de PCR ("inserto") fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes de acuerdo con los pares de oligonucleótidos utilizados. Luego de la restricción, el vector fue incubado con la enzima fosfatasa alcalina de intestino (CIP-NEBiolabs). El vector linealizado y "fosfataseado", junto con el inserto previamente digerido fueron ligados y posteriormente utilizados para transformar bacterias E. coli competentes (cepas:

DH5 α - GibcoBRL- y XL1-blue- Stratagene-). El vector y las cepas bacterianas utilizadas permitieron la identificación de colonias transformantes negativas (sin inserto) y positivas o recombinantes (con inserto) mediante la reacción cromogénica en presencia del sustrato X-gal, catalizada por la enzima β -galactosidasa codificada por el vector. Colonias recombinantes elegidas al azar fueron crecidas en cultivo líquido y a continuación se procedió a la purificación del ADN plasmídico de las mismas. Todos los protocolos de clonado, transformación y preparación de ADN plasmídico se realizaron según se indica en Maniatis y colaboradores (1989).

Aproximadamente 2 μ g de ADN plasmídico de cada preparación (1/5 de la minipreparación de ADN) fue secuenciado mediante el método de Sanger utilizando el kit "Sequenase version II" de la compañía USB (United States Biochemical), según el siguiente protocolo:

1) desnaturalización del ADN plasmídico

- En un tubo de microcentrífuga se mezclaron:
 - 20 μ l de minipreparación de ADN plasmídico (aprox. 2 μ g)
 - 2 μ l de 2 mM EDTA
 - 2 μ l de 2 M NaOH
- Se incubó la mezcla de reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó 10 μ l de 0,9 M NaOAc pH 4 + 75 μ l EtOH 100%.
- Se incubó 10 minutos en hielo seco o a -70 °C.
- Se centrifugó a 14000 rpm, a 4 °C, durante 20 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con EtOH 70%.
- Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm, 4 °C, durante 10 minutos.
- Se secó el precipitado bajo vacío y se resuspendió en 7 μ l de H₂O.

2) Apareamiento de primers

- El ADN resuspendido en 7 μ l de H₂O obtenidos en el paso anterior fue combinado con:

2 μ l de buffer de reacción 5X (200 mM Tris HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 250 mM NaCl)

1 μ l de primer (0.5 pmol)

- Se incubó 20-30 minutos a 37 °C.

3) Marcado

- A la mezcla del paso anterior se le agregó:

1 μ l DTT

1 μ l (α ³⁵S)dATP 1000-1500 Ci/ minol (opcional: utilizar diluído 1:2 en H₂O)

2 μ l mezcla de marcado, diluída 1:5 en H₂O (5X "Labeling mix": 7,5 μ M dGTP; 7,5 μ M dCTP; 7,5 μ M dTTP)

2 μ l Sequenase (1:8 en buffer de dilución de enzima: 10 mM Tris HCl pH 7,5; 5 mM DTT; 0,5 mg/ml BSA)

- Se incubó 3 a 5 minutos (no más) a 37 °C.
- Durante este período de incubación se colocaron en 4 tubos diferentes 2,5 μ l de cada ddNTP "mezcla de terminación" (80 μ M de cada dNTP, 80 μ M de un ddNTP, 50 mM NaCl)

4) Terminación

- Se alicuotaron 3,5 μ l de la reacción de marcado en cada tubo conteniendo un ddNTP respectivamente.
- Se incubaron las reacciones durante 5 minutos a 37 °C.
- 4 μ l de solución "stop" (95% formamida; 20 mM EDTA; 0,05% azul de bromofenol; 0,05% xylene cyanol FF) fueron agregados en cada tubo.

5) Las muestras fueron calentadas durante 5 minutos a 95 °C, justo antes de sembrarlas en el gel.

6) Las reacciones fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (6% (P/v) acrilamida- 8M Urea - 1X TBE).

La comparación y análisis de secuencias fueron realizadas mediante la utilización de diversos programas del software del Genetics Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin- USA.

II.6 - CLONADO DE FRAGMENTOS DE ADNc DEL GEN *Hoxb-7* POR PCR

Mediante reacciones de PCR se amplificaron y clonaron 2 regiones del gen *Hoxb-7* a partir de ADN genómico de ratón. La estructura del gen (según descrito por Meijlink et al., 1987; Verrijzer et al., 1988), ubicación de los oligonucleótidos utilizados como "primers" y productos de las reacciones de amplificación respectivas se muestran en la figura 10. Ninguna de las regiones amplificadas contiene la secuencia correspondiente al homeobox, para evitar posibles hibridaciones cruzadas con otros miembros del complejo Hox.

Las condiciones de PCR utilizadas en cada caso fueron:

a) Amplificación del fragmento de la región 3':

- 1 μ g de ADN genómico de ratón
- 1 μ M final de cada oligonucleótido
- 1/10 de volumen de reacción de 10X PCR buffer II (Perkin-Elmer)
- 2 mM final de $MgCl_2$
- 200 μ M final de cada dNTP
- 2.5 unidades de Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer)

Se realizaron 35 ciclos, cada uno de ellos con el siguiente perfil: 95 °C, 1 minuto; 60 °C, 1 minuto; 72 °C, 40 segundos.

El fragmento del tamaño esperado (549 pb) producto de esta reacción fue purificado mediante corrida electroforética en geles de agarosa y utilización el kit QIAEX de

QIAGEN para la elución del ADN del fragmento de agarosa. Luego se procedió al clonado del fragmento de ADN en el vector pCR-SCRIPT SK(+) mediante el kit "pCR-Script SK(+) Cloning Kit" de Stratagene (figura 11). Este sistema de clonado se basa en una reacción de ligada de extremos romos que se realiza en presencia de la enzima de restricción (Srf I) utilizada para linealizar el vector, la cual tiene un sitio de corte "raro" de 8 nucleótidos, que no debe encontrarse presente en el fragmento a clonar.

b) Amplificación del fragmento de la región 5':

- 500 ng de ADN genómico de ratón
- 0,6 μ M final de cada oligonucleótido
- 1/10 vol de reaccion de 10X BUFFER #9 (10 mM Tris HCl ph 9,2; 1,5 mM MgCl₂; 25 mM KCl)
- 1/50 vol de reaccion de "MASTER MIX" (20 mM Tris HCl pH 8.0; 250 nM EDTA)
- 200 μ M final de cada dNTP
- 2,5 unidades de Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer)

Se realizaron 35 ciclos, cada uno de ellos con el siguiente perfil: 94 °C, 1 minuto; 50 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto 30 segundos.

El producto de reacción (fragmento de ADNc de 639 pb) purificado de la misma manera que se indicó en el caso anterior fue clonado en una versión modificada del vector comercial pBK-RSV (Stratagene), tal como se muestra en la figura 12.

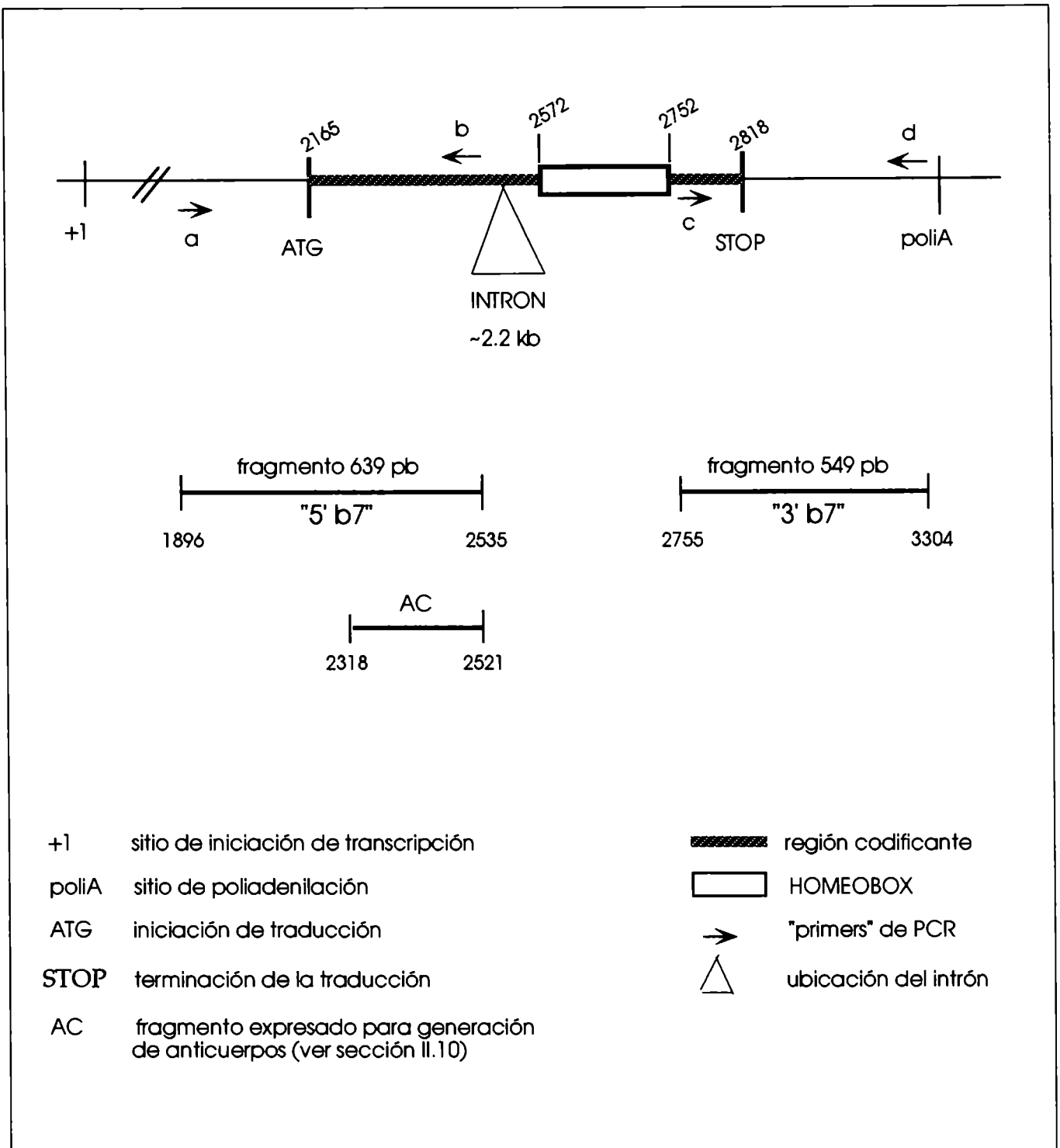


FIGURA 10.

Representación esquemática del gen homeótico murino *Hoxb-7*

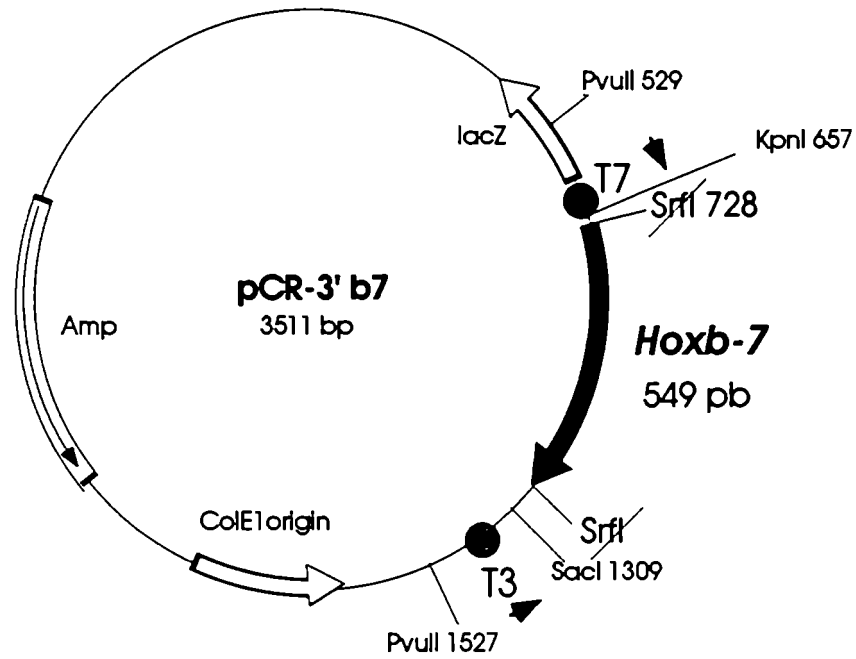


FIGURA 11. Mapa simplificado del plásmido "pCR-3' b7"

Un fragmento de 549 pb de la región 3' del gen *Hoxb-7*, amplificado por "PCR", fue clonado en el vector pCR-SCRIPT SK(+) tal como se observa en el esquema. Los sitios de restricción que se muestran tachados fueron anulados como consecuencia del proceso de clonado.

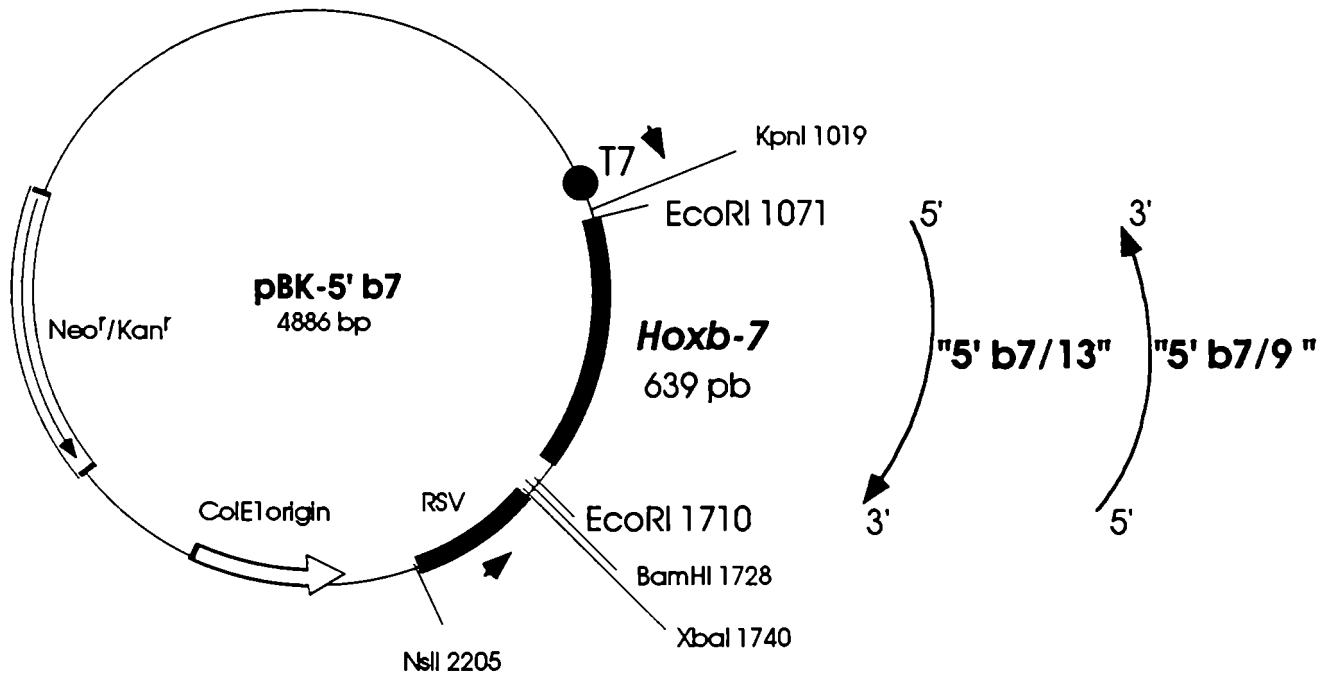


FIGURA 12. Mapa simplificado del plásmido "pBK-5' b7"

Un fragmento de 639 pb de la región 5' del gen *Hoxb-7*, amplificado por "PCR", fue clonado en el vector pBK- RSV en las dos posibles orientaciones, tal como se observa en el esquema.

II.7 - ENSAYOS DE NORTHERN BLOT

Alícuotas de 25 µg de ARN total, precipitadas y re-disueltas en buffer de siembra (75 µl H₂O; 100 µl MOPS 10X; 175 µl formaldehído; 500 µl formamida deionizada) fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes (1% agarosa; 2,3 M formaldehído; en buffer MOPS 1X) a 25-35 volts durante toda la noche. Luego de observados con luz ultravioleta y fotografiados, los geles fueron transferidos por capilaridad a membranas de nylon (Hybond-N, Amersham o Magna NT, Micro Separations Inc.) según se indica en Maniatis y colaboradores (1989).

Las hibridaciones fueron realizadas de acuerdo a dos protocolos distintos según la especie de ARN a detectarse. Para especies abundantes como 28S y β-caseína se utilizó por lo general, un protocolo rápido descrito por Church y Gilbert (1984) en el cual las soluciones tanto de pre-hibridización como de hibridación consisten en 7% (P/v) SDS; 1% (P/v) BSA; 0,5 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,2; 1 mM EDTA. Pre-hibridación; hibridación y lavados se realizan a 65 °C.

Para la detección de especies de ARN mensajeros poco abundantes, como *Hoxa-1* y *Hoxb-7* la hibridaciones fueron llevadas a cabo en: 50% (v/v) formamida; 5X solución de Denharts; 4X SSPE; 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 6,5; 1% (P/v) SDS y 10% (P/v) sulfato de dextrano, a 45 °C. Los lavados fueron realizaron hasta 0,1X SSPE; 0,1X SDS a 65 °C.

Las sondas utilizadas fueron marcadas con (α-P³²)-dCTP mediante reacciones de "extensión de oligonucleotidos de secuencias al azar" (random priming) utilizando indistintamente los kits "Multiprime DNA labelling system" y "REDIPRIME" de la compañía Amersham . Las marcaciones fueron realizadas preferentemente durante toda la noche a temperatura ambiente y los fragmentos marcados fueron purificados mediante columnas de Sephadex G-50. La

radioactividad incorporada fue medida en contador de centelleo líquido.

En las reacciones de hibridación se utilizaron $1-3 \times 10^6$ cpm/ml de solución de hibridación.

Sondas utilizadas:

ARNm a detectar	sonda utilizada	método de obtención
<i>Hoxa-1</i>	fragmento de ADN 750 pb - region 3' no codificante - sin cola de poli(A) ⁺ . especie: ratón	Dr. Christian Wright (Vanderbilt School of Medicine- U.S.A) Larosa y Gudas (1988)
<i>Hoxb-7</i>	fragmento de ADN 450 pb- region 3' codificante (pb) + 3' no codificante (pb) especie: ratón	inserto del plásmido "pCR-3' b7".
β -caseína	fragmento de ADNc 540 pb- especie: ratón	Dr. J.M. Rosen (Baylor College, Houston, TX, U.S.A.)
28S rRNA	fragmento genómico de ADN ribosomal 5,8S + 28S especie: humano	incierto

II.8 - HIBRIDACION "IN SITU"

Producción de sondas marcadas por métodos no radioactivos

Los plásmido "pBK- 5' b7/9" y "pBK- 5' b7/13" (ver figura 12) conteniendo un fragmento de 639 pb de ADN del gen *Hoxb-7* en orientación antisentido y sentido respectivamente (respecto del promotor de la ARN polimerasa T7) fueron linealizados con la enzima de restricción BamHI y purificados por extracciones con fenol y fenol-cloroformo. Posteriormente fueron utilizados como molde para reacciones de transcripción *in vitro* para la producción de ribosondas "sense" (secuencia idéntica al ARNm correspondiente) y ribosondas "antisense" (secuencia complementaria al ARNm correspondiente), mediante la polimerasa del bacteriófago T7.

La transcripción *in vitro* fue llevada a cabo mediante la utilización del kit "DIG RNA labeling kit" de la compañía Boehringer Mannheim, según el siguiente protocolo:

- Mezcla de reacción:

buffer de transcripción 10X	2 μ l
mezcla de NTPs (ATP; CTP; GTP, 10 mM c/ u; UTP, 6,5mM; DIG-UTP, 3,5 mM)	2 μ l
ADN linealizado	1 μ g
Inhibidor de RNasas	1 μ l
Enzima ARN polimerasa T7	2 μ l
H ₂ O tratada con DEPC	hasta 20 μ l vol. final

- Se incubó durante 2 horas a 37°C
- finalizada la reacción de transcripción, se degradó el ADN plásmidico "molde" mediante la incubación con enzima DNAsa I (20 unidades) durante 15 minutos a 37 °C.

- El ARN producto de la reacción fue precipitado con 1/10 volúmenes de LiCl 4M y 2,5 volúmenes de etanol 100%. El precipitado fue lavado con etanol 75% y resuspendido en 100 µl de buffer TE.
- La presencia mayoritaria de ARN del tamaño deseado fue corroborada mediante la corrida electroforética de un pequeño volumen de la reacción (como máximo 10 µl) en gel de agarosa desnaturalizante (igual al usado para ensayos de Northern blot) junto con marcadores de peso molecular de ARN.
- La cuantificación del ARN producto de reacción fue realizada mediante la comparación de diluciones seriadas del mismo contra diluciones seriadas de una muestra de ARN de concentración conocida y la visualización de las mismas bajo luz ultravioleta a través del agregado de bromuro de etidio.

Preparación de muestras

Tejido mamario fue fijado por 3 horas en 4% (P/v) paraformaldehído en 1X PBS pH 7,5, a 4 °C, deshidratado desde etanol 70% hasta xilenos (pasando por concentraciones crecientes de etanol), luego incluido en parafina (Paraplast) y cortado en secciones de 5-7 µm de espesor. Las secciones fueron montadas sobre portaobjetos de vidrio previamente silanizados (2% 3-amino propiltietoxi silano en acetona).

Prehibridación e Hibridación

Los cortes fueron deparafinizados en xilenos, rehidratados a través de concentraciones decrecientes de etanol (100% - 90% - 70% - 50% - 30%) y equilibrados en H₂O.

Una vez hidratados, los cortes fueron tratados con proteinasa K (1µg/ml en

buffer TE pH 7,5) durante 30 minutos a 37 °C, lavados en agua, luego en 1X PBS y prehibridados por 1 hora a 45 °C en cámara húmeda. Se utilizó aproximadamente 150 μ l de SOLUCION DE PREHIBRIDACION (50% v/v formamida deionizada; 3 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 10% P/v sulfato de dextrano; 1% P/v reactivo de bloqueo*; 150 μ g/ml ARNt; 1 mg/ml ARN total de levadura) por cada portaobjeto y luego se cubrió los mismos con un trozo de "parafilm" para impedir su evaporación.

Luego del período de prehibridación se removió el "parafilm" que recubría los portaobjetos y se dejó drenar la solución de prehibridación sobre un pañuelo de papel. A continuación se agregó la solución de hibridación conteniendo la sonda "sense" o bien la "antisense" utilizada como control negativo. La hibridación fue realizada durante toda la noche a 45 °C, dentro de una cámara húmeda. La solución de hibridación utilizada fue igual a la de prehibridación con el agregado de las sondas respectivas (800 ng de ARN producto de transcripción *in vitro*/ ml de solución), las cuales fueron previamente incubadas a 80 °C durante 10 minutos, y luego enfriadas en hielo 2-3 minutos.

