

## Tesis de Posgrado

# La morfogénesis de la glándula mamaria del ratón: rol de las metaloproteasas

Simian, Marina

2002

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Simian, Marina. (2002). La morfogénesis de la glándula mamaria del ratón: rol de las metaloproteasas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3517\\_Simian.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3517_Simian.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Simian, Marina. "La morfogénesis de la glándula mamaria del ratón: rol de las metaloproteasas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3517\\_Simian.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3517_Simian.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

*Universidad de Buenos Aires*

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

La morfogénesis de la glándula mamaria del  
ratón: rol de las metaloproteasas.

*Tesis presentada para optar por el título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires*

*Autora: Marina Simian*

*Directora: Dra Mina J. Bissell*

*Lawrence Berkeley National Laboratory  
Berkeley, California, EEUU*

2002

*Universidad de Buenos Aires*

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

Morphogenesis of the mouse mammary  
gland: the role of metalloproteinases.

*Ph.D. Thesis*

*Author: Marina Simian*

*Director: Mina J. Bissell, Ph.D.*

*Lawrence Berkeley National Laboratory  
Berkeley, California, EEUU*

2002

*A Esteban, Santi y Cata.*

## Agradecimientos

Primero y muy especialmente, quiero agradecer a la Dra. Mina J. Bissell, directora de esta tesis, por todo lo que me brindó durante la realización de este trabajo. No solo me refiero a la parte científica, donde le agradezco haberme dado muchísima libertad para trabajar, por haber escuchado mis ideas sin prejuicios, y haberme guiado en los momentos de confusión. Le agradezco el énfasis que puso en no sólo enseñarme a pensar, sino a hablar en público, organizar mis ideas y ser clara al transmitir las. Su espíritu incansable y alegre, siempre muy exigente, hizo que la realización de todo este trabajo haya sido un gran desafío. Por otra parte, le quiero agradecer también el haber recibido con una sonrisa la noticia de mis dos embarazos, el haberme recibido siempre en su casa aquellas noches en las que ya no valía la pena que manejara los 120 km a mi casa para tener que volver al laboratorio en menos de 12 horas! Por último, espero a los sesenta años poder tener, igual que ella, mucho optimismo y espíritu de aventura!

En segundo lugar me gustaría agradecer a las Dras Zena Werb, Shyamala Harris, y Mary Helen Barcellos-Hoff, con quienes colaboré en las distintas etapas de este trabajo. A las tres muchas gracias por haber tenido siempre tiempo para discutir ideas y resultados. Ha sido un honor para mí poder colaborar con ustedes en este trabajo!

A Andre Lochter, de quien heredé este proyecto, muchas gracias por todo lo que me enseñaste en los tres meses que trabajamos juntos.

Al Lawrence Berkeley Laboratory, no sólo por ser un muy buen lugar para trabajar, sino también por las hermosas vistas de la Bahía de San Francisco.

Muy especialmente a Claudia Lanari y Alfredo Molinolo, que me recibieron en su laboratorio nuevamente y me ayudaron muchísimo con la corrección del manuscrito de la tesis.

A toda la gente del Lawrence Berkeley National Laboratory, tanto de mi laboratorio, como de los vecinos. En especial me gustaría mencionar a: Philip Pujuguet, Rosanne Boudreau, Sofie Lelievre, Valerie Weaver, Ali Ravampay, Fei Wang, Karen Schmeichel, John Muschler, Carmen Hagios, Dina Levi, Shraddha Ravani, Sharianne Louie, Joni Mott, Eva Lee, Virginia Novaro, Derek Radisky, Kieth Van, Rick Schwarz, Peny Siig, Norene Jelliffe, Amy Ukena, Bill y también a Mark Sternlicht y Mari del laboratorio de Zena Werb.

A las chicas del laboratorio de Carcinogénesis Hormonal del IBYME: Caro, Vicky, Luisa, María, Julieta y Alejo por supuesto, por las divertidas mañanas, bancarse que ocupe un lugar en nuestro apretado laboratorio, y por las lecturas y correcciones del manuscrito.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental, donde escribí esta tesis.

A la Fundación Sales por la beca que me permitió volver a trabajar en Argentina.

Y finalmente a Esteban, Santi y Cata por la paciencia ...ya termino y ordeno los papers!!!!