Luego de la hibridación se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente con 2X SSPE, luego 2 lavados de una hora cada uno con 0,2X SSPE a 50 °C y finalmente se equilibró las muestras en 1X PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Detección inmunoquímica de las moléculas de DIGOXIGENINA (DIG)

Los cortes fueron bloqueados en SOLUCIÓN DE BLOQUEO (2% P/v reactivo de bloqueo* en 100 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación; y luego lavados durante 1 hora a temperatura

ambiente, con agitación con SOLUCIÓN DE LAVADO (1% P/v BSA; 0.3% v/v Tritón X-100 en 100 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl).

Se diluyó el anticuerpo anti-DIG (acoplado a la enzima fosfatasa alcalina) 1:500 en solución de bloqueo (concentración final 1.5 unidades/ml) y se incubó los cortes con esta solución durante toda la noche a temperatura ambiente, en cámara húmeda.

Revelado cromogénico

Se eliminó el exceso de anticuerpo mediante 3 lavados, de 5 minutos cada uno, con la solución de lavado descrita anteriormente. Los cortes fueron bloqueados por 30 minutos a temperatura ambiente en solución de bloqueo y luego equilibrados por 2 minutos en BUFFER para FOSFATASA ALCALINA (100 mM Tris HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂). Finalmente fueron incubados en buffer para fosfatasa alcalina con el agregado de los sustratos NBT y "X-phosphate" (45 µl NBT y 35 µl "X-phosphate" cada 10 ml de solución).

Se dejó proceder la reacción cromogénica hasta observarse la intensidad de color deseada (este tiempo varió considerablemente entre diferentes reacciones, desde 3 a 24 horas) y la reacción se detuvo mediante el lavado en buffer TE pH 8 (10 mM Tris; 1 mM EDTA). Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas mediante el pasaje a través de concentraciones crecientes de etanol, montadas y observadas al microscopio óptico (Zeiss). Las fotografías fueron tomadas con película Kodak color de 100 ASA.

* "blocking reagent": obtenido de la compañía Boehringer Mannheim.

II.9 - ANIMALES UTILIZADOS

Las glándulas mamarias fueron extirpadas de ratones hembra de las cepas CD-1 y C57bl/crl vírgenes maduras (70 días de edad) y en distintos estadios a lo largo del proceso de gestación y lactancia. Se consideró como día 1 de preñez al día en el que se detectó la aparición del tapón vaginal resultante de la cópula. Para la obtención de glándulas mamarias en estadio de involución, se separaron las crías luego de 9 días de lactancia y el día posterior al destete fue considerado primer día de involución.

Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Lawrence Berkeley National Laboratory según las normas establecidas por "Animal Welfare and Research Committee" (Berkeley CA- U.S.A).

II.10 - Producción de anticuerpos policlonales contra la proteína Hoxb-7

Con el objetivo de poder estudiar la regulación del gen *Hoxb-7* a nivel de la expresión de la proteína correspondiente, nos propusimos desarrollar un anticuerpo policlonal contra un fragmento de 67 aminoácidos de dicha proteína homeótica de ratón. Para ello se amplificó un segmento de 203 pares de bases del gen *Hoxb-7* de ratón mediante reacciones de "PCR" (ver figura 10). Los "primers" fueron elegidos de forma tal que el fragmento amplificado correspondió a la zona de menor homología con otras proteínas homeóticas Hox, dentro de la región 5'. El producto de PCR fue purificado, clonado y luego secuenciado para confirmar su identidad.

El clonado fue realizado en un vector de expresión bacteriano (pRSET A, Invitrogen y bacterias *E. coli* BL 21) de forma tal que al transcribirse el fragmento clonado a partir de un promotor inducible por IPTG y luego traducirse, el polipéptido resultante contenga un tracto de 6 residuos de histidina fusionado al fragmento de la proteína

Hoxb-7. La presencia de esta cola de histidinas permite la purificación del polipéptido recombinante mediante columnas de Níquel-Agarosa, según los protocolos sugeridos por la compañía QIAGEN en el kit "The Qiaexpressionist". Una vez obtenida la cantidad necesaria de polipéptido recombinante (aproximadamente 1 mg), éste fue inyectado subcutáneamente en conejos hembra New Zeland conjuntamente con el adyuvante de Ribi ("RAS" Ribi Adjuvant System de la compañía Ribi ImmunoChem Research). El mantenimiento de los animales y las inmunizaciones y fueron realizadas por personal especializado del servicio veterinario de "OLAC" (Office of Laboratory Animal Care) de la Universidad de California en Berkeley, Estados Unidos de Norteamérica. El programa de inmunización fue el siguiente:

Día 0) 1a inyección: aprox. 150 µg de antígeno/ conejo

Día 21) 2a inyección: aprox. 150 µg de antígeno/ conejo

Día 42) 3a inyección: 80-100 µg de antígeno/ conejo

Día 74) 4a inyección: 80-100 µg de antígeno/ conejo

En los días 28 y 54 se realizaron extracciones de pequeños volúmenes de sangre para evaluar el desarrollo de la respuesta inmune.

Día 84) sangrado total de los animales y recolección del suero.

La presencia de anticuerpos contra el polipéptido recombinante fue evaluada mediante ensayos de western blot sobre lisado de proteínas totales de bacterias transformadas inducidas con 2 mM IPTG durante 2 horas o sin inducir. Como controles se utilizaron bacterias sin transformar, suero pre-inmune y lisado de bacterias que expresaban un polipéptido recombinante no relacionado mediante el mismo sistema de expresión. Como se observa en la figura 13, el antisuero obtenido es capaz de reconocer al polipéptido recombinante "6Xhis-Hoxb-7".

Actualmente se está llevando a cabo en el laboratorio de la Dra. Bissell, la purificación de los anticuerpos específicos mediante columnas de afinidad.

Fig. 15

II.11 - "BUFFERS" UTILIZADOS

Se describen solo aquellos cuya composición no se detalla en ninguno de los métodos descritos en las secciones anteriores.

20X SSC

175,3 g/l NaCl
88,2 g/l citrato de sodio
pH 7,0

20X SSPE

174,0 g/l NaCl
27,6 g/l NaH₂PO₄
7,4 g/l EDTA
pH 7,4

TE

10 mM TRIS HCl pH 7,6
1 mM EDTA

5X TBE

54 g/l TRIS base
27,5 g/l ácido bórico
20 ml/l 0,5M EDTA pH 8

10X PBS

80 g/l NaCl
2 g/l KCl
11,5 g/l Na₂HPO₄
2 g/l KH₂PO₄

50X TAE

242 g/l TRIS base
57,1 ml/l ácido acético glacial
100 ml/l 0,5M EDTA pH 8

III. Resultados

III.1 - Identificación de ARN mensajeros de genes *Hox* en células mamarias murinas.

Para determinar si alguno de los genes del complejo *Hox* se expresaba en células mamarias murinas, se llevaron a cabo reacciones en cadena de polimerasa ("PCR") con oligonucleótidos degenerados diseñados en base a la secuencia aminoacídica de dos regiones altamente conservadas dentro de los homeodominios de todos los miembros ya identificados de este complejo génico (figura 14). Como sustrato de la reacción se utilizó ADN copia generado por transcripción reversa de ARN mensajero poliadenilado (poliA⁺) obtenido de cultivos de células mamarias de la cepa CID-9 en condiciones que se discuten más adelante. Esta estrategia permitiría, teóricamente, la amplificación de fragmentos de ADNc correspondientes a todos los genes *Hox* que se expresan en dichas células, tanto aquellos ya descritos como así también posibles integrantes aún no identificados de este grupo génico.

Debido al total desconocimiento acerca de los patrones de expresión de genes homeóticos en el tejido mamario, se llevó a cabo una estrategia de búsqueda amplia. Para ello, se recolectaron muestras de ARN total de células en estado proliferativo como así también a diferentes tiempos a lo largo del proceso de diferenciación: 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas a partir del plaqueo de células sobre membrana basal reconstituída (matriz EHS), en presencia de hormonas lactogénicas. Asimismo, se optó por la utilización de células CID-9, las cuales constituyen una cepa celular heterogénea que contiene células epiteliales y mesenquimáticas o estromales, de forma tal de incluir aquellos homeogenes que pudiesen ser expresados en cualquiera de estos tipos celulares o bien depender de la interacción epitelio-mesénquima para su expresión en alguno de ellos.

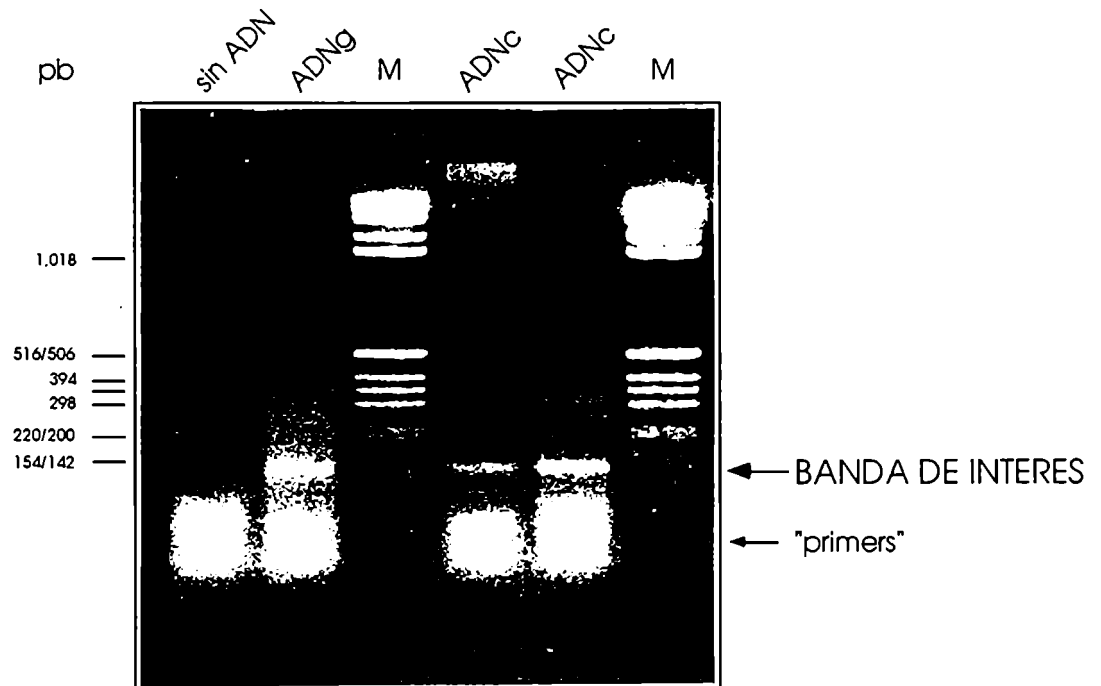
<i>Antp</i>	RKRGRQTYTR	YQTL LEKEF	HFNRYLTERR	RIEIAHALCL	TERQ IKWFO	NRRMKWK ENK
<i>Hoxa9</i>	TRKK-CP--K	H-----	L--M---D-	-Y-V-RL-N-	---V-----	---M--I--
<i>Hoxb9</i>	SRKK-CP--K	-----	L--M---D-	-H-V-RL-N-	S---V-----	---M--M--
<i>Hoxc9</i>	TRKK-CP--K	-----	L--M---D-	-Y-V-RV-N-	---V-----	---M--M--
<i>Hoxd9</i>	TRKK-CP--K	-----	L--M---D-	-Y-V-RI-N-	---V-----	---M--MS-
<i>Abd-B</i>	VRKK-KP-SK	F-----	L--A-VSKQK	-W-L-RN-Q-	---V-----	---N--NSQ
<i>Hoxb8</i>	-R-----S-	-----	L--P---K-	---VS---G-	---V-----	---N-----
<i>Hoxc8</i>	-RS-----S-	-----	L--P---K-	---VS---G-	---V-----	---N-----
<i>Hoxa7</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----H-
<i>Hoxb7</i>	-----	-----	-Y-----	-----T-	-----	-----
<i>Hoxa6</i>	GR-----	-----	-----	-----N-	-----	-----
<i>Hoxb6</i>	GR-----	-----	-Y-----	-----	-----	-----S-
<i>Hoxc6</i>	-R---I-S-	-----	-----	-----N-	-----	-----SN
<i>Abd-A</i>	-R-----	F-----	---H-----	-----	-----	---L---LR
<i>Ubx</i>	-R-----	-----	-T-H-----	---M-----	-----	---L---IQ
<i>Hoxa5</i>	G--A-TA---	-----	-----	-----	S-----	---D---
<i>Hoxb5</i>	G--A-TA---	-----	-----	-----	S-----	---D---
<i>Scr</i>	T--Q-TS---	-----	-----	-----	-----	---L---H-
<i>Hoxa4</i>	P--S-TA---	Q-V-----	-----	---T---	S--V-----	---DH-
<i>Hoxb4</i>	P--S-TA---	Q-V-----	-Y-----	-V-----	S-----	---DH-
<i>Hoxd4</i>	P--S-TA---	Q-V-----	-----	---T---	P-----	---DH-
<i>Dfd</i>	P--Q-TA---	H-I-----	-Y-----	---T-V-	S-----	---D-
<i>Hoxa3</i>	S---TA---	P-LV-----	---M-P-	-V-M-NL-N-	-----	---Y--DQ-
<i>Hoxb3</i>	S--A-TA--S	A-LV-----	---C-P-	-V-M-NL-N-	S-----	---Y--DQ-
<i>Hoxd3</i>	S--A-TA--S	A-LV-----	---FV-P-	-VQM-NL-N-	S-----	---Y--DQ-
<i>Hoxa1</i>	PNAV-TNF-T	K-LT-----	---K---A-	-V---AS-Q-	N-T-V-----	---Q--RE-
<i>Lab</i>	NNS--TNF-N	K-LT-----	---A-----	---NT-Q-	N-T-V-----	---Q--RV-

FIGURA 14.

Alineamiento de las secuencias aminoacídicas codificadas por los "homeoboxes" de 20 genes del complejo Hox de mamíferos (en negro) y 7 genes del complejo HOM de *Drosophila* (en rojo). Las áreas coloreadas indican las regiones de completa homología entre todas las proteínas homeóticas de la clase "Antennapedia", en base a las cuales fueron diseñados los oligonucleótidos degenerados que se utilizaron en las reacciones de "PCR".

(Modificado de: Frohman et al., 1990)

Igual cantidad de ARN total proveniente de células CID-9 en cada una de las condiciones de cultivo descritas fueron combinadas en una muestra única a partir de la cual se purificó ARNm poli(A)⁺ el cual fue utilizado para la síntesis de ADN copia. Dicho ADNc sirvió de sustrato en las reacciones de PCR mencionadas anteriormente. Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa (figura 15), pudiéndose identificar una banda de la longitud esperada de acuerdo al tamaño conocido de todos los homeodominios del complejo Hox (ver figura 14).



ADNg = ADN genómico
 ADNc = ADN copia
 M = marcadores de peso molecular

FIGURA 15

Los productos de PCR fueron purificados mediante la elución del ADN de la banda de agarosa de interés y posteriormente clonados en el vector pBluescript KSII como se detalla en Materiales y Métodos. Se transformaron bacterias competentes E.coli (cepa DH5 α o XL1-blue), se seleccionaron las colonias transformantes mediante el crecimiento en agar con ampicilina y se preparó ADN plasmídico de un gran número de colonias bacterianas recombinantes elegidas al azar. Mediante digestiones con enzimas de restricción se verificó que el ADN plasmídico proveniente de dichas colonias contenía un inserto del tamaño esperado.

Se procedió luego a la secuenciación de los insertos presentes en los plásmidos recombinantes por la técnica de Sanger usando un "primer" ("M13 (-40)" del kit Sequenase version II- USB) que se aparea con una región flanqueante al sitio de clonado.

Las secuencias obtenidas a partir de los diferentes clones fueron comparadas contra secuencias previamente depositadas en un banco génico (GenBank) mediante el software del "Genetic Computer Group" de la Universidad de Wisconsin, U.S.A.

Como se muestra en la figura 16, los 64 clones secuenciados correspondieron a fragmentos de homeoboxes de 5 genes homeóticos previamente identificados. Dos de ellos, *Hoxa-1* y *Hoxa-5* pertenecen al "cluster" a mientras que los tres restantes, *Hoxb-7*; *Hoxb-8* y *Hoxb-9* pertenecen al "cluster" b del complejo Hox (según la nomenclatura sugerida por Scott., 1992. ver figura 9A, Introducción)

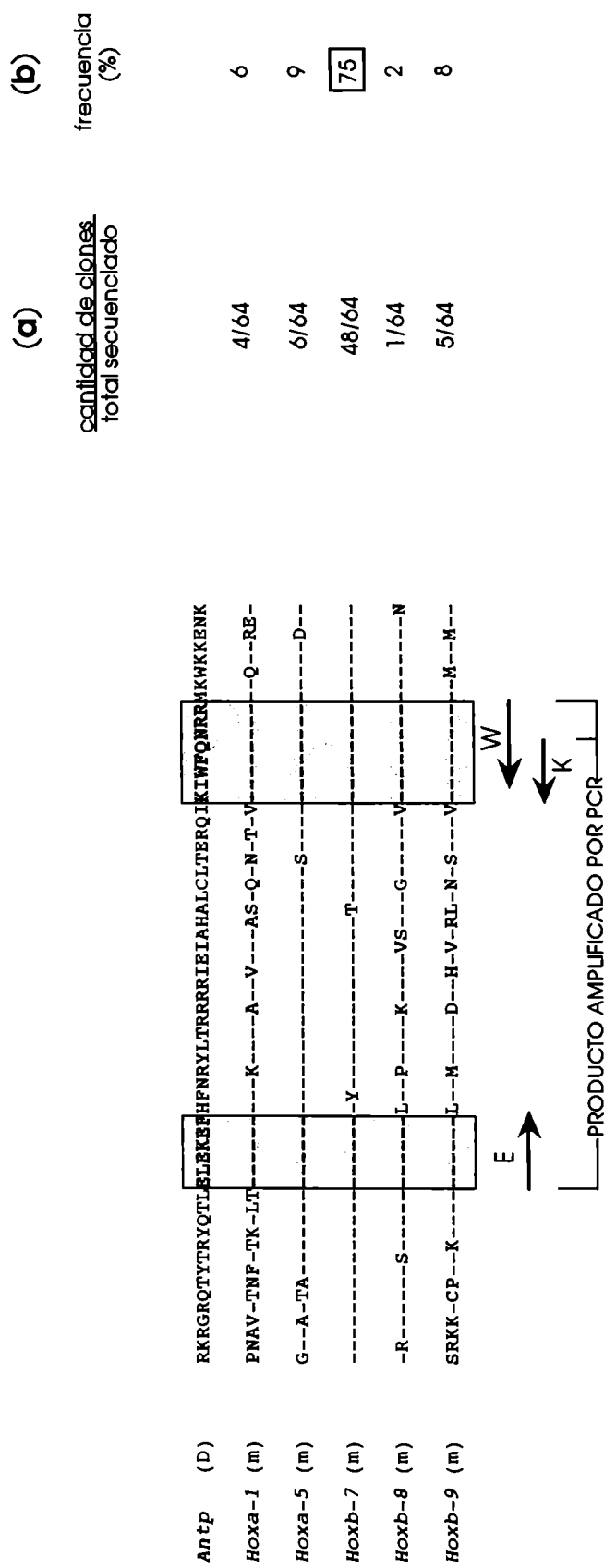


Figura 16.

Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los homeodominios correspondientes al gen *Antennapedia* de *Drosophila* (D) y a los genes *Hox* murinos (m) cuya expresión fue detectada mediante ensayos de "RT-PCR", en células mamarias en cultivo. Las áreas coloreadas indican las regiones de homología en base a las cuales fueron designados los "primers" degenerados (→) utilizados para las reacciones de amplificación. La letra mayúscula sobre cada primer corresponde a la denominación asignada a los mismos en la sección II.4 de Materiales y Métodos. La columna (a) indica la cantidad de clones secuenciados correspondientes a cada gen sobre el total de clones secuenciados. La columna (b) indica las frecuencias de identificación de cada gen calculadas en base a los datos de la columna (a).

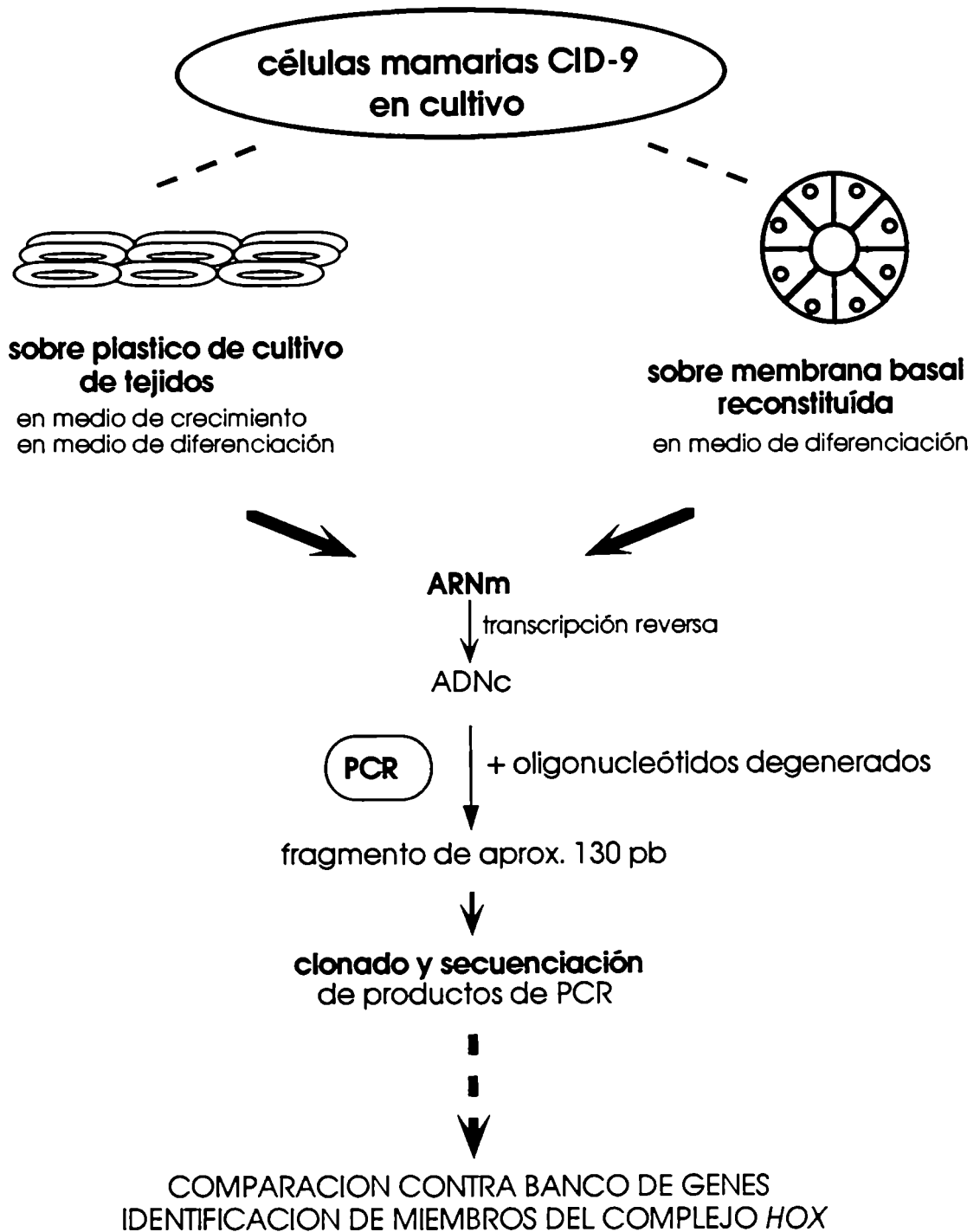


Figura 17.

Esquema de la estrategia y metodología utilizada para la identificación de ARN mensajeros de genes homeóticos, presentes en células mamarias murinas.

Esta estrategia había sido utilizada exitosamente para el estudio de la expresión de genes homeóticos en epitelio intestinal murino (James y Kazenwadel, 1991), retina del pez *Carassius auratus* (Levine y Schechter, 1993), células de eritroleucemia murina (Takeshita et al., 1993), etc. así como también para el estudio de la expresión de miembros de otras familias génicas, por ejemplo aquellos que codifican para proteínas quinasas (Blaschke et al., 1991). En varios de estos casos, condujo también a la identificación de nuevos genes (hasta ese momento no descriptos) pertenecientes a las familias génicas que estaban siendo estudiadas.

De los 5 genes *Hox* cuyos mensajeros fueron detectados en células mamarias mediante ensayos de RT-PCR, dos de ellos: *Hoxa-1* del cluster a y *Hoxb-7* del cluster b, fueron seleccionados para llevar a cabo un estudio exhaustivo de sus respectivos patrones de expresión en la glándula mamaria murina como así también en el sistema de células mamarias en cultivo desarrollado en el laboratorio de la Dra. Bissell.

Primeramente, fue necesario corroborar la expresión de ambos genes en cultivos celulares mediante ensayos de Northern blot. Para ello se utilizó ARN total de monocapas sub-confluentes de células CID-9. Como se observa en la figura 18, en estas células pudo detectarse la presencia de un transcripto de aproximadamente 2,5 kb correspondiente al gen *Hoxa-1* y dos transcriptos de aproximadamente 1,6 y 1,4 kb respectivamente, correspondientes al gen *Hoxb-7*. Estos tamaños coinciden con los descriptos en la literatura para los ARN mensajeros de cada uno de estos genes (Friedmann et al., 1994; Meijlink et al., 1987).

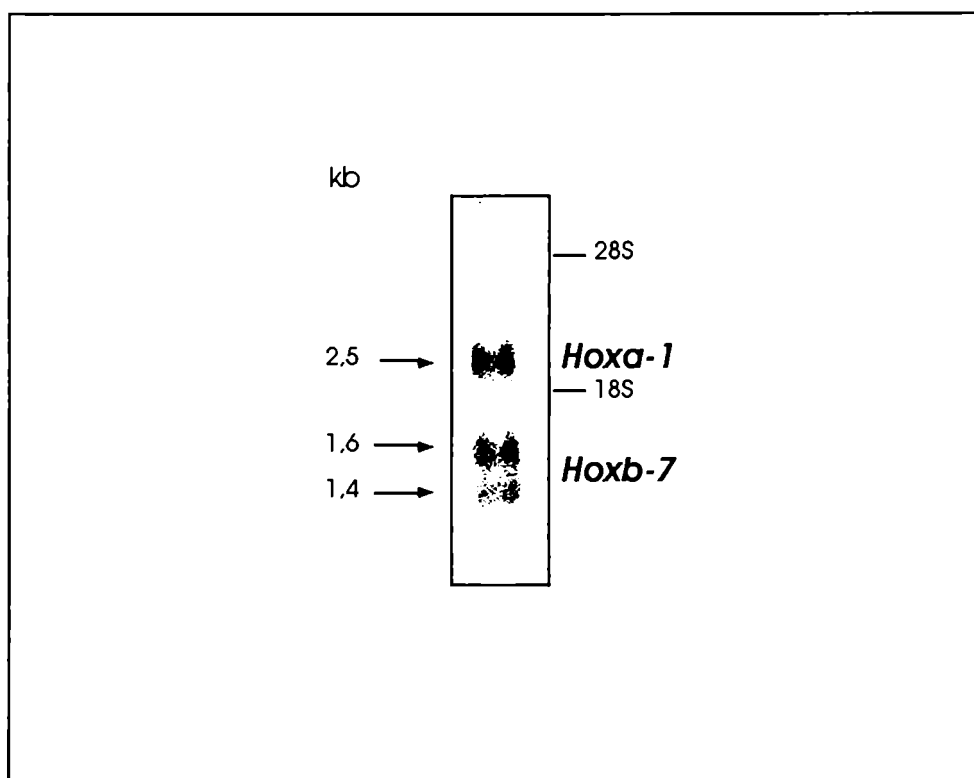


FIGURA 18.

Los diferentes transcritos observados se señalan con flechas y los tamaños aproximados se indican en kilobases (lado izquierdo). La migración relativa del ARN ribosomal (28S y 18S) se indica en el lado derecho del panel.

La misma membrana conteniendo muestras de ARN total fue hibridada consecutivamente con sondas de ADNc correspondientes a los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7*.

III.2 - Expresión de los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7* en la glándula mamaria murina

Para estudiar la expresión de los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7* en el tejido mamario, llevamos a cabo ensayos de Northern blot de ARN total extraído de glándulas mamarias de ratones hembra en los siguientes estadios: maduras "vírgenes" (70 días de edad); preñadas (13 días post coito); 2, 5 y 9 días de lactancia y 2, 5 y 9 días de involución.

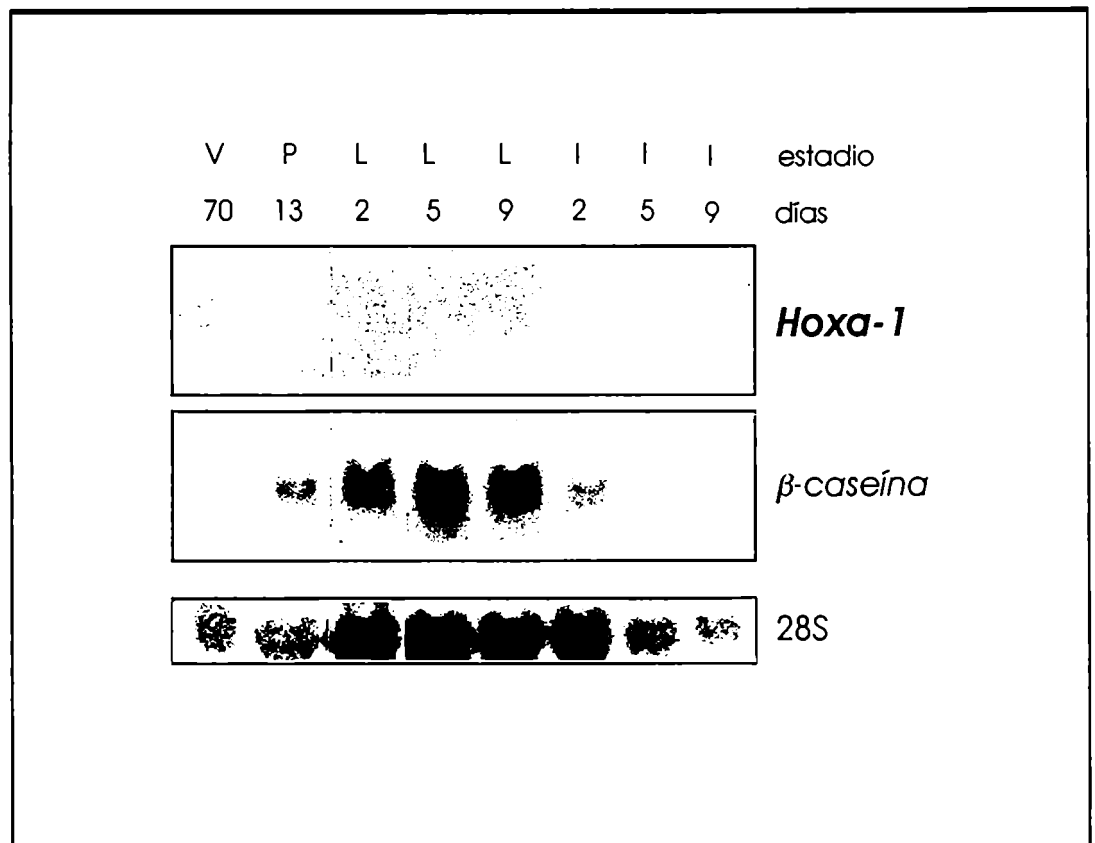


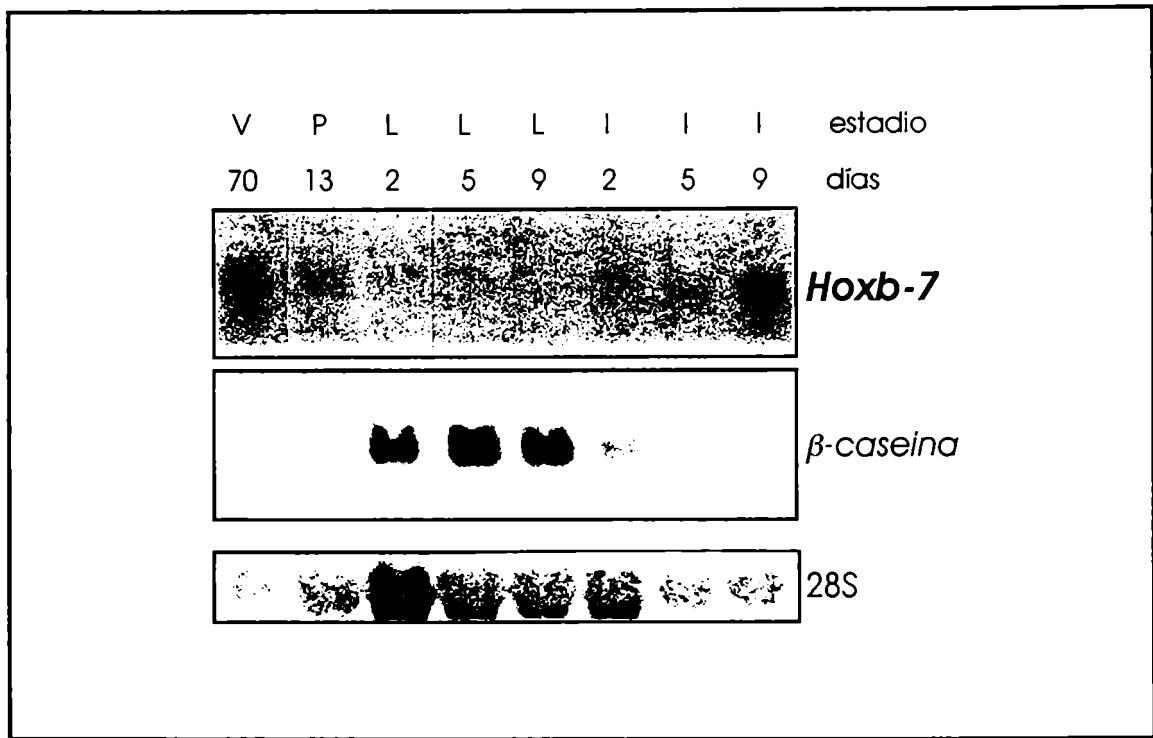
FIGURA 19.

V = glándulas de hembras vírgenes
P = glándulas de hembras preñadas
L = glándulas de hembras lactantes
I = glándulas de hembras en involución

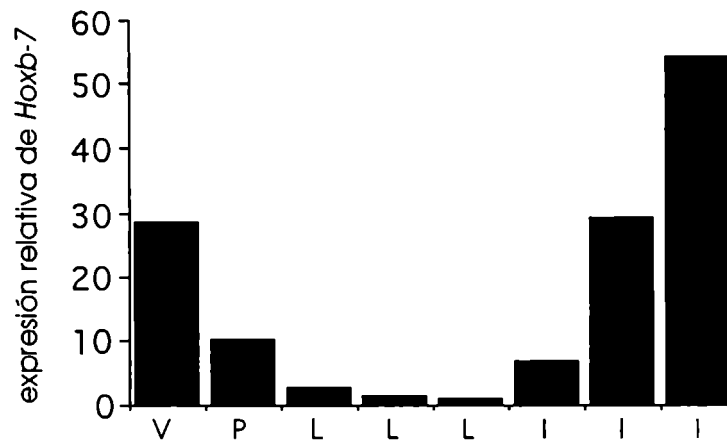
La misma membrana fue hibridada secuencialmente con sondas para *Hoxa-1*, β -caseína y ARN ribosomal 28S.

Como se observa en la figura 19, mediante esta técnica no se detecta ARN mensajero correspondiente al gen *Hoxa-1* en ninguno de los estadios de desarrollo de la glándula normal analizados. Estos resultados coinciden con los descritos por Friedmann y colaboradores (1994).

Por otra parte, la figura 20 muestra la presencia de un transcripto único de aproximadamente 1,6 kb correspondiente al gen *Hoxb-7* a lo largo del desarrollo glandular. Si bien la abundancia de los transcriptos de este gen es muy baja, como sucede con muchos factores de transcripción, y por lo tanto su detección en muestras de ARN total por ensayos de Northern blot requiere largos períodos de exposición, fue posible concluir que los niveles de dichos transcriptos se encuentran regulados en forma estadio-específica. Se observaron niveles relativamente elevados en tejido proveniente de hembras vírgenes, luego decrecen en estadios de preñez, y están prácticamente ausentes durante la lactancia para luego aumentar progresivamente durante la involución.



A



B

FIGURA 20.

V; P; L; I = ver referencia figura 19.

A. Ensayo de Northern blot. La misma membrana fue hibridada secuencialmente con sondas para *Hoxb-7*, β -caseína y ARN ribosomal 28S.

B. Las bandas correspondientes al ARNm de *Hoxb-7* fueron cuantificadas densitométricamente y normalizados con las bandas correspondientes de ARNr 28S.

III.3 - Localización de transcritos *Hoxb-7* en la glándula mamaria murina

Los ensayos de Northern blot nos permitieron identificar los patrones temporales de expresión de los genes homeóticos estudiados. Sin embargo, al observar los niveles relativos de los ARN mensajeros en las muestras de ARN total correspondientes a los distintos estadios de la glándula mamaria no se considera que este tejido está compuesto por diferentes tipos celulares y que dicha composición varía a lo largo del desarrollo.

Con el propósito de conocer la distribución espacial de expresión del gen *Hoxb -7* e identificar el o los tipos celulares responsables de la misma en el tejido mamario, llevamos a cabo ensayos de hibridación *in situ* sobre cortes de glándula mamaria murina en distintos estadios de desarrollo. Para ello se utilizaron sondas de ARN simple cadena, no radioactivas, marcadas con digoxigenina (DIG), cuya secuencia era complementaria al ARN mensajero de dicho gen (sonda "antisense"). Como control negativo de estos experimentos, paralelamente se llevaron a cabo hibridaciones con sondas cuya secuencia era igual al ARN mensajero de *Hoxb -7* (sonda "sense").

La figura 21 muestra los resultados obtenidos con cortes de glándulas provenientes de hembras vírgenes maduras y en estadios tempranos de preñez (hasta días 7 post-coito). Los transcritos del gen *Hoxb-7* se localizan principalmente en células epiteliales. Si bien también se observó cierta acumulación de transcritos en células estromales peri-ductales en glándula de ratones hembra vírgenes, ésta es considerablemente más débil que la detectada en el compartimento epitelial.

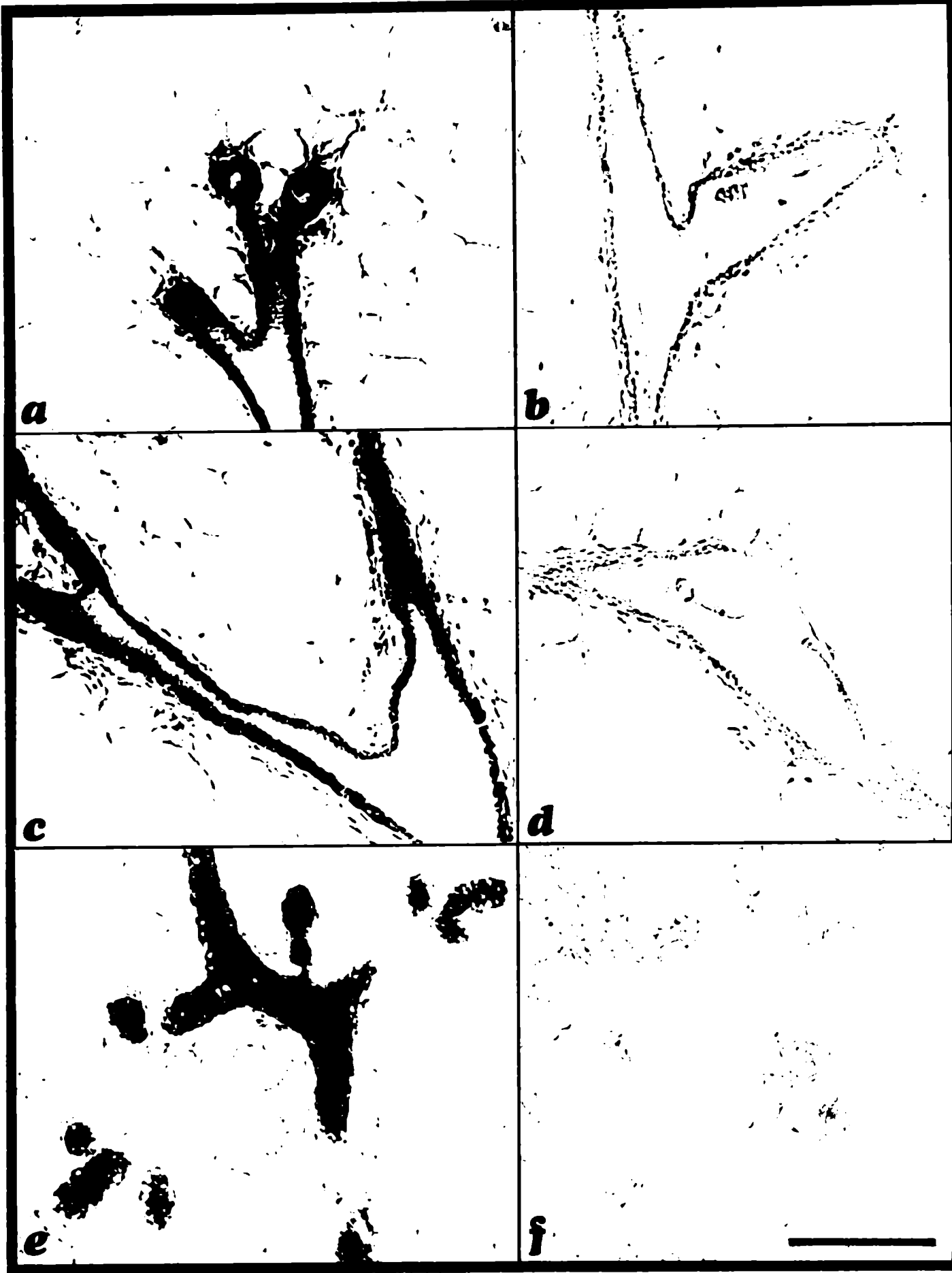


FIGURA 21. (página anterior)

Localización del ARNm de *Hoxb-7* mediante hibridación *in situ* no-radioactiva.

Cortes de glándulas mamarias de ratones hembra vírgenes de 70 días de edad (**a-d**) y en estadios tempranos de preñez (**e-f**), fueron hibridados con sondas de ARN de secuencia complementaria al mensajero de *Hoxb-7* (**a; c; e**) o bien de secuencia idéntica al mismo (**b; d; f**). Barra = 100 μ m.

Conociendo el patrón de expresión de estos dos genes *Hox* en la glándula mamaria, nos propusimos estudiar la expresión de los mismos bajo diferentes condiciones de cultivo con el objetivo de identificar posibles mecanismos regulatorios de dichos genes en células mamarias así como también dilucidar su posible rol en la diferenciación morfológica y funcional de las mismas.

III.4 - Los niveles de ARNm de *Hoxa-1* y *Hoxb-7* en células mamarias en cultivo disminuyen en presencia de una membrana basal exógena

Analizamos el patrón de expresión de los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7* en células CID-9 como así también en células de la línea SCp2, un clon epitelial derivado de las primeras. Como se describe en Materiales y Métodos, al igual que la cepa parental CID-9, la línea epitelial SCp2 se diferencia morfológica y funcionalmente cuando es cultivada sobre una membrana basal reconstituida (matriz EHS) en presencia de hormonas lactogénicas.

Para determinar si la expresión de los genes *Hox* estudiados está modulada por la matriz extracelular (MEC), ambos tipos celulares fueron cultivados en presencia de hormonas lactogénicas, sobre un gel de EHS, donde adquieren una

organización tridimensional, o bien directamente sobre plástico de placas de cultivo, donde forman una monocapa bidimensional (figura 22).

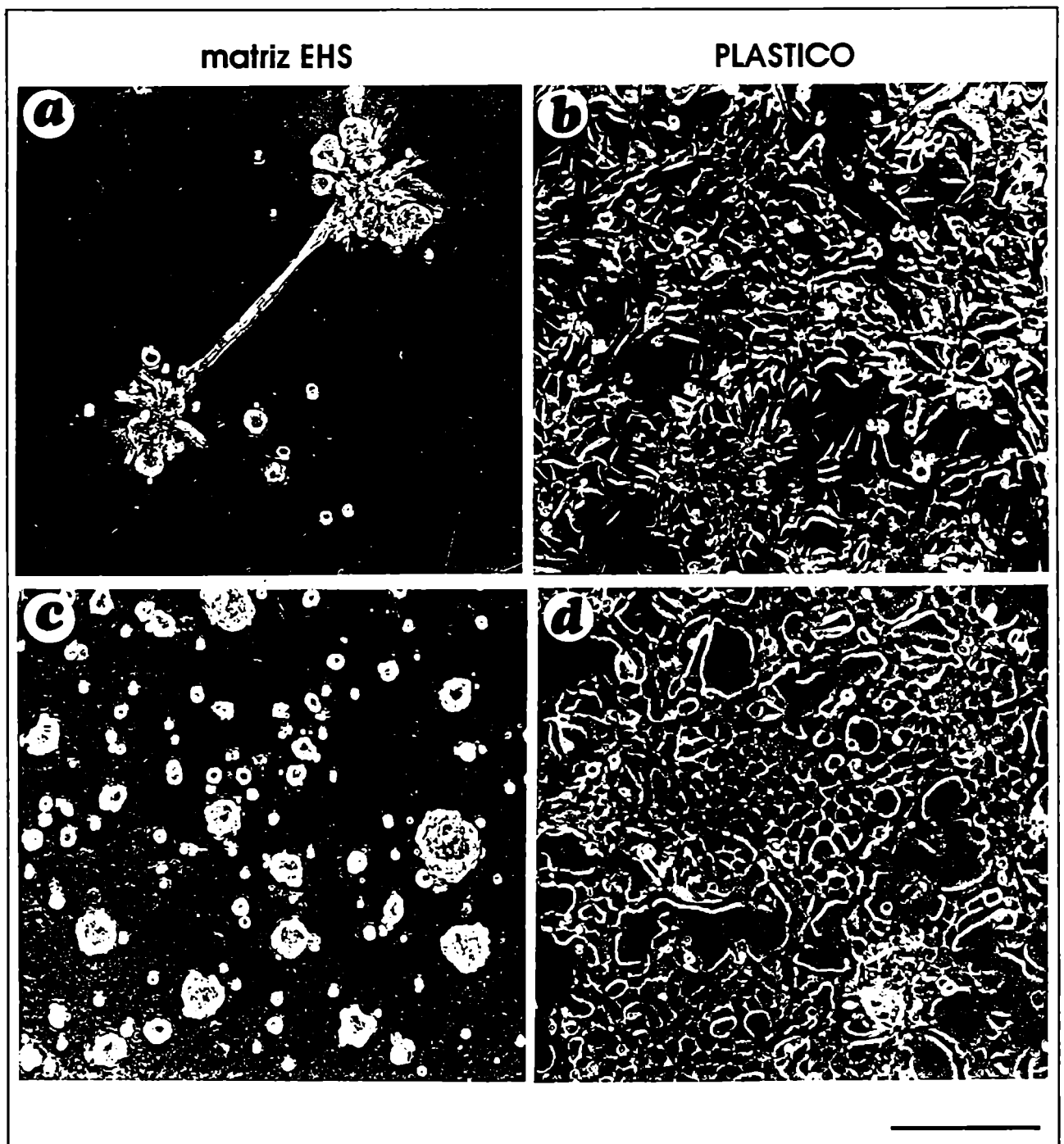


Figura 22. Cultivos de células mamarias murinas CID-9 y SCp2. Células CID-9 (a; b) y células SCp2 (c; d) cultivadas durante 2 días sobre una membrana basal reconstituída (matriz EHS) (a; c) o sobre plástico (b; d), en presencia de hormonas lactogénicas. Barra = 200 μ m.