## Resumen

La glándula mamaria se desarrolla por un proceso de ramificación. Muchos factores han sido implicados en la regulación de este proceso morfogénético. Previamente, en nuestro laboratorio se desarrollaron ratones transgénicos que sobreexpresan la metaloproteasa estromelisin-1 (Str-1) y se demostró que la misma tiene un efecto morfogénético. Sin embargo resta dilucidar si este efecto es específico de las metaloproteasas de matriz (MMPs) y cuál es la relación entre la actividad proteolítica, los factores de crecimiento polipeptídicos y agentes morfogénéticos. El objetivo de la primera parte de esta Tesis fue contestar esta pregunta. Utilizamos para ello un sistema de cultivo tridimensional de organoides primarios de glándula mamaria de ratón y la línea celular epitelial de mama SCp2. Nuestros resultados indican que la morfogénesis de organoides primarios cultivados en geles de colágeno tipo I en presencia de factores de crecimiento polipeptídicos requiere de actividad MMP para que la misma se lleve a cabo. Por otra parte, la Str-1 recombinante fue capaz de estimular el proceso morfogénético en ausencia de factores de crecimiento. La plasmina también logró estimular el desarrollo de ramificaciones por parte de los organoides; sin embargo este proceso también fue MMP dependiente. Para discernir entre señales morfogénéticas y de proliferación utilizamos una línea celular que carece de epimorfina y establecimos que las MMP, como la epimorfina, son necesarias para la morfogénesis pero no para la proliferación celular. Por otra parte la epimorfina, a diferencia de los factores de crecimiento polipeptídicos, estimuló la producción de MMPs sin afectar el número celular. Habiendo encontrado que la epimorfina es un regulador local de la actividad proteolítica, en la segunda

etapa de esta Tesis quisimos investigar cuál era el papel de las hormonas sistémicas estrógenos y progesterona en la proteólisis. La observación de que ratones transgénicos para la isoforma A del receptor de progesterona (ratones PR-A) presentan un fenotipo hiperplásico muy similar al observado en los transgénicos para Str-1 sugería que podría haber una regulación a este nivel. Utilizamos para esta segunda parte del trabajo ratones PR-A, ratones knock-out para el receptor de progesterona (PR) y controles. Análisis de componentes de la membrana basal como la laminina-5 y el colágeno IV revelaron que la misma era discontinua en áreas de morfología anormal en las glándulas mamarias de los ratones transgénicos. También se detectaron pérdidas en la marcación para colágeno III. Esto se asoció con un aumento de células positivas para PCNA, un indicador de la proliferación celular. Por otra parte la ovariectomía demostró que el fenotipo es reversible y por lo tanto dependiente de la acción hormonal. Análisis de actividad proteolítica en tejidos de animales transgénicos y knock-out demostraron que habría una correlación entre los niveles de gelatinasa A y el PR sólo en el caso de los ratones knock-out. Tratamientos hormonales, por otra parte, permitieron establecer que las vías del PR y el ER estarían involucradas en la activación de la gelatinasa A. Por último encontramos en experimentos preliminares una correlación entre los niveles de MT1-MMP y los de PR, lo cual sugeriría que en la glándula mamaria del ratón, como se ha demostrado en otros sistemas, esta metaloproteasa de membrana estaría asociada a la activación de la gelatinasa A. Nuestros resultados demuestran un papel crítico para las metaloproteasas en la morfogénesis de la glándula mamaria y establecen que no sólo factores locales como la epimorfina son capaces de regular la actividad proteolítica de la glándula mamaria; las hormonas sistémicas estrógeno y progesterona juegan un rol protagónico también.



## Abstract

The mammary gland develops through a process called branching morphogenesis. Many factors have been implicated in the regulation of this morphogenetic process. Previously, we developed transgenic mice that overexpress the matrix metalloproteinase (MMP) stromelysin-1 (Str-1), and showed that it has a morphogenetic effect on the mammary gland. However, it still remains to be determined whether this effect is specific to MMPs, and what is the relationship between proteolytic activity, polypeptide growth factors and morphogenetic agents. The aim of the first part of this Thesis was to answer this question. To do so we used a three-dimensional culture system of primary mouse mammary organoids and the SCp2 mammary epithelial cell line. Our results indicate that branching morphogenesis of primary organoids in collagen I gels in the presence of polypeptide growth factors requires MMP activity. On the other hand recombinant stromelysin-1 was able to induce morphogenesis in the absence of growth factors. Plasmin also stimulated branching morphogenesis of primary organoids; this effect was also MMP dependent. To differentiate between signals for morphogenesis and proliferation, we used a mouse mammary epithelial cell line that lacks epimorphin and established that, like epimorphin, MMPs are required for morphogenesis but not proliferation. Moreover, epimorphin, in contrast to growth factors, increased the levels of MMPs without affecting cell number. Having found that epimorphin is a local regulator of proteolytic activity in the mammary gland, in the second part of this Thesis we looked into the role of the systemic hormones estrogen and progesterone. The fact that transgenic mice for the A isoform of the progesterone receptor (PR-A mice) have a