Las células fueron cosechadas a diferentes tiempos luego de plaqueadas en ambas condiciones y el ARN total de las mismas fue analizado mediante ensayos de Northern blot (figura 23).

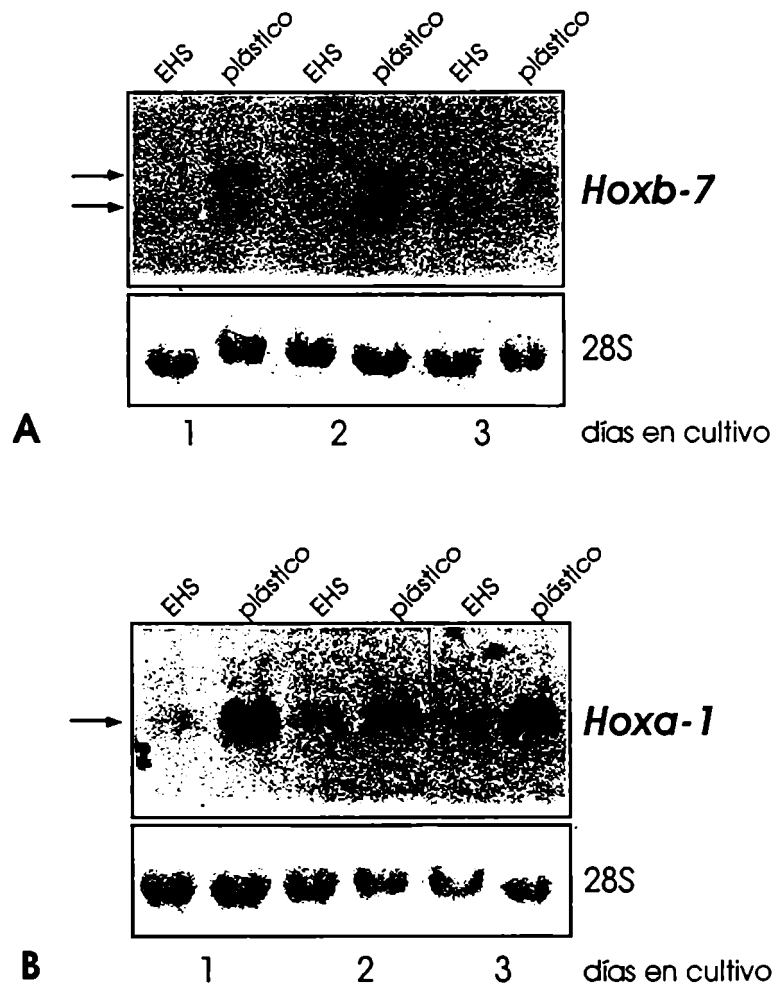


FIGURA 23.

Detección de ARN mensajero del gen *Hoxb-7* (A) y del gen *Hoxa-1* (B).

En ambos casos las membranas se hibridaron secuencialmente con una sonda para el ARN mensajero del gen homeótico y una sonda para ARN ribosomal 28S.

Se pudo observar una disminución significativa en los niveles de los ARN mensajeros de ambos genes cuando las dos líneas celulares fueron plaqueadas sobre una matriz extracelular-membrana basal exógena (EHS) en comparación con los niveles observados cuando las mismas se sembraron sobre plástico de cultivo. Este efecto pudo detectarse aproximadamente a las 24 horas de sembradas las células.

Las bandas autorradiográficas de los transcritos de ambos genes fueron cuantificadas densitométricamente. Los datos obtenidos fueron normalizados con el valor densitométrico de la banda de ARN ribosomal 28S correspondiente. Los valores normalizados promedio de al menos 3 experimentos independientes fueron graficados con su correspondiente desviación estándar (figura 24).

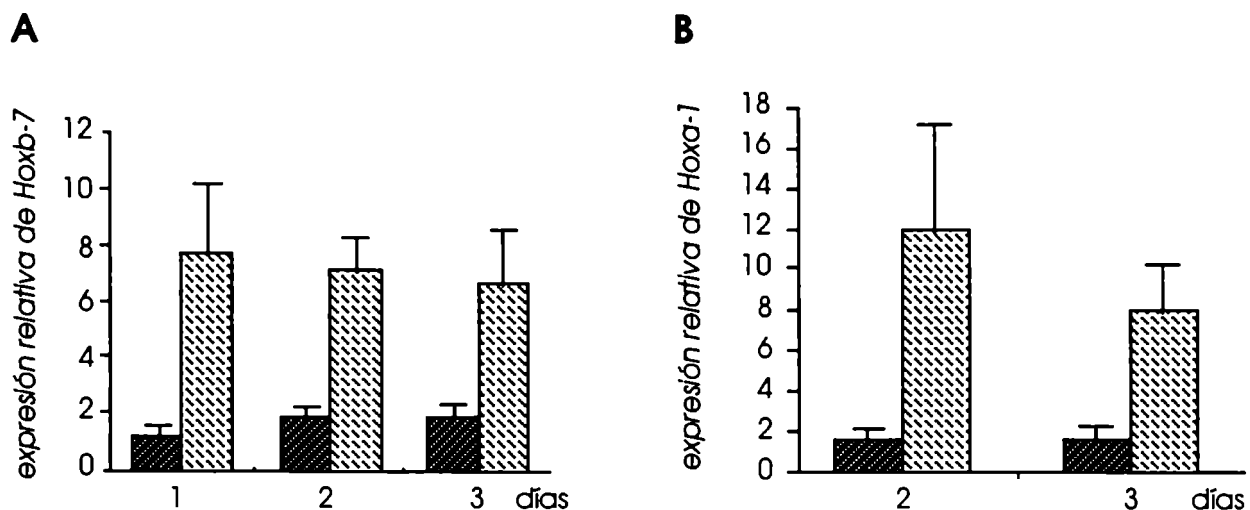


FIGURA 24.

Expresión relativa de los genes *Hoxb-7* (A) y *Hoxa-1* (B), en células CID-9 cultivadas sobre matriz EHS (■) o sobre plástico (▨); en presencia de hormonas lactogénicas. (Similares resultados se obtuvieron con células SCp2)

III.5 - Consecuencias del cambio en la morfología celular sobre la expresión de los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7*

Cuando células mamarias son plaqueadas sobre una membrana basal reconstituída, cambios en la morfología celular anteceden a las señales resultantes de la interacción entre moléculas presentes en dicha matriz extracelular y sus respectivos receptores en la superficie celular (Roskelley et al., 1994; Streuli et al., 1995). De tal manera, la matriz extracelular influencia tanto la morfología como la función celular.

Con el objetivo de separar las consecuencias sobre la expresión de *Hoxa-1* y *Hoxb-7* de un mero cambio de morfología y estructura celular de aquellos efectos mediados por interacciones específicas entre componentes de la matriz extracelular y receptores celulares, células de la línea SCp2, las cuales no depositan su propia membrana basal, fueron cultivadas sobre el sustrato anti-adhesivo poli 2-hidroxietil metacrilato (poliHEMA). Estas condiciones de cultivo mantienen a las células en suspensión e inducen el redondeado y agrupamiento de las mismas (Folkman and Moscona 1978; Roskelley et al., 1994; figura 25).

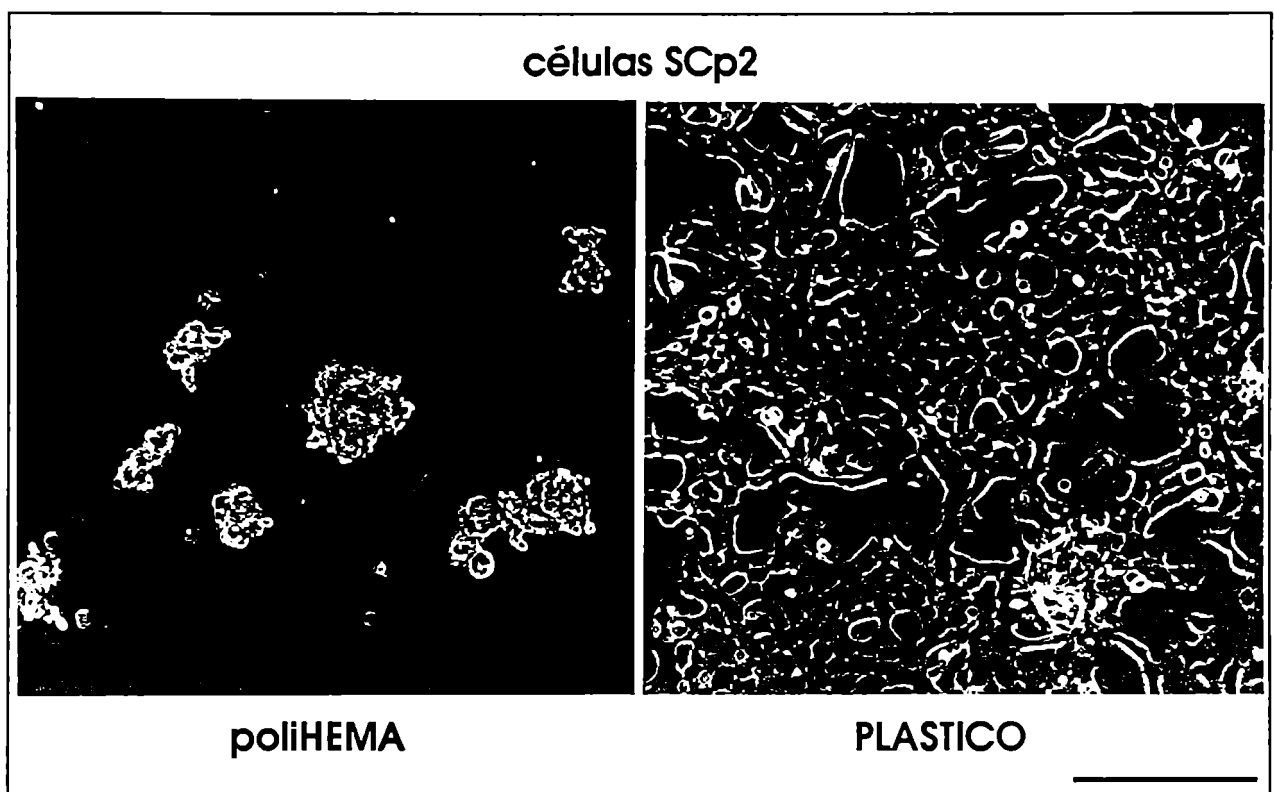


Figura 25.

Células SCp2 cultivadas durante 2 días sobre placas recubiertas con poliHEMA o sobre plástico, en presencia de hormonas lactogénicas.

Barra = 200 μ m

Las células fueron cultivadas en presencia de hormonas lactogénicas directamente sobre placas plásticas o bien sobre placas recubiertas con poliHEMA. Muestras de ARN total fueron extraídas a distintos tiempos a partir del momento de siembra (1, 2, 3 días) y los niveles de ARNm de *Hoxa-1* y *Hoxb-7* fueron analizados mediante ensayos de Northern.

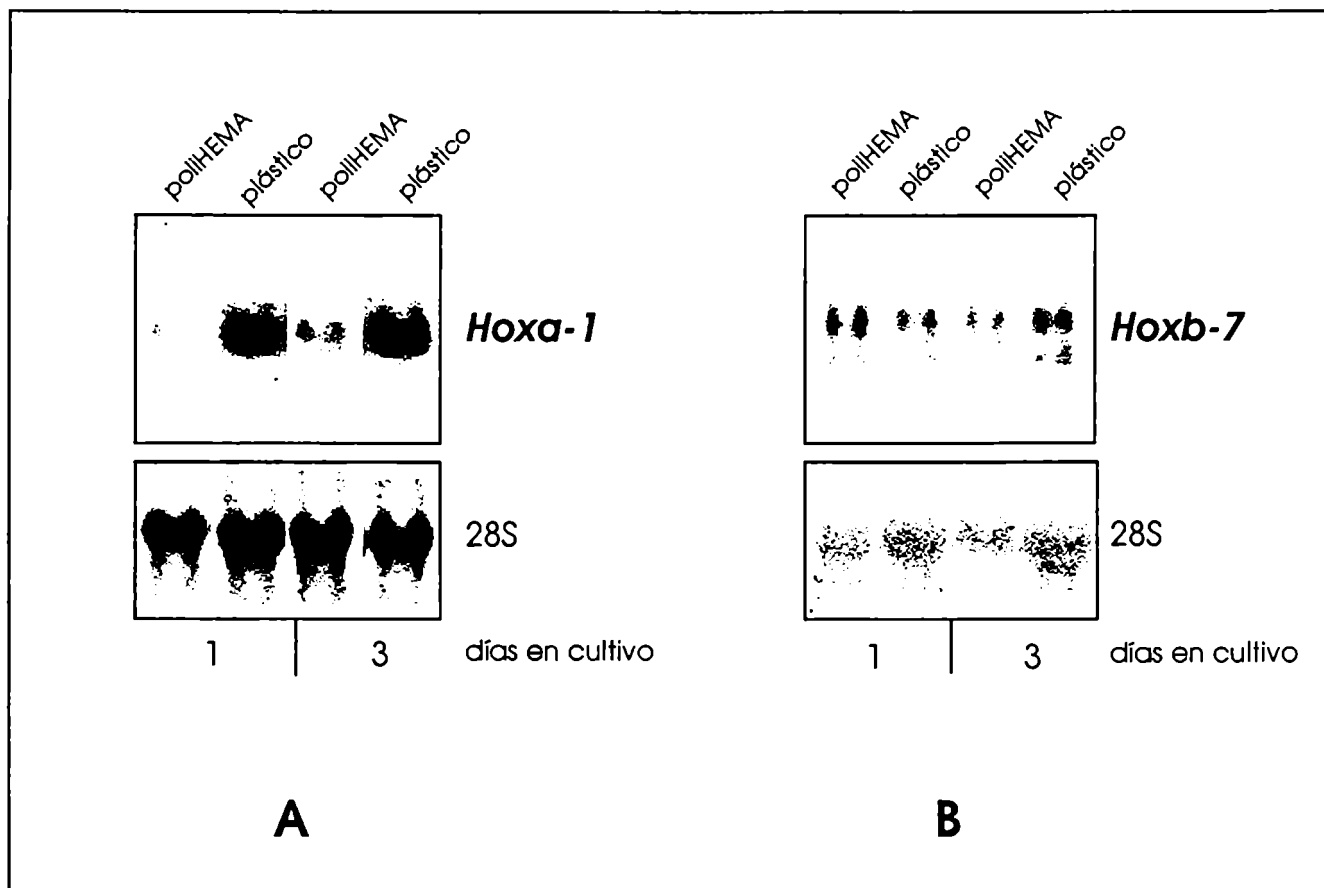


Figura 26.

Detección de ARN mensajero de *Hoxa-1* (A) y *Hoxb-7* (B) en muestras de ARN total de células SCp2 cultivadas sobre placas recubiertas con poliHEMA o sobre plástico, en presencia de hormonas lactogénicas.

Las mismas muestras fueron hibridadas con sondas para *Hoxa-1*, *Hoxb-7* y ARN ribosomal 28S.

Como se observa en la figura 26, los niveles de ARNm de *Hoxa-1* sufrieron una marcada reducción en las células plaqueadas sobre poliHEMA en comparación con los de las células plaqueadas sobre plástico. Contrariamente, los niveles de ARNm de *Hoxb-7* no disminuyeron en aquellas células forzadas a redondearse y agruparse. Los resultados observados fueron semejantes para

todos los tiempos de cultivo analizados.

Estos resultados sugieren que cambios en la morfología celular, probablemente mediados por cambios en la estructura del citoesqueleto, serían suficientes para modular la expresión de *Hoxa-1* mientras que señales adicionales presentes en el gel de membrana basal (matriz EHS) serían requeridos para la regulación de *Hoxb-7*.

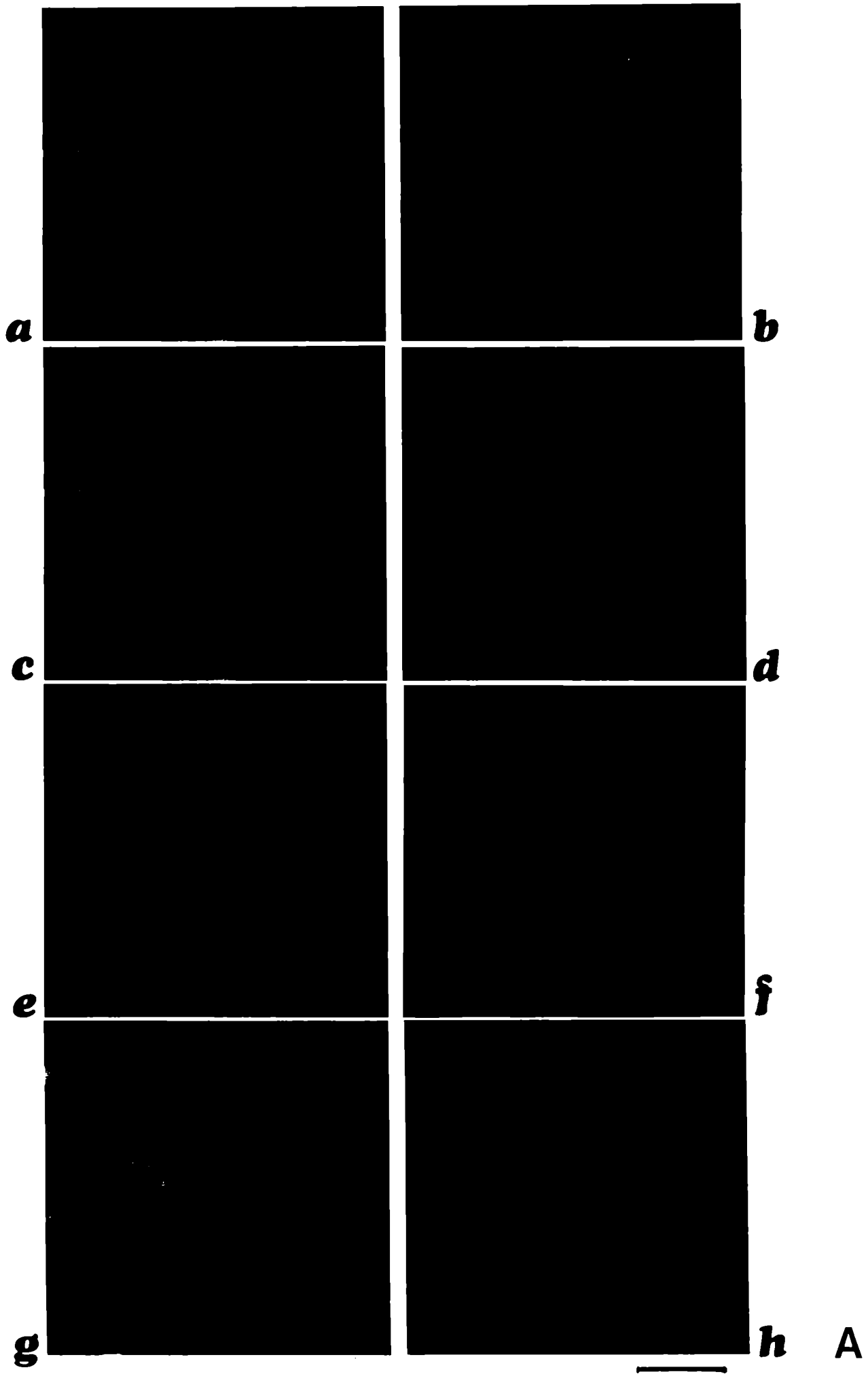
III.6 - Expresión de *Hoxa-1* y ciclo celular

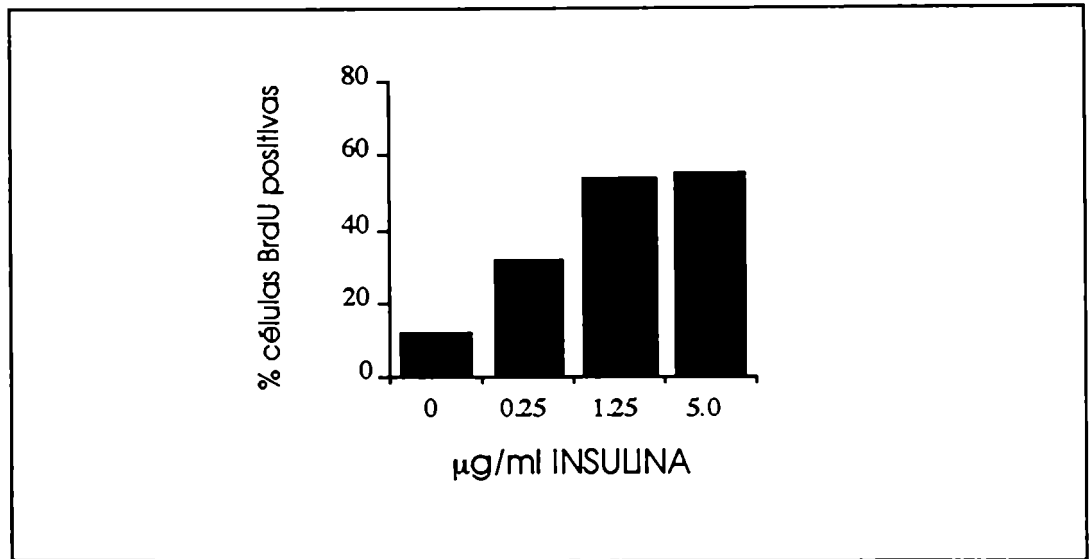
Diversos tipos celulares no transformados cultivados sobre geles de membrana basal o bien mantenidos en suspensión, sin posibilidad de adherirse y esparcirse ("spreading") sufren un arresto del ciclo celular, inhibiéndose por completo la proliferación. Este fenómeno conocido como "crecimiento dependiente de anclaje" describe la incapacidad de células normales de proliferar cuando no se encuentren adheridas a un sustrato (Folkman y Moscona, 1978).

Los resultados obtenidos acerca de la regulación negativa de *Hoxa-1* tanto en células plaqueadas sobre una membrana basal, condición que promueve la diferenciación a la vez que inhibe la proliferación celular (Desprez et al., 1995), como así también en células en suspensión sobre placas cubiertas con poliHEMA, en comparación con la expresión observada en células adheridas a plástico de cultivo las cuales continúan proliferando aún luego de 3 días en ausencia de suero (Desprez et al., 1995; Boudreau et al., 1996), nos indujeron a pensar que niveles elevados de expresión del gen *Hoxa-1* podrían estar relacionados con una alta tasa de proliferación celular e inversamente, su disminución con la inhibición de la proliferación.

Para discernir si el efecto inhibitorio de la matriz extracelular sobre la expresión del gen *Hoxa-1* se debía a una disminución en la tasa de proliferación celular o a un cambio en la morfología celular, eran posibles dos estrategias: o bien establecer una condición de cultivo en la cual las células no cambiaran su morfología pero sí disminuyesen su tasa de proliferación, o bien la situación opuesta en la cual las células adquiriesen una morfología redondeada sin modificar su tasa de proliferación. Debido a que esta última condición es altamente improbable, optamos por la primera alternativa y modificando la concentración de insulina presente en el medio de cultivo, logramos disminuir la proliferación celular en células SCp2 previamente adheridas y esparcidas sobre placas de cultivo .

Células SCp2 fueron sembradas sobre placas plásticas de cultivo tanto en presencia de suero como de insulina en la concentración utilizada normalmente (5 µg/ml). 24 horas más tarde, cuando las células ya se hallaban completamente adheridas y esparcidas, el medio fue reemplazado por medio fresco conteniendo hormonas lactogénicas y libre de suero pero la concentración de insulina fue variada en cada placa, desde 0 hasta 5 µg/ml. En estas condiciones las células fueron mantenidas por otras 24 horas, período que incluyó 12 horas de incubación con bromo-deoxiuridina (BrdU) para poder cuantificar la síntesis de ADN o el pasaje de células por la fase S del ciclo celular como medida de la tasa de proliferación (figura 27)





B

FIGURA 27.

A. (página anterior)

Ensayo de proliferación celular de células SCp2 cultivadas sobre plástico, en ausencia de insulina (**a; b**) o con insulina en las siguientes concentraciones: 0,25 µg/ml (**c; d**); 1,25 µg/ml (**e; f**); 5 µg/ml (**g; h**). Los núcleos celulares fueron teñidos con colorante de DAPI (**a; c; e; g**) y la BrdU incorporada fue revelada con un anticuerpo anti-BrdU acoplado a fluoresceína (**b; d; f; h**).

Barra= 50 µm

B. Cuantificación de los ensayos de proliferación celular mostrados en (**A**). El gráfico indica el porcentaje de células BrdU positivas para cada una de las concentraciones de insulina utilizadas.

Paralelamente, se extrajo ARN total de placas de células que habían sido sometidas a las mismas condiciones de cultivo ya descritas y mediante ensayos de Northern blot se evaluó el nivel de expresión del gen *Hoxa-1* (figura 28)

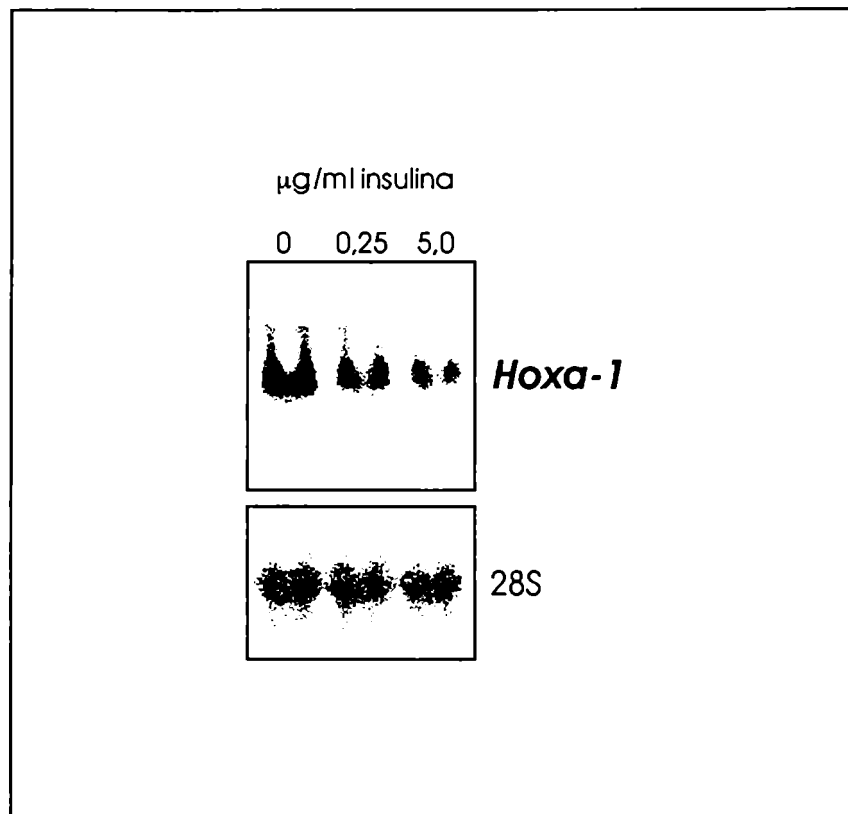


FIGURA 28.

Detección de ARNm de *Hoxa-1* mediante ensayos de Northern blot. La figura muestra sólo los datos correspondientes a aquellas concentraciones de insulina que resultaron en índices de proliferación notablemente diferentes (ver figura 27). La misma membrana fue hibridada secuencialmente con sondas para *Hoxa-1* y ARN ribosomal 28S.

A pesar de observarse una dramática disminución en el pasaje por la fase S del ciclo celular en las células mantenidas por 24 horas en ausencia de insulina o bien con una baja concentración de dicha hormona, en comparación con los niveles de proliferación observados en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, no detectamos una disminución en los niveles de ARNm de *Hoxa-1*. Esto indica

claramente que la regulación negativa de *Hoxa-1* observada en células epiteliales mamarias cultivadas sobre placas recubiertas con poliHEMA o bien sobre una membrana basal reconstituída (EHS), podría deberse a un cambio en la morfología celular y no en la tasa de proliferación.

III.7 - Otros posibles mecanismos regulatorios del gen *Hoxb-7*

Tratando de ahondar aún más en posibles mecanismos de regulación del gen *Hoxb-7*, investigamos el efecto que tendría sobre los niveles de ARNm de este gen, el agregado de membrana basal exógena (EHS) disuelta en el medio de cultivo sobre células previamente adheridas y esparcidas sobre plástico o bien agrupadas y en suspensión sobre placas recubiertas con poliHEMA.

Experimentos realizados previamente en el laboratorio indicaban que el agregado de 1% de EHS disuelta en el medio de cultivo inducía el redondeamiento celular y la compactación de agregados multicelulares con la subsecuente expresión de β -caseína, en presencia de hormonas lactogénicas (Roskelley et al., 1994; figura 29)

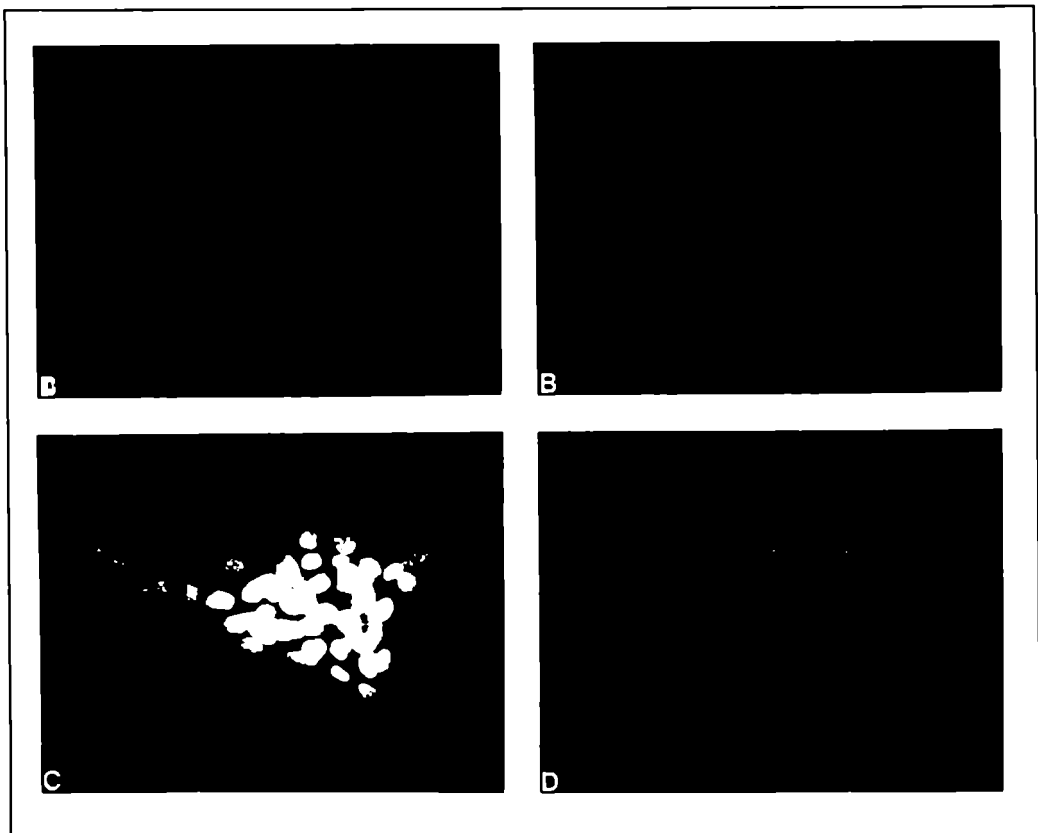


Figura 29.

Expresión de β -caseína en células SCp2 cultivadas sobre plástico para cultivo, en presencia de hormonas lactogénicas y con o sin agregado de 1% de membrana basal/EHS disuelta en el medio de cultivo, durante 5 días.

Los núcleos fueron teñidos con colorante de DAPI (A; C) y la proteína β -caseína fue detectada mediante inmunofluorescencia indirecta (rodamina; B; D).

(Foto: Dr. Pierre Desprez. Lawrence Berkeley National Laboratory)

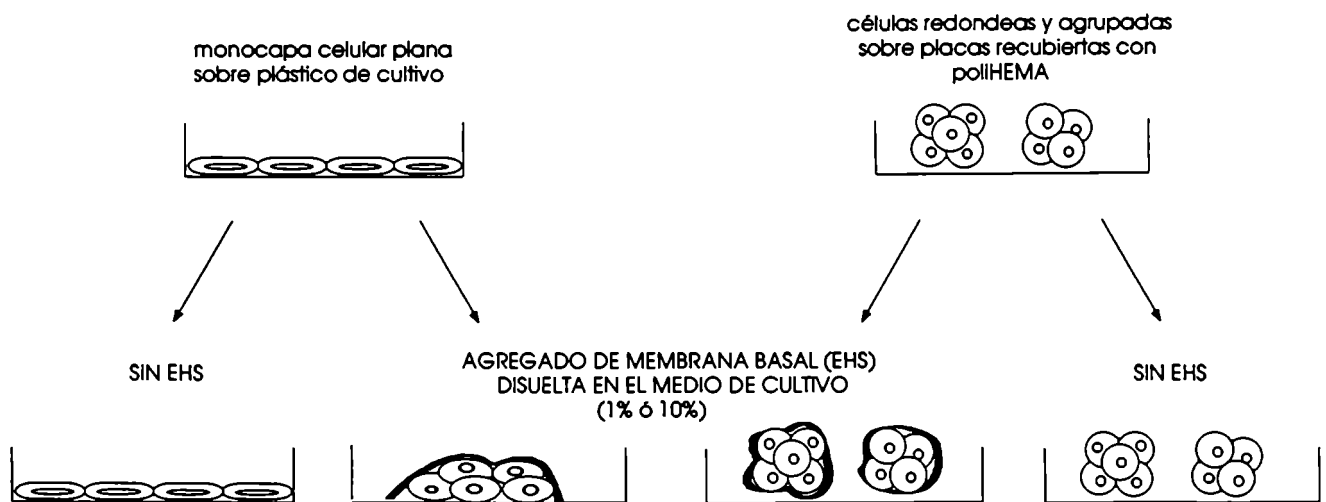


FIGURA 30

Tal como muestra el esquema de la figura 30, células SCp2 fueron plaqueadas sobre plástico o bien sobre placas recubiertas con poliHEMA, como se describe en la sección anterior (III.6). Luego de 24 horas, el medio fue cambiado por medio fresco libre de suero, con hormonas lactogénicas, con o sin EHS. Se utilizaron separadamente dos concentraciones de EHS diferentes, 1% y 10% v/v. La concentración menor fue elegida en base a los datos experimentales existentes en el laboratorio y descriptos anteriormente mientras que la concentración mayor de EHS fue elegida con el propósito de utilizar la misma cantidad de preparación que era utilizada para cubrir las placas en los experimentos en los que este material fue usado como sustrato en forma de gel.

La figura 31 muestra la morfología adoptada por las células al ser cultivadas en las condiciones mencionadas.

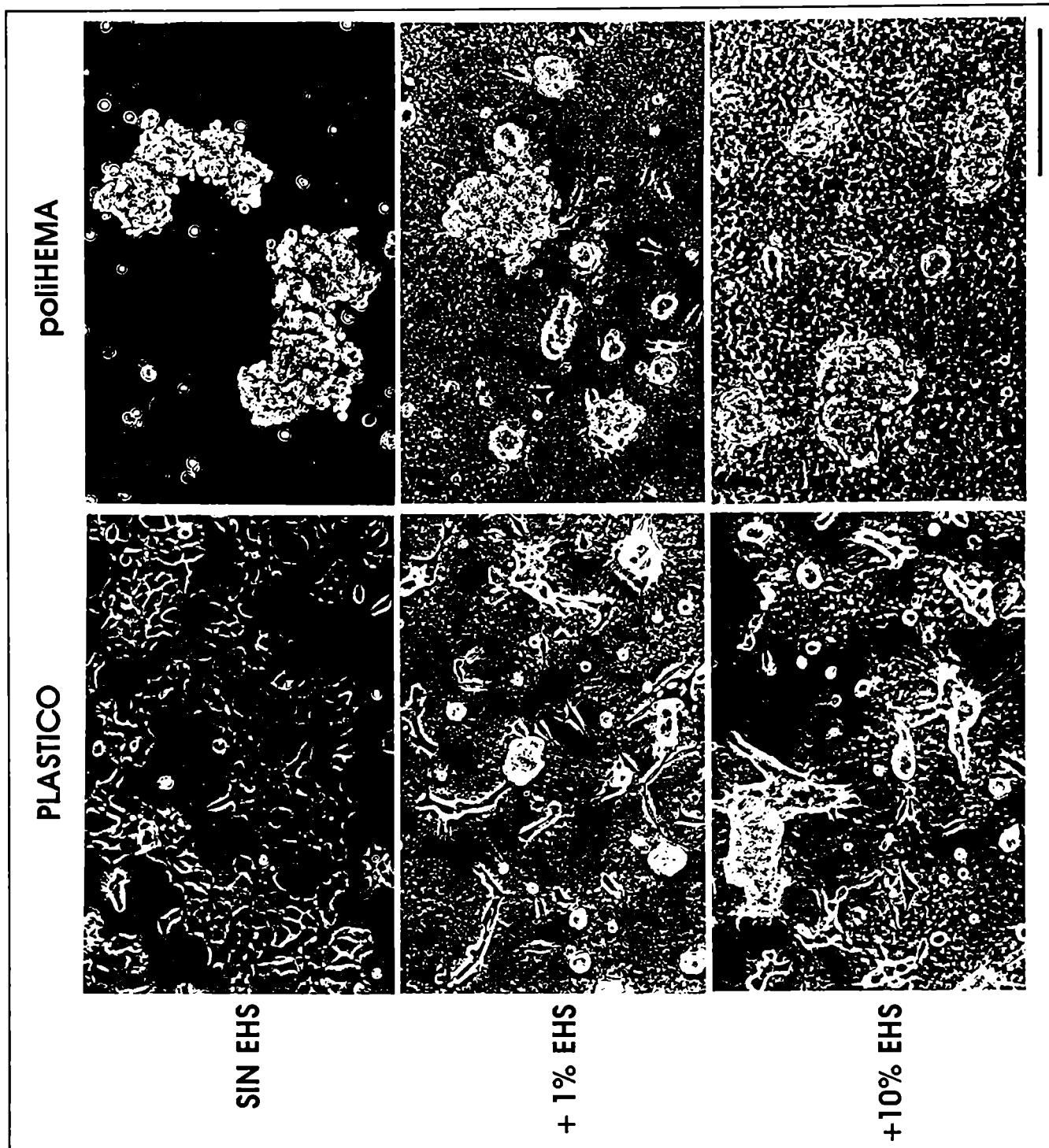


FIGURA 31.

Células SCp2 cultivadas sobre plástico (a; c; e) o sobre poliHEMA (b; d; f), sin EHS (a; b) o con EHS disuelta en el medio de cultivo (c; d; e; f) en las concentraciones indicadas.

Barra= 200 μ m

ARN total fue extraído luego de 48 horas después del agregado de medio con o sin EHS y los niveles de ARNm correspondientes al gen *Hoxb-7* fueron evaluados mediante ensayos de Northern blot (figura 32). Simultáneamente se evaluó la expresión del gen *Hoxa-1* para las mismas condiciones de cultivo.

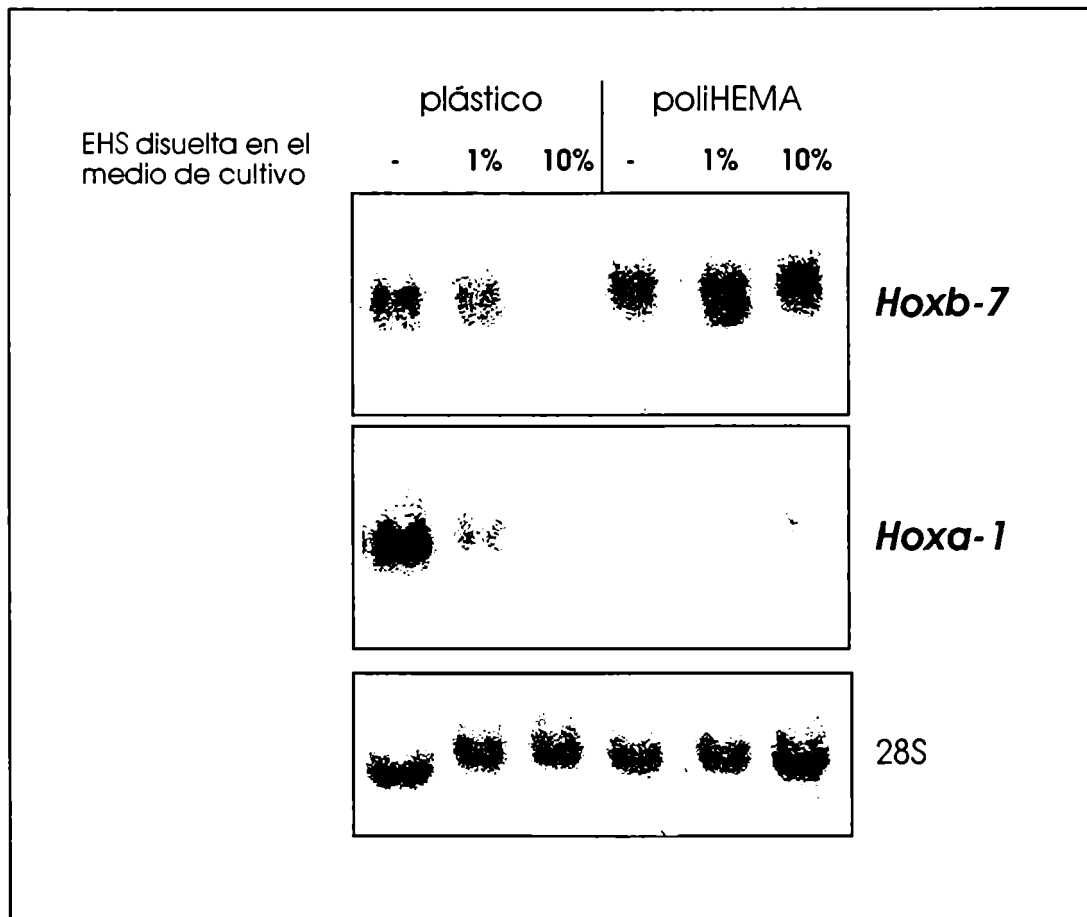


FIGURA 32.

Detección de ARN mensajero de *Hoxb-7* y *Hoxa-1*.

La misma membrana fue hibridada consecutivamente con sondas para *Hoxb-7*; *Hoxa-1* y ARN ribosomal 28S.

Las 3 calles de la izquierda provienen de células cultivadas sobre plástico (con o sin agregado de EHS en el medio), mientras que las 3 calles de la derecha provienen de células cultivadas sobre placas recubiertas con poliHEMA (con o sin agregado de EHS).

El agregado de 1% de EHS no tuvo efecto sobre la expresión del gen *Hoxb-7* comparado con los niveles observados en células sobre plástico de cultivo. Por otra parte, cuando se adicionó 10% de EHS sobre células adheridas y esparcidas sobre plástico se pudo observar una notable disminución de los niveles de transcritos del gen *Hoxb-7* y contrariamente, no tuvo este efecto cuando se adicionó a células previamente redondeadas y agrupadas sobre placas recubiertas con poliHEMA. Este resultado indica por un lado que la regulación del gen *Hoxb-7* por matriz extracelular es un fenómeno dosis-dependiente pero al mismo tiempo y aún más importante, que la mera presencia de material de membrana basal (EHS) no es suficiente para disminuir la expresión de este gen sino que además se requiere que las células se encuentren en un estado conformacional determinado.

A diferencia de lo observado para el gen *Hoxb-7*, el agregado de 1% de EHS sobre células adheridas y esparcidas sobre plástico causó una disminución de los niveles de ARN mensajero del gen *Hoxa-1*, indicando que el cambio conformacional sufrido por las células tratadas con 1% de EHS disuelta en el medio es suficiente para modular negativamente la expresión de este gen. Por otro lado, el agregado de EHS a células previamente sembradas sobre placas recubiertas con poliHEMA no modificó la disminución de los transcritos de este mismo gen ya observada y descrita en la sección III.5.

III.8 - Expresión de *Hoxa-1* en tumores mamarios

En el laboratorio de la Dra. Bissell se generaron y caracterizaron ratones transgénicos que expresan en el epitelio mamario una isoforma auto-activable de la metaloproteinasa de matriz extracelular estromalisina-1(SL-1) bajo la regulación del promotor del gen WAP (Simpson et al.,1994). Como se menciona

en la introducción sección I.1b, las glándulas mamarias de las hembras transgénicas presentan una disrupción anormal de la membrana basal, una alteración del desarrollo funcional y morfológico de esta glándula (Thomasset et al., enviado), y una alta incidencia de tumores mamarios (Sympson et al., 1995). Estas observaciones conjuntamente con resultados previos que mostraban expresión del gen *Hoxa-1* en diversos adenocarcinomas mamarios surgidos a partir de nódulos hiperplásicos premalignos (Friedmann et al., 1994), nos condujeron a analizar la expresión de dicho gen en diferentes hiperplasias y tumores mamarios originados en los mencionados ratones transgénicos. La figura 33 muestra algunas de las anomalías observadas en las glándulas mamarias de estos animales.

FIGURA 33. (página siguiente)

(A) Glándulas mamarias enteras ("whole mounts") teñidas con rojo carmín.

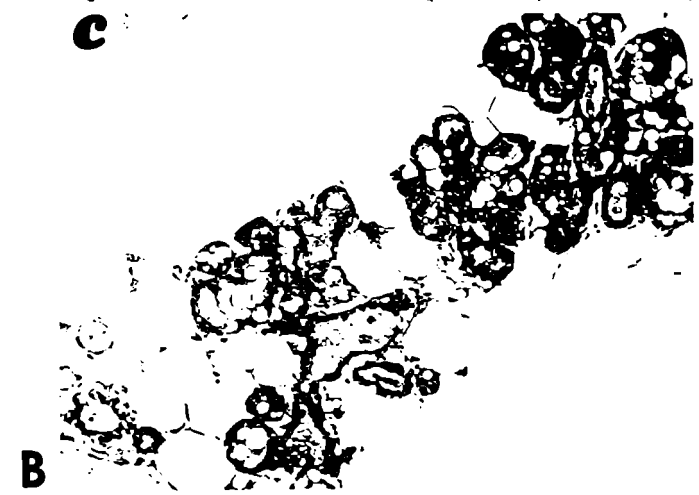
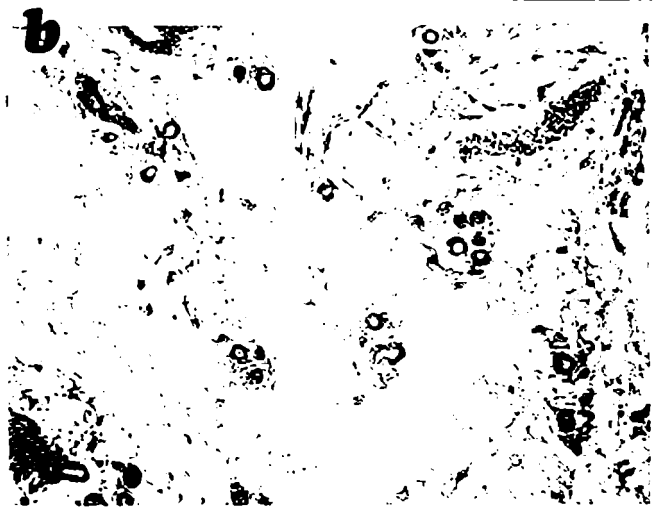
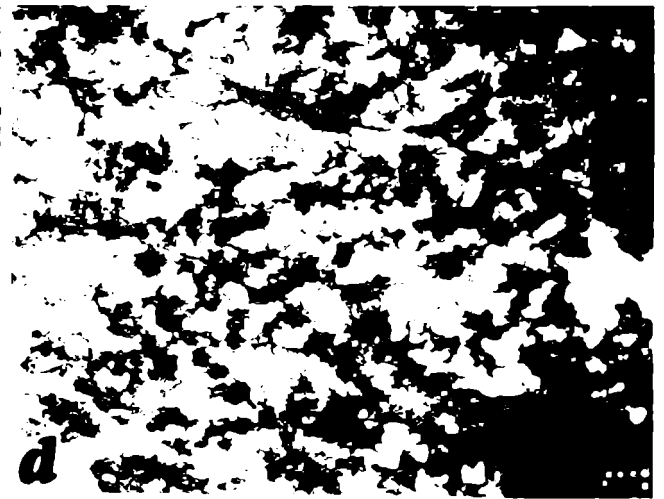
(a), glándula normal de hembra "wild-type" (no transgénica) en estadio de reposo (post-lactancia). (b-d.), glándulas anómalas provenientes de hembras transgénicas WAP-ST-1. (b), región hiperplásica y displásica (izquierda) adyacente a un adenocarcinoma (flecha). (c), nódulo alveolar hiperplásico ("HAN"; flecha), de tamaño similar al nódulo linfático central (punta de flecha). (d), hiperplasia moderada con ductos dilatados.

(B) Cortes de glándula mamaria teñidos con hematoxilina/eosina.

(a), glándula normal de hembra "wild-type" (no transgénica) en estadio de reposo (post-lactancia). (b-d), glándulas anómalas provenientes de hembras transgénicas WAP-ST-1. (b), fibrosis periductal e hiperplasia intraductal. (c), nódulo alveolar hiperplásico con vacuolización. (d), carcinoma ductal in situ con infiltraciones linfocíticas periductales.



A
c
a



B

Se preparó ARN total a partir de trozos de tejido mamario "anómalo" y el mismo fue analizado mediante ensayos de Northern blot. Se analizaron de esta manera diversas hiperplasias y carcinomas. De un total de 8 muestras diferentes analizadas, sólo una de ellas, correspondiente a un adenocarcinoma metastásico, resultó ser positiva para la expresión del gen *Hoxa-1* (figura 34).

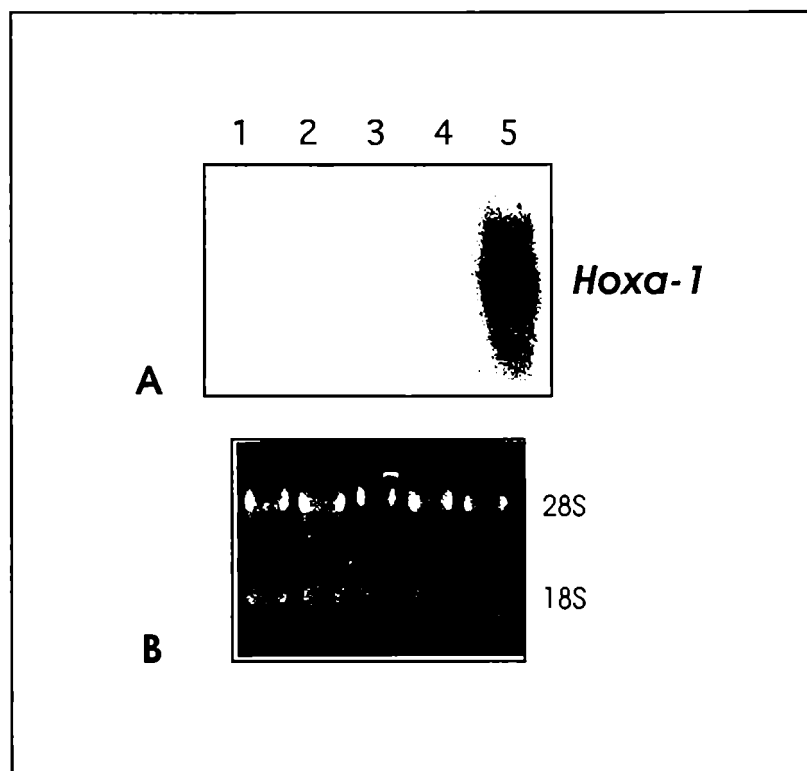


Figura 34.

(A). Se observan 4 de las 7 muestras de tejido mamario anómalo que resultaron negativas para la expresión de *Hoxa-1* (calles 1 a 4), junto con la única muestra positiva para la expresión de dicho gen (calle 5).
Calles 1-3: hiperplasias
Calles 4-5: carcinomas

(B). Se observan las bandas de ARN ribosomal 28 y 18S teñido con bromuro de etidio en el gel correspondiente al Northern blot del panel (A)..

III.9 - Expresión de *Hoxa-1* y *Hoxb-7* en cultivo de células tumorales mamarias

Células epiteliales aisladas del adenocarcinoma mamario positivo para la expresión de *Hoxa-1* descrito en la sección anterior fueron establecidas en cultivo (línea tumoral "TCL-1") y mostraron ser altamente tumorigénicas cuando se las inyectó subcutáneamente en ratones atímicos "nude". Por otra parte, estas células resultaron profundamente invasivas en ensayos de migración a través de geles de matriz extracelular (Lochter et al., 1997). Es importante destacar que si bien las células TCL-1 forman estructuras multicelulares tridimensionales, no son capaces de diferenciarse funcionalmente cuando se cultivan sobre una membrana basal reconstituida, aún en presencia de hormonas lactogénicas (Lochter et al., 1997).

Por todo esto, nos propusimos analizar el patrón de expresión de los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7* en las células TCL-1 cultivada en las condiciones hasta ahora utilizadas para los estudios realizados en las líneas celulares provenientes de glándulas mamarias normales (CID-9 y SCp2).

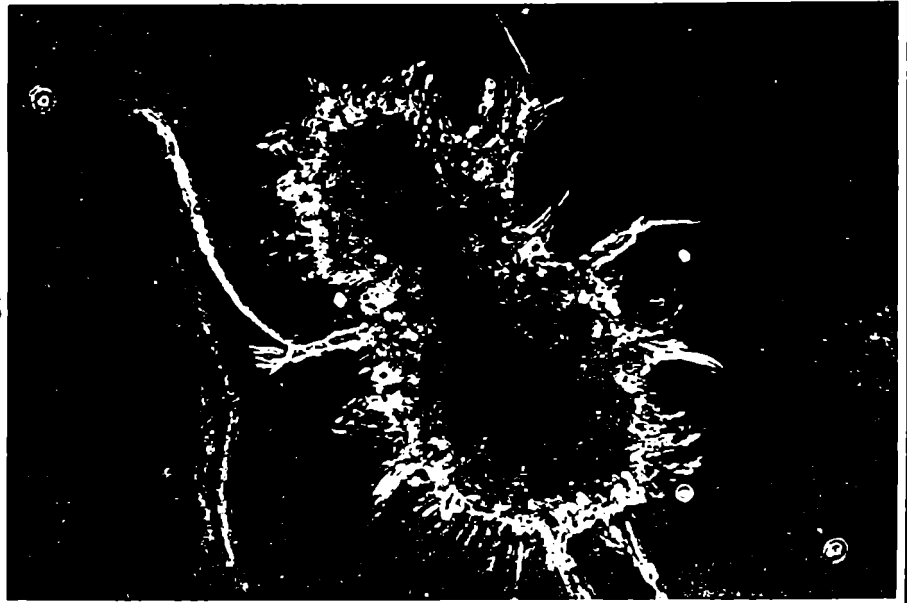
Células TCL-1 fueron cultivadas sobre plástico de cultivo, sobre una membrana basal reconstituída (EHS), o bien sobre placas recubiertas con poliHEMA (figura 35).

FIGURA 35. (página siguiente)

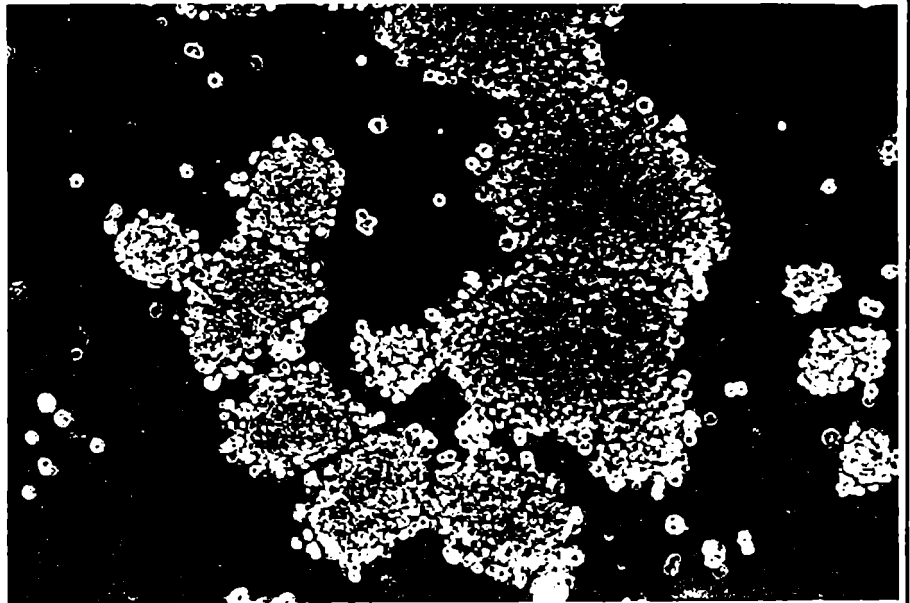
Células TCL-1 cultivadas durante 2 días en las condiciones indicadas en cada caso.

Barra= 200 μ m

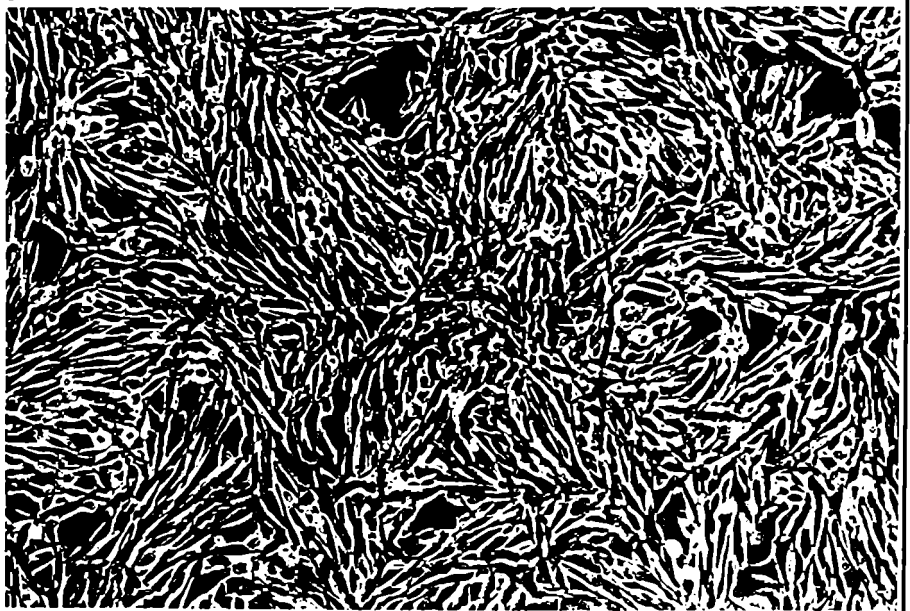
matriz EHS



poliHEMA



PLASTICO



Se extrajo ARN total a distintos tiempos luego del momento de plaqueo y se lo analizó mediante ensayos de Northern blot.

Se observó que los niveles de ARNm de *Hoxa-1* resultaron levemente más elevados en las células de la línea tumoral TCL-1 que en las líneas "funcionales" CID-9 y/o SCp2, cultivadas sobre plástico. Por otra parte, los niveles de transcripto del gen *Hoxb-7* mostraron el patrón opuesto, siendo más altos en células de las líneas CID-9 y SCp2 que en TCL-1 donde resultan casi indetectables. Esto último dificulta cualquier posterior análisis acerca de la regulación del gen *Hoxb-7* en células TCL-1 (figura 36).

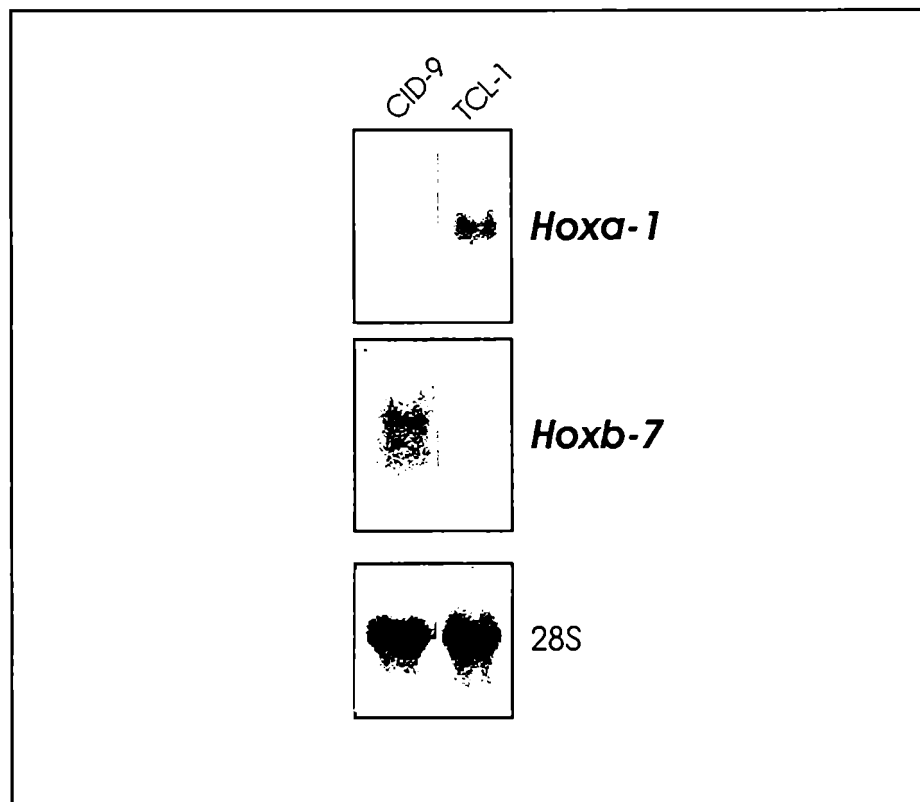


FIGURA 36.

Detección de ARN mensajero de *Hoxa-1* y *Hoxb-7* en muestras de ARN total provenientes de células CID-9 y TCL-1 cultivadas sobre plástico en presencia de hormonas lactogénicas.

En oposición a lo observado anteriormente para las dos líneas celulares funcionales CID-9 y SCp2, los niveles de ARNm correspondientes al gen *Hoxa-1* en células TCL-1 no se ven regulados negativamente por la presencia de una membrana basal reconstituída ni tampoco por un cambio en la morfología celular (figura 37). Los resultados obtenidos fueron similares para los distintos tiempos de cultivo analizados.

FIGURA 37. (página siguiente)

(A). Detección de ARN mensajero de *Hoxa-1* en muestras de ARN total de células TCL-1 cultivadas sobre EHS, sobre placas recubiertas con poliHEMA o sobre plástico. La misma membrana fue hibridada con sondas para *Hoxa-1* y para ARN ribosomal 28S.

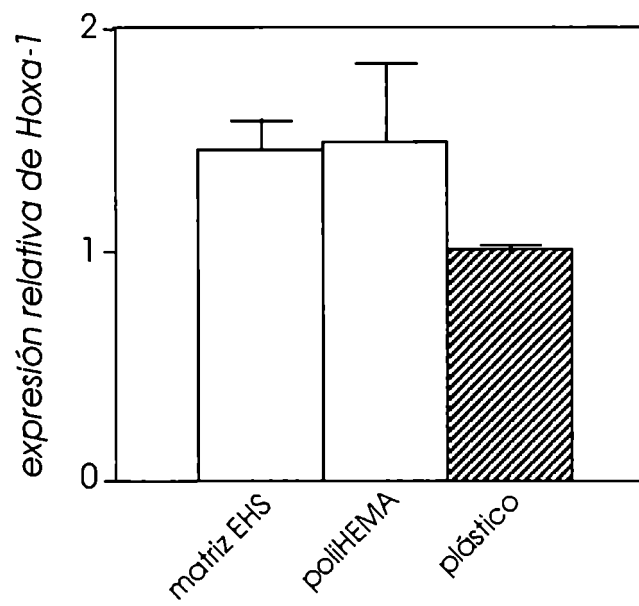
(B) Valores de expresión relativa de *Hoxa-1* en células TCL-1 cultivadas como se indica en (A).

Las bandas de ARNm de *Hoxa-1* fueron cuantificadas densitométricamente y normalizadas con los valores de las bandas de ARNr 28S respectivas. Los datos graficados son el promedio de al menos 3 experimentos independientes con sus correspondientes desviaciones estándar.

A



B



IV. Discusión

En este trabajo se investigó la posible participación de los genes homeóticos en la regulación de la diferenciación morfológica y funcional de células mamarias y su interacción regulatoria con la matriz extracelular. Ensayos de "RT-PCR" nos permitieron inicialmente conocer qué genes homeóticos se expresan en dichas células y en base a ello llevar a cabo una profunda caracterización de los patrones de expresión de los mismos en células mamarias en cultivo y en la glándula mamaria murina *in vivo*.

La expresión y regulación de *Hoxa-1* y *Hoxb-7* fueron el eje para el desarrollo de esta tesis, pudiéndose concluir que los mismos presentan patrones de expresión y mecanismos regulatorios diferentes y característicos sugiriendo que estos genes podrían ejercer un papel funcional en el desarrollo del tejido mamario.

Diversos motivos nos condujeron a la elección de estos dos genes dentro de los 5 genes *Hox* cuya expresión fue detectada por "RT-PCR": 1) Daniel y colaboradores (comunicación personal y posterior publicación, Friedmann et al., 1994) describieron la expresión de *Hoxa-1* en adenocarcinomas mamarios generados espontáneamente mediante el trasplante sucesivo de nódulos hiperplásicos premalignos (Hyperplastic Alveolar Nodules "HANs"; DeOme et al., 1959) pero no habían detectado la expresión de este gen en ningún estadio del desarrollo normal de la glándula como tampoco en los nódulos premalignos o HANs. De esta manera, nos resultó interesante investigar la expresión de este gen en células mamarias "funcionalmente normales" y tumorales así como también los posibles mecanismos regulatorios de dicha expresión; 2) la alta frecuencia de clonado del fragmento correspondiente al gen *Hoxb-7* (ver figura 16), que podría indicar una expresión abundante de dicho gen en las células estudiadas, junto con la falta de información sobre la expresión del mismo en tejido mamario nos incitó al estudio de su expresión y regulación.

Mediante la utilización de dos líneas celulares mamarias funcionales (CID-9 Y SCp2) cultivadas en diferentes condiciones investigamos diversas señales

provenientes del microambiente o entorno celular que resultaron estar involucradas en la regulación de los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7*. Dichas señales regulatorias no podrían ser fácilmente estudiadas *in vivo*. Utilizando un sustrato antiadhesivo (figuras 25 y 26) y por otro lado variando las concentraciones de insulina del medio de cultivo (figuras 27 y 28) observamos que un cambio de morfología celular es condición suficiente para reducir los niveles de ARNm de *Hoxa-1* ; también descartamos la posibilidad de que dicha reducción pudiese ser consecuencia de una inhibición de la proliferación celular. Sin embargo, como se observa en la figura 26, un cambio morfológico no es suficiente para regular negativamente la expresión del gen *Hoxb-7*. En este caso es absolutamente necesaria la presencia de membrana basal (figura 23). Este efecto podría ser atribuido a una señal específica generada por un determinado ligando de la matriz extracelular presente en las preparaciones de EHS, una modulación de los factores de crecimiento producido por las células y mediada por la matriz (Streuli et al., 1993; Lin et al., 1995), o bien a la adquisición de polaridad celular y/o de una estructura tridimensional polarizada que se observa únicamente cuando las células son plaqueadas sobre un sustrato maleable. Para tratar de discernir entre alguna de estas posibilidades utilizamos otra metodología de cultivo, modificada de un ensayo desarrollado originalmente para cultivos de hepatocitos (Caron, 1990), la cual consiste en el agregado de material de membrana basal disuelto en el medio de cultivo en vez de su utilización como sustrato. Como se observa en la figura 29, este tratamiento realizado sobre células previamente adheridas y esparcidas sobre plástico induce la expresión de β -caseína (Roskelley et al., 1994; Desprez et al., 1995) y también modula negativamente la expresión de *Hoxb-7* (figura 32). Sin embargo, cuando el mismo es efectuado sobre células previamente agrupadas y en suspensión sobre placas recubiertas con poliHEMA, no se observa inhibición del gen homeótico *Hoxb-7* (figura 32), si bien persiste la inducción de la expresión de β -caseína y ésta ocurre aún más rápidamente que en las condiciones anteriores (Roskelley y Bissell, 1995). La

supresión de la expresión del gen *Hoxb-7* podría entonces estar relacionada directa o indirectamente con un cambio en la polaridad celular y una reorganización de la citoestructura debida a la interacción de las células con componentes de la membrana basal. Dicha modificación o reorganización, no ocurriría en el caso de las células cultivadas sobre placas recubiertas con poliHEMA, tal vez por una predominancia de las interacciones célula-célula sobre las interacciones célula-matriz extracelular, o bien por cierta rigidez de estos agregados celulares tridimensionales. Esta rigidez impediría cualquier posterior modificación estructural de dichos agregados multicelulares. Sabemos que cuando las células son inicialmente agrupadas sobre poliHEMA, el agregado de membrana basal no afecta la morfología celular ni nuclear, así como tampoco la localización de los filamentos de actina (Roskelley et al., 1994; Desprez y Roskelley, comunicacion personal). Sería también posible suponer que la conformación adoptada por las células sobre poliHEMA, y no así aquella adoptada sobre plástico, estuviese enmascarando el receptor necesario para la interacción de las células con algún componente de la preparación de membrana basal, encargado de disparar las señales regulatorias de *Hoxb-7*, o bien impidiendo la interacción entre determinadas moléculas transductoras de dichas señales. Aún queda por descubrir el verdadero mecanismo responsable de esta regulación.

Diversos investigadores demostraron que señales provenientes de la matriz extracelular pueden modular la actividad de diferentes factores de transcripción. Entre ellos Id-1, una proteína que contiene un motivo de "helix-loop-helix" y cuya presencia impide la diferenciación de células epiteliales mamarias SCp2 en cultivo (Desprez et al., 1995), y HNF3a, una proteína nuclear enriquecida en células hepáticas que induce la expresión del gen de albúmina y consecuentemente contribuye a la diferenciación de hepatocitos (DiPersio et al., 1991). Es interesante destacar que la proteína HNF3a contiene un homeodominio y está codificada por un gen homólogo al

gen homeótico *fork head* de *Drosophila* (Lai et al., 1991). Como se muestra en esta tesis, nuestros resultados indican que señales provenientes de la matriz extracelular están también involucradas en la regulación de algunos miembros del complejo génico Hox, en células epiteliales mamarias. Actualmente, sabemos que la presencia de una membrana basal reconstituida también regula negativamente la expresión del gen homeótico HOXD3 en células endoteliales humanas (Boudreau et al., manuscrito enviado al Journal of Cell Biology para su publicación).

Por otra parte, Suh y Traber (1996) demostraron que la sobreexpresión del gen homeótico Cdx-2 por medio de transfección estable de una línea celular de epitelio intestinal de rata (IEC-6) conduce a la diferenciación morfológica y a la expresión de genes específicos de enterocitos diferenciados, no expresados por las células transfectadas con vectores control. Concomitantemente se observa la deposición de una gruesa membrana basal endógena bajo el epitelio columnar formado por las células que sobreexpresan Cdx-2. Datos previos indican también que esta misma línea celular es capaz de diferenciarse tanto morfológica como funcionalmente cuando es cultivada sobre una membrana basal reconstituida (EHS/matrigel) (Carroll et al., 1988). Estos datos aportan más evidencias acerca de una posible interacción entre la matriz extracelular y los genes homeóticos, la cual estaría involucrada en la regulación de los procesos de diferenciación celular.

Es posible establecer un paralelismo entre la regulación de los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7* en células mamarias CID-9 y SCp2 y los patrones de expresión de varias proteínas de la leche estudiados en el laboratorio de la Dra. Bissell. Como se describió en la introducción, el fenotipo "lactante" completo es adquirido mediante una jerarquía de señales provenientes de la membrana basal (Roskelley et al., 1995). Un cambio en la morfología celular (redondeamiento) en ausencia de señales específicas proveniente de la matriz extracelular es suficiente para inducir la expresión de

lactoferrina (Roskelley et al., 1994; Close et al., 1994) y al mismo tiempo para suprimir la expresión de *Hoxa-1*, tal como se muestra en este trabajo. Interacciones específicas entre componentes de la matriz extracelular y sus receptores en la superficie celular son además requeridas para la inducción de β -caseína mientras que señales adicionales asociadas con la formación de uniones intercelulares, la adquisición de polaridad y organización tridimensional son necesarias para la inducción de la proteína "WAP". Según los resultados presentados en esta tesis (figuras 23; 26 y 32), la regulación negativa de *Hoxb -7* parecería tener requerimientos en común con la inducción de la expresión de β -caseína y "WAP".

Dado que las proteínas homeóticas interactúan con el ADN regulando la expresión de otros genes, resulta importante conocer cuáles son dichos genes "blanco". Aún se desconoce si las proteínas homeóticas ejercen su acción sobre un pequeño grupo de genes "maestros" que serían los disparadores de una cascada regulatoria o bien directamente modulan un gran número de genes "housekeeping" o estructurales. Existen datos experimentales que sugieren que las proteínas homeóticas regulan la expresión de otros genes homeóticos y factores de transcripción, proteínas de adhesión celular o "CAMs", proteínas de interacción célula-matriz extracelular y también factores de crecimiento (Edelman and Jones, 1993; Care et al., 1996). Jones y colaboradores (1992, 1993) describieron que *Hoxc-6*, *Hoxb-8* y *Hoxb-9* regulan la actividad del promotor de N-CAM en ensayos de cotransfección de células NIH 3T3. El "enhancer" del gen de L-CAM, una molécula de adhesión celular de la familia de las cadherinas y específica de hígado, es modulado por la proteína homeótica HOXD9 y HNF-1, una proteína perteneciente a la clase de proteínas homeóticas "pou" involucrada en la diferenciación hepática (Goomer et al., 1994). *Evx-1*, una proteína homeótica no perteneciente al complejo Hox, activa el promotor del gen de citotactina o tenascina (Jones et al., 1992). Por otro lado, la sobreexpresión de *HOXD3* (*HOX4A*)

altera las propiedades adhesivas de células de eritroleucemia humana (HEL), concomitantemente con un aumento en la expresión de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Taniguchi et al., 1995).

Recientemente, Colombo y colaboradores observaron que altos niveles de expresión de *HOXB7* se correlacionan con altos niveles de expresión del factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) en melanocitos epidérmicos humanos en proliferación, mientras que los ARNm de ambos genes no se detectan en melanocitos dérmicos quiescentes y sufren una severa regulación negativa cuando cultivos primarios de melanocitos son arrestados en G0/G1 del ciclo celular (Care et al., 1996). En el mismo trabajo demostraron que *HOXB7* regula positivamente la actividad del promotor de bFGF. Por otra parte, datos obtenidos en el laboratorio de la Dra. Bissell demostraron que la expresión de varios factores de crecimiento es regulada por el sustrato sobre el cual las células epiteliales mamarias son cultivadas. Células cultivadas sobre plástico expresan altos niveles de los factores de crecimiento transformante $\text{TGF}\beta\text{-1}$ y $\text{TGF}\alpha$. Sustratos maleables como geles "flotantes" de colágeno tipo I o bien una membrana basal reconstituida (EHS) suprimen la expresión de $\text{TGF}\beta\text{-1}$ (Streuli et al., 1993) mientras que únicamente una membrana basal reconstituída, en condiciones nativas, es capaz de inhibir la expresión de $\text{TGF}\alpha$ (Chen and Bissell, 1989; Lin et al., 1995). A su vez, ambos factores de crecimiento, $\text{TGF}\beta\text{-1}$ y $\text{TGF}\alpha$, inhiben la síntesis de proteínas de la leche en células epiteliales mamarias en cultivo, interfiriendo con la diferenciación celular.

Estos datos, junto con los descritos por Colombo y colaboradores, permiten especular que los altos niveles de expresión de *Hoxb-7* observados en células CID-9 y SCp2 en ausencia de membrana basal (figura 23) podrían ejercer una acción estimuladora sobre la expresión de bFGF u otro factor de crecimiento, dando como resultado la perpetuación de un fenotipo de tipo proliferativo; por el contrario, la regulación negativa de *Hoxb-7* en presencia de EHS, inhibiría la expresión de bFGF o

del factor de crecimiento en cuestión generando así condiciones permisivas para la diferenciación celular. Por otra parte, Neilson y colaboradores demostraron que el factor de crecimiento epidermal (EGF) estimula la expresión de *Hoxb-7* en cultivos de células del epitelio tubular proximal murino (Wolf et al., 1991). Esto permitiría imaginar la situación inversa a la planteada anteriormente, en donde niveles elevados de factores de crecimiento presentes en células mamarias cultivadas en ausencia de matriz extracelular serían los responsables de mantener una elevada expresión de *Hoxb-7*, mientras que la disminución de dichos factores en respuesta a una membrana basal inhibiría la expresión de dicho gen homeótico.

Consistentemente con estas dos hipótesis planteadas, es interesante mencionar el caso del gen *decapentaplegic (dpp)* de *Drosophila*, el cual codifica para un miembro de la super familia de proteínas de TGF- β (Panganiban et al., 1990a). Hoffman y colaboradores (Panganiban et al., 1990b) demostraron que *dpp* regula la expresión de genes homeóticos durante la morfogénesis del intestino medio. Además *dpp* está directamente regulado por *Ultrabithorax* y *Abdominal A*, dos genes del complejo HOM de *Drosophila* (Reuter et al., 1990; Capovilla et al., 1994; Hursh et al., 1993). De esta manera, resulta posible suponer la existencia de una red regulatoria bi-direccional entre los factores de crecimiento y los genes homeóticos en la glándula mamaria . En relación a esta hipótesis, Daniel y colaboradores realizaron experimentos en los cuales aumentaron los niveles de TGF β 1 en la glándula mamaria de ratones hembra púberes mediante implantes locales y luego evaluaron el efecto sobre la expresión de los genes homeóticos *Hoxd-8*; *Hoxd-9*; *Hoxc-6* y *Hoxa-1* (Y. Friedmann, 1995, tesis doctoral, Universidad de California, Santa Cruz. California- U.S.A). Ninguno de los genes mencionados mostró niveles de expresión diferentes en las glándulas tratadas en comparación con glándulas control. Por supuesto, quedaría aún por establecer si la regulación inversa existe y al mismo tiempo qué sucede con otros factores de crecimiento y otros genes homeóticos no estudiados por estos investigadores.

Los datos presentados en la figura 20, nos permiten concluir que la expresión de *Hoxb-7* en la glándula mamaria *in vivo* es regulada a lo largo de los distintos estadios de desarrollo de la misma. Se expresa mayoritariamente en estadio de glándula virgen y en involución, mientras que los niveles de ARNm decrecen durante la preñez y se vuelven prácticamente indetectables durante la lactancia. Dado que la glándula mamaria sufre una intensa remodelación durante la involución, es razonable especular que *Hoxb-7* podría desempeñar alguna función en el reestablecimiento de las ramificaciones ductales. Esta hipótesis sería consistente con la expresión de este gen homeótico en las glándulas de hembras vírgenes.

Los resultados obtenidos en cultivo, que indican que la expresión de *Hoxb-7* es suprimida por la presencia de matriz extracelular del tipo membrana basal, son consistentes con el fenotipo "lactante" adquirido por las células bajo estas condiciones (Aggeler et al., 1991). Más aún, la expresión de *Hoxb-7* en células plaqueadas sobre plástico es consistente con el fenotipo "involutivo" de las mismas: células mamarias sobre plástico sufren apoptosis (Boudreau et al., 1995), expresan poco o no expresan proteínas de la leche, expresan tenascina (Jones et al., 1995) y como se describe en este trabajo, expresan *Hoxb-7*. Debido a que células mamarias sobre plástico en presencia de hormonas lactogénicas se asemejan a glándulas de hembras vírgenes o en estadios de involución, ya que expresan niveles elevados del gen *Hoxb-7*, es claro que las hormonas por sí solas no son las responsables de la regulación observada de este gen. Más aún, el tratamiento de células SCp2 sobre plástico con distintas combinaciones de hormonas (insulina; insulina + prolactina; insulina + hidrocortisona; insulina + hidrocortisona + prolactina) no produjo diferencias significativas en los niveles de expresión del gen *Hoxb-7* (datos no mostrados).

En relación a una posible acción regulatoria hormonal sobre los genes homeóticos resulta interesante mencionar los datos aportados por Friedmann y colaboradores (1994; 1996) quienes describieron que hormonas esteroideas ováricas regulan

negativamente la expresión del gen *Hoxc-6* y por otro lado, el estrógeno en particular ejerce una acción positiva sobre la expresión del gen homeótico *Msx-2* en la glándula mamaria murina.

El hecho de que la glándula mamaria de hembras vírgenes exprese *Hoxb-7*, a pesar de que se encuentra rodeada por una membrana basal claramente distinguible, indica una diferencia en la composición y estructura de la matriz extracelular y/o la presencia de otros reguladores existentes en el microambiente de la glándula de ratones hembra vírgenes en comparación con la glándula de lactantes .

Dos transcritos diferentes del gen *Hoxb-7* (1,6 y 1,4 kb respectivamente) fueron detectados en células CID-9 y SCp2 en cultivo, mientras que sólo uno de ellos (1,6 kb) se observó en tejido mamario. El fenómeno de "splicing" o procesamiento alternativo fue descrito ya para diversos genes homeóticos incluidos muchos pertenecientes al complejo Hox (López, 1995). El gen *Hoxb-7* murino contiene un único intrón de aproximadamente 2,2 kb (Meijlink et al., 1987), por lo tanto es posible suponer que los diferentes transcritos se originen por una iniciación en promotores alternativos o bien por sitios alternativos de poliadenilación. Si bien la expresión de diferentes transcritos correspondientes al gen *Hoxb-7* fue observada ya por otros investigadores en fibroblastos murinos, líneas celulares hematopoyéticas humanas (Kongsuwan et al., 1988), en riñón de ratón adulto (Meijlink et al., 1987), etc., la presencia en células mamarias en cultivo de una isoforma que no se detecta en la glándula *in vivo* es llamativa y es por ello que resultaría interesante ahondar en su investigación con el propósito de entender su significado biológico así como también los mecanismos moleculares que regulan la expresión de ambas especies de ARN mensajeros.

Los ensayos de Northern blot realizados a partir de muestras de ARN total de glándula mamaria no nos permitieron detectar la expresión de *Hoxa-1* en ningún

estadio del desarrollo de la misma. La falta de expresión de este gen en tejido mamario normal ha sido también descrita por Friedmann y colaboradores (1994). Estos investigadores también mostraron la ausencia de ARNm de dicho gen en nódulos hiperplásicos mamaros premalignos (HANs) en oposición a una expresión elevada en adenocarcinomas mamaros surgidos espontáneamente del trasplante consecutivo de dichos nódulos. De esta manera, la expresión de *Hoxa-1* en cultivos de células "funcionalmente normales", tal como se describe en esta tesis, es sorprendente y sugeriría que bajo estas circunstancias ciertas moléculas regulatorias supresoras de la expresión de dicho gen estarían ausentes. Por otra parte, también analizamos algunas hiperplasias severas y diversos tipos de tumores mamaros, todos originados como se detalló anteriormente en ratones hembra transgénicos para el gen SL-1 y encontramos que sólo una muestra, correspondiente a un adenocarcinoma mamario, resultó ser positiva para la expresión de *Hoxa-1*. Sabemos que células (TCL1) provenientes de dicho adenocarcinoma son altamente invasivas (Lochter et al., 1997) pero no conocemos el comportamiento de los otros tumores estudiados ni de aquellos estudiados por Friedmann y colaboradores. De esta manera aún queda por investigar la existencia de una posible correlación entre la expresión de *Hoxa-1* y un fenotipo tumoral invasivo.

El hecho de que células epiteliales en cultivo también expresen *Hoxa-1* cuando el epitelio normal mamario no lo hace *in vivo* podría correlacionarse con el microambiente "anormal" o no fisiológico que representa el plástico de cultivo para dichas células. Por otra parte, estos resultados indican que la expresión de *Hoxa-1* no está restringida exclusivamente a un fenotipo maligno ya que células SCp2 no desarrollan tumores cuando son inyectadas en ratones atímicos "nude" (Gallosy, Desprez and Bissell, comunicación personal) y sin embargo expresan *Hoxa-1* en ciertas condiciones de cultivo. Como se describió anteriormente, estas células regulan negativamente la expresión de este gen frente a un cambio en la morfología celular ya

sea mediado por la presencia de material de membrana basal o bien producido por medios mecánicos o artificiales al plaquear la células sobre un sustrato anti-adhesivo. Esta expresión regulada contrasta con la falta de regulación que observamos en células tumorales TCL-1 cultivadas en estas mismas condiciones. De esta manera, podría ocurrir que la pérdida de regulación del gen homeótico *Hoxa-1*, mediada por señales provenientes de la matriz extracelular en el caso de células mamarias funcionales, estaría asociada con un fenotipo maligno. Si bien esta posibilidad aún necesita ser estudiada en mayor profundidad, la idea es consistente con el hecho de que células tumorales mamarias humanas y cultivos celulares primarios establecidos a partir de biopsias de tumores mamarios muestran una respuesta anormal al agregado de matriz extracelular exógena (Petersen et al., 1992; Howlett et al., 1995).

PERSPECTIVAS

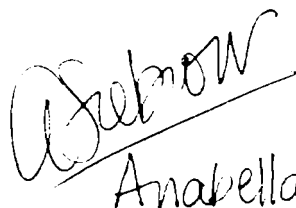
Sin duda, aún quedan por responder muchos interrogantes, sobre todo aquellos relacionados con la función específica de los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7* en el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria como así también en procesos tumorigénicos. La gran cantidad de genes homeóticos existentes hace suponer que muchos otros, no sólo aquellos cuya expresión se estudió en este trabajo, podrían expresarse y cumplir un papel importante en el tejido mamario.

Actualmente se están llevando a cabo experimentos de transfección de las diferentes líneas celulares con el objetivo de sobreexpresar los genes estudiados en condiciones de cultivo en las que normalmente se encontrarían reprimidos, o bien inhibir la expresión de los mismos mediante ARNs antisentido en condiciones de cultivo en las cuales la expresión es elevada. Se estudiará inicialmente si existe alguna diferencia a lo largo del proceso de diferenciación morfológica y funcional de las

células transfectadas con construcciones que expresan ARNs "sentido" y "antisentido" de los genes *Hoxa-1* y *Hoxb-7* comparadas contra células transfectadas con "vectores vacíos", sometidas en ambos casos a la influencia de una membrana basal exógena y hormonas lactogénicas. Se estudiarán parámetros morfológicos y también la expresión de diferentes marcadores moleculares. Por otra parte, se evaluará si la sobreexpresión del gen *Hoxa-1* ejerce algún efecto "transformante" sobre células de la línea SCp2, las cuales bajo condiciones normales son incapaces de crecer en agar blando, no atraviesan matriz extracelular en ensayos de invasión y no desarrollan tumores cuando son inyectadas en ratones atímicos "nude".

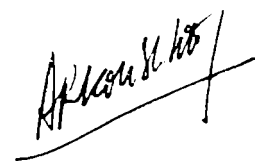
El desarrollo de anticuerpos contra el producto del gen *Hoxb-7* ratón, tal como se describe en Materiales y Métodos (sección II.10), permitirá estudiar su regulación a nivel proteico tanto a lo largo del desarrollo de la glándula mamaria *in vivo*, como así también durante la diferenciación de células mamarias en cultivo. Se podrán realizar detecciones inmunohistoquímicas las cuales permiten la detección simultánea de gran variedad de antígenos y a su vez presentan menor complejidad y variabilidad que la técnica de hibridación *in situ*.

La disponibilidad de líneas celulares mamarias funcionales y la existencia de diferencias en la modulación de genes homeóticos tales como los estudiados en esta tesis podrá ser utilizado para investigar más profundamente la naturaleza de las vías regulatorias tanto "upstream" como "downstream" de los genes *Hox*, constituyendo una herramienta adicional importante para la genética de organismos superiores.


Anabella Srebrow

And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time

T.S. Eliot (1942)



V. Conclusiones

- Se detectó la expresión de 5 genes *Hox* en células mamarias murinas. Estos son: *Hoxa-1*; *Hoxa-5*; *Hoxb-7*; *Hoxb-8* y *Hoxb-9*.
- Expresión y regulación de *Hoxa-1* y *Hoxb-7* fueron estudiadas en diversas líneas celulares mamarias sometidas a diferentes condiciones de cultivo y también durante el proceso de diferenciación de la glándula mamaria murina, estableciéndose patrones de expresión característicos para cada gen.
- El gen *Hoxb-7* presenta una expresión más elevada en el tejido mamario de hembras vírgenes y en estadios de involución, mientras que los niveles disminuyen considerablemente durante la preñez y la lactancia. La expresión del mismo se encuentra localizada preferentemente en el componente epitelial de esta glándula.
- No se detectó expresión del gen *Hoxa-1* en ningún estadio del desarrollo normal de la glándula mamaria pero pudo detectarse en un adenocarcinoma mamario metastásico.
- *Hoxa-1* y *Hoxb-7* se expresan en células epiteliales mamarias "funcionales" cuando las mismas son cultivadas sobre plástico y son regulados negativamente cuando estas células son cultivadas sobre una membrana basal reconstituída.
- Cambios en la morfología celular, ocasionados mediante el cultivo de las células sobre el sustrato anti-adhesivo "poliHEMA", son suficientes para inhibir la expresión del gen *Hoxa-1* en células epiteliales mamarias "funcionales". Esta condición de cultivo no tiene ningún efecto sobre la expresión del gen *Hoxb-7*.
- La expresión del gen *Hoxb-7* es inhibida mediante el uso de membrana basal como sustrato o bien disuelta en el medio de cultivo y agregada a células previamente plaqueadas sobre plástico.
- En células mamarias tumorales, la expresión de *Hoxb-7* es casi indetectable por técnicas de Northern blot y la expresión de *Hoxa-1*, a diferencia de lo que ocurre en las células funcionalmente normales, no es inhibida ni por membrana basal ni por condiciones de cultivo que alteran la citoestructura.

VI. Bibliografía

Aberdam D., Negreanu V., Sachs L. and Blatt C. (1991). The oncogenic potential of an activated Hox-2.4 homeobox gene in mouse fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 11(1): 554-557.

Aggeler, J., Ward, J., Blackie, L. M., Barcellos-Hoff, M. H., Streuli, C.H. and Bissell, M. J. (1991). Cytodifferentiation of mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane reveals striking similarities to development in vivo. *J. of Cell Sci.* 99: 407-417

Ahlgren U., Jonsson J. and Edlund H. (1996). The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122: 1409-1416.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition. Garland Publishing, Inc. New York and London.

Balling, R.; Mutter, G.; Gruss, P. and Kessel, M. (1989). Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression of the homeobox gene Hox 1.1 in transgenic mice. *Cell* 58: 337-347.

Barcellos Hoff, M. H., Aggeler, J., Ram, T. G., Bissell, M. J. (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 105: 223-235.

Bateson, W. (1894) *Materials for the study of variation treated with special regard to the discontinuity in the origin of species* (London: Macmillan).

Bernfield, M. and Banerjee, S.D. (1982). *Developmental Biology* 90, 291-305. The turnover of basal lamina glycosaminoglycan correlates with epithelial morphogenesis.

Bernfield, M., Banerjee, S.D., Koda, J.E., and Rapraeger, A.C. (1984). Remodeling of the basement membrane as a mechanism for morphogenetic tissue interactions, in: *The Role of Extracellular Matrix in Development*, Alan R. Liss, New York, 545-572.

Blaschke, R., Andres, A. C., Reid, H. H., Zurcher, G., Friis, R. R. and Ziemiecki, A. (1991). Tyrosine kinases: from viral oncogenes to developmental regulators. *Behring Inst. Mitt.*, 81-92

Blatt C. and Sachs L. (1988). Deletion of a homeobox gene in myeloid leukemias with a deletion in chromosome 2. *Biochem Biophys Res Commun* 156: 1265-

Boudreau, N., Sympson, C. J., Werb, Z., Bissell, M. J. (1995). Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267: 891-893.

Boudreau, N., Werb, Z. and Bissell, M. J. (1996). Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 3509-3513.

Camper, S.A.; Saunders, T.L.; Katz, R.W. and Reeves, R.H. (1990) The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine *Snell* dwarf mutation. *Genomics* 8: 586-590.

Capovilla M., Brandt M. and Botas J. (1994). Direct regulation of decapentaplegic by Ultrabithorax and its role in *Drosophila* midgut morphogenesis. *Cell* 76(3): 461-475.

Care A., Silvani A., Meccia E., Mattia G., Stoppacciaro A., Parmiani G., Peschle C. and Colombo M. (1996). HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cel Biol* 16(9): 4842-4851.

Caron J.M. (1990). Induction of albumin gene transcription in hepatocytes by extracellular matrix proteins. *Mol Cel Biol* 10:1239-1243

Carrasco A.E., Mc Ginnis, W., Gehring, W.J., and De Robertis, E.M. (1984) Cloning of a *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell* 37: 409-414.

Carroll, K.M., Wong T.T., Drabik D.L. and Chang E.B. (1988). Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *Am. J. Physiol.* 254:

G355-G360.

Chen, L. H. and Bissell, M. J. (1989). A novel regulatory mechanism for whey acidic protein gene expression. *Cell Reg.* 1: 45-54.

Chisaka, O. and Capecchi, M.R. (1991). Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene Hox 1.5. *Nature* vol 350, 473-479.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

Church G.M. and Gilbert W. (1984). Genomic sequencing. *PNAS* 81: 1991-1995.

Cillo C., Barba P., Freschi G., Bucciarelli G., Magli M.C. and Boncinelli E. (1992) Hox gene expression in normal and neoplastic kidney. *Int. J. Cancer* 51: 892-897.

Cillo C. (1994-95). HOX genes in human cancers. *Invasion and Metastasis* 14:38-49.

Close M.J., Howlett A.R., Roskelley C.D., Desprez P.Y., Teng C.T., Stampfer M.R., Bissell M.J. and Yaswen P. (1994). Expression of lactoferrin is cell shape-dependent in human and mouse mammary epithelial cells. *Mol Biol Cel* 5(s): 66a.

Daniel C.W. and Silberstein G.B. (1987). Postnatal Development of the Rodent Mammary Gland. In M.C. Neville and C.W. Daniel (eds), *The Mammary Gland: Development, Regulation, and Function*. Plenum Press, New York, pp. 3-36.

Danielson K.G., Oborn C.J., Durban E.M., Butel J.S. and Medina D. (1984). Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis *in vivo* and functional differentiation *in vitro*. *PNAS* 81: 3756-3760.

Davidson, D.R.; Crawley, A.; Hill, R.E. and Tickle, C. (1991) Position dependent expression of two related homeobox genes in developing vertebrate limbs. *Nature* 352: 429-431.

Dedera D.A., Waller E.K., LeBrun D.P., Sen-Majumdar A., Stevens M.E., Barsh G.S. and Cleary M.L. (1993). Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice. *Cell* 74: 833-843.

Degnan, B.M.; Degnan, S.M.; Giusti, A. and Morse, D.E. (1995). A hox/hom homeobox gene in sponges. *Gene* 155: 175-177.

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 Research* 19: 515-520.

Desprez, P. Y, Hara, E., Bissell, M. J. and Campisi, J. (1995). Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein Id-1. *Molecular and Cellular Biology* 15: 3398-3404.

Desprez, P. Y, Roskelley, C., Campisi, J. and Bissell, M. J. (1993). Isolation of functional cell lines from a mouse mammary epithelial cell strain: The importance of basement membrane and cell-cell interaction. *Mol. and Cell. Differentiation* 1: 99-110.

De Vita G., Barba P., Odartchenko N., Givel J., Freschi G., Bucciarelli G., Magli C., Boncinelli E. and Cillo C. (1993). Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 29A (6): 887-893.

DiPersio, C. M., Jackson, D. A. and Zaret, K. S. (1991). The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol. and Cell. Biol.* 11: 4405-4414.

Dolle P. and Duboule D. (1989). Two gene members of the murine Hox-5 complex show regional and cell-type specific expression in developing limbs and gonads. *EMBO Journal* 8 (5) 1507-1515.

Dolle P., Izpisua-Belmonte J.C., Falkenstein H., Renucci A., Duboule D. (1989). Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homeobox containing genes during limb pattern formation. *Nature* 342 (6251) 767-772.

Duboule D. and Dolle P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO* vol 8: 1497-1505.

Edelman G.M. and Jones F.S. (1993). Outside and downstream of the homeobox. *J. Biol Chem* 268: 20683-20686.

Edelman, G.M. and Jones, F.S. (1993). Outside and downstream of the homeobox. *JBC*, 268: 20683-20686

Emerman J.E. and Pitelka D.R. (1977) Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro* 13: 316-328.

Faulkin L.J. Jr. and DeOme K.B. (1958). The effect of estradiol and cortisol on the transplantability and subsequent fate of normal, hyperplastic, and tumorous mammary tissue of C3H mice. *Cancer Research* 18: 51-56.

Folkman, J. and Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273: 345-349.

Friedmann, Y. and Daniel, C. W. (1996). Regulated expression of homeobox genes *Msx-1* and *Msx-2* in mouse mammary gland development suggests a role in hormone action and epithelial-stromal interactions. *Developmental Biol.* 177, 347-355.

Friedmann, Y., Daniel, C. A., Strickland, P. and Daniel, C. W. (1994). Hox Genes in Normal and Neoplastic Mouse Mammary Gland. *Cancer Research* 54: 5981-5985.

Frohman M.A., Boyle M. and Martin G.R. (1990). Isolation of the mouse *Hox-2.9* gene: analysis of embryonic expression suggests that positional information along the anterior-posterior axis is specified by mesoderm. *Development* 110: 589-607.

- Giampaolo, A., Sterpetti, P., Bulgarini, D., Samoggia, P., Pelosi, E., Valtieri, M. and Peschle, C. (1994). Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 84: 3637-3647.
- Gilbert S.F. (1994). *Developmental Biology*. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Goomer, R. S., Holst, B. D., Wood, I. C., Jones, F. S. and Edelman, G. M. (1994). Regulation in vitro of an L-CAM enhancer by homeobox genes HoxD9 and HNF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7985-7989.
- Graham A., Papalopulu N., Krumlauf R. (1989). The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57 (3): 367-378.
- Hatano M., Roberts C., Minden M., Crist W. and Korsmeyer S. (1991). Deregulation of a homeobox gene, *HOX 11*, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science* 253: 79-82.
- Howlett A.R. and Bissell M.J. (1990). Regulation of mammary epithelial cell function: a role for stroma and basement membrane matrices. *Protoplasma* 159: 85-95.
- Howlett, A. R., Bailey, N., Damsky, C., Petersen, O. W. and Bissell, M. J. (1995). Cellular growth and survival are mediated by b1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. *J Cell Sci* 108: 1945-1957.
- Hung, L.; Zeitler, P.S.; Valerius, M.T.; Small, K. and Potter, S.S. (1996) Gsh-1, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *EMBO* 15 (4): 714-724
- Hursh D.A., Padgett R.W., Gelbart W.M. (1993). Cross regulation of decapentaplegic and Ultrabithorax transcription in the embryonic visceral mesoderm in Drosophila. *Development* 117(4): 1211-1222.
- Izpisúa-Belmonte J.C., Falkenstein H., Dollé P., Renucci A. and Duboule D. (1991).

Murine genes related to the *Drosophila AbdB* homeotic gene are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J.* 10: 2279-2289.

Izpisúa-Belmonte J.C., Brown J.M., Duboule D., Tickle C. (1992). Expression of Hox-4 genes in the chick wing links pattern formation to the epithelial-mesenchymal interactions that mediate growth. *EMBO Journal* 11(4): 1451-1457.

James, R. and Kazenwadel, J. (1991). Homeobox Gene Expression in the Intestinal Epithelium of Adult Mice. *The J. of Biol. Chem.* 266: 3246-3251.

Jegalian, B.G. and De Robertis, E.M. (1992). Homeotic transformations in the mouse induced by overexpression of a human HOX 3.3 transgene. *Cell* 71: 901-910.

Jones, F. S., Holst, B. D., Minowa, O., De Robertis, E. M. and Edelman, G. M. (1993). Binding and transcriptional activation of the promoter for the neural cell adhesion molecule by HoxC6 (Hox-3.3). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 6557-6561.

Jones, F. S., Prediger, E. A., Bittner, D. A., De Robertis, E. M. and Edelman, G. M. (1992). Cell adhesion molecules as targets for Hox genes: neural cell adhesion molecule promoter activity is modulated by cotransfection with Hox-2.5 and Hox-2.4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 2086-2090.

Jones, F., Chalepakis, G., Gruss, P., Edelman, G. M. (1992). Activation of the cytotactin promoter by the homeobox-containing gene *Evx-1*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 2091-2095.

Jones, P. L., Boudreau, N., Myers, C. A., Erickson, H. P., Chiquet-Ehrismann, R. and Bissell, M. J. (1995). Tenascin-C inhibits extracellular matrix-dependent gene expression in mammary epithelial cells- localization of active regions using recombinant tenascin fragments. *J Cell Sci* 100: 519-527.

Jonsson J., Carlsson L., Edlund T. and Edlund H. (1994). Insulin promoter factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-609.

Kalionis, B. y O'Farrell, P.H. (1993). A universal target sequence is bound in vitro

by diverse homeodomains. *Mech. Dev.* 43: 57-70

Kenyon, C. (1994). If birds can fly, why can't we? Homeotic genes and evolution. *Cell*, vol 78: 175-180.

Kenyon, C. and Wang, B. (1991). A cluster of Antennapedia-class homeobox genes in a non-segmented animal. *Science* 253: 516-517.

Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W. and Martin, G. R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25: 312-318.

Kongsuwan K., Webb E., Housiaux P. and Adams J.M. (1988). Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian haemopoietic lineages. *EMBO Journal* 7(7): 2131-2138.

Kumlauf R., Holland P.W., McVey J.H. and Hogan B.L. (1987). Developmental and spatial patterns of expression of the mouse homeobox gene Hox-2.1. *Development* 99(4): 603-617.

Lai, E., Prezioso, V. R., Tao, W., Chen, W. S. and Darnell, Jr., J. E. (1991). Hepatocyte nuclear factor 3a belongs to a gene family in mammals that is homologous to the *Drosophila* homeotic gene fork head. *Genes and Dev.* 5: 416-427.

Larosa and Gudas. (1988). *MCB* 8: 3906-3917

Lawrence, H. J, Johnson, R. A., Perrine, S. and Largman, C. (1994). The role of homeobox genes in erythropoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 718: 165-180.

Lee E.Y.H., Parry G. and Bissell M.J. (1984) *JCB* 98: 146-155.

Lee EYH, Lee WH, Kaetzel CS, Parry G and Bissell MJ (1985) Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: regulation of casein gene expression and secretion. *PNAS (USA)* 82:1419-1423.

- Levine, E. M. and Schechter, N. (1993). Homeobox genes are expressed in the retina and brain of adult goldfish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2729-2733.
- Li, M.L., Aggeler J., Farson D.A., Hatier C., Hassell J., Bissell, M.J. (1987). Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *PNAS* 84: 136-140.
- Li, S.; Crenshaw, E.B.; Rawson, E.J.; Simmons, D.M., Swanson, L.W. and Rosenfeld, M.G. (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 347: 528-533.
- Lin, C., Dempsey, P. J., Coffey, R. J. and Bissell, M. J. (1995). Extracellular matrix regulates whey acidic protein gene expression by suppression of TGF- α in mouse mammary epithelial cells- studies in culture and in transgenic mice. *J Cell Biol* 129: 1115-1126.
- Lochter A., Srebrow A., Sympson C.J., Terracio N., Wer Z. and Bissell M.J. (1997). Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1 dependent invasive properties. *J. Biol. Chem.* 272: 5007-5015.
- Lu M., Gong Z., Shen W-F. and Ho A. (1991). The *tcl-3* proto-oncogene altered by chromosomal translocation in T-cell leukemia codes for a homeobox protein. *EMBO Journal* 10: 2905-2910.
- Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McGinnis W., Garber R.L., Wirz J., Kuroiwa A., Gehring W.J. (1984). *Cell* 37: 403
- McGinnis W., Levine M., Hafen E., Kuroiwa, A. and Gehring W.J. (1984). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *Bithorax* complexes. *Nature*, 308: 428-433.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283-302.

- Medina D. (1996). The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. *Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1(1): 5-19.
- Meijlink, F., de Laaf, R., Verrijzer, P., Destree, O., Kroezen, V., Hilkens, J. and Deschamps, J. (1987). A mouse homeobox containing gene on chromosome 11: sequence and tissue-specific expression. *Nucleic Acids Research* 15: 6773-
- Muneoka, K. and Sassoon, D. (1992) Molecular aspects of regeneration in developing vertebrate limbs. *Dev. Biol.* 152: 37-49.
- Panganiban G.E., Rashka K.E., Neitzel M.D., Hoffman F.M. (1990a). Biochemical characterization of the *Drosophila* decapentaplegic protein, a member of the transforming growth factor beta family of growth factors. *Mol. Cel. Biol.* 10(6): 2669-2677.
- Panganiban G.E., Reuter R., Scott M.P., Hoffman F.M. (1990b). A *Drosophila* growth factor homolog, decapentaplegic, regulates homeotic gene expression within and across germ layers during midgut morphogenesis. *Development* 110(4) 1041-1050.
- Pavlova A., Boutin E., Cunha G. and Sassoon D. (1994). Msx-1 (Hox-7.1) in the adult mouse uterus: cellular interactions underlying regulation of expression. *Development* 120: 335-346.
- Peifer, M. and Wieschaus, E. (1990). Mutations in the *Drosophila* gene *extradenticle* affect the way specific homeodomain proteins regulate segmental identity. *Genes Dev.* 4: 1209-1223.
- Perkins A., Kongsuwan K., Visvader J., Adams J.M. and Cory S. (1990). Homeobox gene expression plus autocrine growth factor production elicits myeloid leukemia. *PNAS* 87: 8398-8402.
- Petersen, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A. R. and Bissell, M. J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 9064-9068.

Rauskolb, C., Peifer, M. and Wieschaus, E. (1993). extradenticle, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene *pbx1*. *Cell* 74: 1-20.

Reuter R., Panganiban G.E., Hoffman F.M., Scott M.P. (1990). Homeotic genes regulate the spatial expression of putative growth factors in the visceral mesoderm of *Drosophila* embryos. *Development* 110(4): 1031-1040.

Robert, B.; Lyons, G.; Simandl, B.K. Kuroiwa, A. and Buckingham, M. (1991). The apical ectodermal ridge regulates Hox-7 and Hox-8 gene expression in developing limb buds. *Genes Dev* 5: 2362-2374.

Roder, L., Vola, C. and Kerridge, S. (1992). The role of the teashirt gene in trunk segmental identity in *Drosophila*. *Development* 115, 1017-1033.

Roskelley C.D. and Bissell M.J. (1995) Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem. Cell. Biol.* 73: 391-397

Roskelley, C. D., Deprez, P. Y. and Bissell, M. J. (1994). Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12378-12382.

Sakakura T. (1987) Mammary embryogenesis. In M.C. Neville and C.W. Daniel (eds), *The Mammary Gland: Development, Regulation, and Function*. Plenum Press, New York, pp. 37-66.

Sakakura T., Nishizuka Y. and Dawe, C.J. (1976). Mesenchyme-dependent morphogenesis and epithelium-specific cytodifferentiation in mouse mammary gland. *Science* 194 (4272): 1439-1441.

Sakakura T., Sakagami Y., Nishizuka Y. (1982). Dual origin of mesenchymal tissues

- participating in mouse mammary gland embryogenesis. *Dev. Biol.* 91 (1): 202-207.
- Sassoon D. (1992). Hox genes: a role for tissue development. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 7: 1-2.
- Schmidhauser, C., Bissell, M. J., Myers, C. A. and Casperson, G. F. (1990). Extracellular matrix and hormones transcriptionally regulate bovine b-casein 5' sequences in stably transfected mouse mammary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 9118-9122.
- Schummer, M.; Scheurlen, I.; Schaller, C. and Galliot, B. (1992). The EMBO Journal, vol. 11: 1815-1823. HOM/HOX homeobox genes are present in hydra (*Chlorohydra viridissima*) and are differentially expressed during regeneration.
- Scott M.P., and Weiner A.J. (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *PNAS* 81: 4115-4119.
- Scott M.P., Tamkun J.W. and Hartzell G.W. (1989). *Biochem Biophys Acta* 989: 25-48.
- Scott, M. (1992). Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 71: 551-553.
- Shenk, M.A.; Gee, L.; Steele, R.E. and Bode, H.R. (1993). Expression of *Cnox-2*, a HOM/HOX gene, is suppressed during head formation in hydra. *Developmental Biology* 160: 108-118.
- 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.
- Song K., Wang Y. and Sassoon D. (1992). Expression of *Hox-7.1* in myoblasts inhibits terminal differentiation and induces cell transformation. *Nature* 360: 477-481.
- Stoker A.W., Streuli C.H., Martins-Green M. and Bissell M.J. (1990). Designer microenvironments for the analysis of cell and tissue function. *Curr. Op. in Cell Biol.* 2: 864-874.

Streuli C.H. and Bissell M.J. (1991). Mammary epithelial cells, extracellular matrix, and gene expression. In *Regulatory Mechanisms in Breast Cancer*. M.E. Lippman and R. Dickson, editors. Kluwer Academic Publishers, Norwell, M.A. 365-381.

Streuli C.H., and Bissell M.J. (1990) Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *J. Cell Biol.* 110: 1405-1415.

Streuli C.H., Bailey N. and Bissell M.J. (1991) Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J. Cell Biol.*, 115: 1383-1395.

Streuli C.H., Schmidhauser C., Bailey N., Yurchenco P., Skubitz A.P.N., Roskelley C. and Bissell M.J. (1995) A domain within laminin that mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J. Cell Biol.* 129: 591-603.

Streuli, C. H., Schmidhauser, C., Kobrin, M., Bissell, M. J. and Derynck, R. (1993). Extracellular matrix regulates expression of the TGF- β 1 gene. *J Cell Biol* 120: 253-260.

Streuli, C.H. (1994) Basement membrane in the control of mammary gland function. In: *Intercellular signalling in the mammary gland*. Ed. CJ Wilde, M Peaker and CH Knight. Plenum Publishing Corporation, New York, 141-151.

Suh E. and Traber P.G. (1996). An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol.* 16(2): 619-625.

Sympson, C. J., Bissell, M. J. and Werb, Z. (1995). Mammary gland tumor formation in transgenic mice overexpressing stromelysin-1. *Seminars in Cancer Biol.* 6: 159-163.

Sympson, C.J., Talhouk, R.S., Alexander, C.M., Chin, J.R., Clift, S.M., Bissell, M.J. and Werb Z., (1994). Targeted expression of Stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *JCB* 125 (3): 681-693.

Takeshita K; Bollekens JA; Hijiya N; Ratajczak M; Ruddle FH; Gewirtz AM. (1993). A homeobox gene of the Antennapedia class is required for human adult erythropoiesis. *PNAS* 90 (8): 3535-3538.

Talhok, R.S., Bissell, M.J. and Werb Z., (1992). Coordinate expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *JCB* 118 (5): 1271-1282.

Taniguchi, Y., Komatsu, N. and Moriuchi, T. (1995). Overexpression of the HOX4A (HOXD3) homeobox gene in human erythroleukemia HEL cells results in altered adhesive properties. *Blood* 85: 2786-2794.

Thomasset N., Lochter A., Sympson C.J., Lund L.R., Williams D.R., Behrendtsen O., Werb Z. and Bissell M.J. manuscrito enviado a *Molecular Biology of the Cell*, febrero 1997.

Topper, Y.L. and Freeman, C.S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiological Reviews* 60 (4), 1049-1106.

Verrijzer P., de Graaff W., Deschamps J. and Meijlink F. (1988). Nucleotide sequence of the Hox2.3 gene region. *Nucleic Acid Research* 16 (6): 2729.

Vincent, J.P., Kassis, J.A. y O'Farrell, P.H. (1990). A synthetic homeodomain binding site acts as a cell type specific, promoter specific enhancer in *Drosophila* embryos. *EMBO J.* 9: 2573-2578

Weigel, D. and Meyerowitz. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78: 203-209.

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.

Wolf, G., Kuncio, G. S., Sun, M. J. and Neilson, E. G. (1991). Expression of Homeobox genes in a proximal tubular cell line derived from adult mice. *Kidney*

Wolgemuth, D.J.; Behringer, R.R.; Mostoller, M.P.; Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1989). Transgenic mice overexpressing the mouse homeobox-containing gene Hox - 1.4 exhibit abnormal gut development. *Nature* 337: 464-467.

Wu, J., Zhu, J. Q., Zhu, D. X., Scharfman, A., Lamblin, G. and Han, K. K. (1992). Selective inhibition of normal murine myelopoiesis "in vitro" by a Hox2.3 antisense oligodeoxynucleotide. *Cell. and Mol. Biol.* 38: 367-376.

Zeng, C., Pinsonneault, J., Gellon, G., McGinnis, N. and McGinnis, W. (1994). Deformed protein binding sites and cofactor binding sites are required for the function of a small segment-specific regulatory element in *Drosophila* embryos. *EMBO J.* 13: 2362-2377.