phenotype that is very similar to that found in Str-1 transgenic mice suggested that this could be the case. Therefore, for this second set of experiments we used PR-A transgenic mice, knock-out mice for progesterone receptor (PR) and wild type mice. Analysis of components of the basement membrane such as laminin-5 and collagen IV revealed that it was discontinuous in areas where there was abnormal morphology in the mammary glands of transgenic mice. We also found alterations in the staining pattern of collagen III. This was associated with an increase in the number of cells positive for PCNA, an indicator of cell proliferation. On the other hand ovariectomy revealed that the phenotype was reversible and therefore dependent on signaling through PR. Analysis of proteolytic activity in tissues of transgenic and knock-out mice revealed that there was a correlation between the levels of PR and gelatinase A only in the mammary glands of knock-out mice. Hormonal treatments established that signaling through ER and PR is involved in the activation of gelatinase A. Finally we found in preliminary studies a correlation between the levels of PR and MT1-MMP, suggesting that in the mouse mammary gland, like in other systems, this membrane bound MMP would be involved in the activation of gelatinase A. Our results show a critical role for MMPs in mammary gland branching morphogenesis and establish that not only local factors such as epimorphin can regulate proteolytic activity in the mammary gland; estrogens and progesterone play a crucial role as well.

**PR:** receptor de progesterona

**ER:** receptor de estrógenos

**MMP:** metaloproteasa de matriz

**Str-1:** estromelisina-1

**uPA:** activador del plasminógeno tipo uroquinasa

**TIMP:** inhibidor tisular de metaloproteasa

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico

**bFGF:** factor de crecimiento fibroblástico

**KGF:** factor de crecimiento de queratinocitos

**HGF:** factor de crecimiento de hepatocitos

**TGF- $\beta$ :** factor transformante tipo-beta

**Ovx:** ovariectomizado

**PRKO:** knock-out para receptor de progesterona

**Ratón PR-A:** transgénico para la isoforma A del receptor de progesterona

<b>Introducción</b>	13
La morfogénesis por ramificación	14
La glándula mamaria	14
El desarrollo de la glándula mamaria del ratón	15
La glándula mamaria neonata	15
La glándula juvenil	16
Factores involucrados en la morfogénesis de la glándula mamaria del ratón	19
Factores sistémicos: estrógenos y progesterona	19
Factores locales:	26
Los factores de crecimiento polipeptídicos	26
La epimorfina	29
La interacción con el medio ambiente	30
El rol de la matriz extracelular	30
Las integrinas	33
Las metaloproteasas y los componentes de la matriz extracelular	34
MMPs: la superfamilia de las metzincinas.	36
Estructura y función de las MMPs	37
Regulación de la actividad MMP	40
Regulación a nivel transcripcional	41
Regulación a nivel post-transcripcional	43
Regulación de la secreción	44
Activación de MMPs latentes	44

Inhibidores endógenos de las MMPs	46
Localización pericelular de la actividad proteolítica	49
Los sustratos de las MMPs	49
La remodelación de la matriz extracelular y la regulación del comportamiento celular	50
Las metaloproteasas y el desarrollo de la glándula mamaria	53
Modelos experimentales	56
<b>Objetivos</b>	59
<b>Hipótesis</b>	59
<b>Materiales y Métodos</b>	61
Preparación de organoides primarios de glándula mamaria de ratón	62
Preparación de cúmulos de células SCp2	62
Cultivos tridimensionales	63
Proteasas e inhibidores	64
Análisis de la morfogénesis	65
Zimografía	66
Immunofluorescencia	67
Adquisición y procesado de la imagen	70
Proliferación celular y detección de células apoptóticas	70
Preparación de epimorfina recombinante	71
RT-PCR	71
Ratones transgénicos y knock-out	72
Preparación de montajes totales de glándula mamaria	74

Tratamientos hormonales	75
Zimogramas de tejidos	75
<b>Resultados</b>	76
<b>Parte I</b>	77
Las metaloproteasas están involucradas en la morfogénesis de organoides primarios de glándula mamaria de ratón.	77
La estromelisina-1 induce la morfogénesis de organoides primarios.	89
La plasmina es un regulador positivo de la morfogénesis.	91
La epimorfina regula la morfogénesis mamaria en forma metaloproteasa dependiente.	93
Las metaloproteasas son requeridas para la proliferación o la morfogénesis?	95
<b>Introducción parte II</b>	100
<b>Parte II</b>	100
Pérdida de la membrana basal en ratones transgénicos PR-A está acompañada por un incremento de la proliferación celular.	101
Análisis de la actividad proteolítica en las glándulas mamarias de ratones transgénicos PR-A y PR knock-out.	109
Activación de gelatinasa A en glándulas mamarias de ratones tratados con estrógeno y progesterona.	113
Análisis de MT1-MMP en la glándula mamaria del ratón y su relación a PR.	113

<b>Discusión</b>	119
<b>Conclusiones</b>	138
<b>Bibliografía</b>	141

# *Introducción*



## **Introducción**

### **La morfogénesis por ramificación.**

La morfogénesis por ramificación es un proceso común en el desarrollo de muchos órganos, incluyendo el pulmón, el riñón y las glándulas salivares y mamarias. Es un proceso complejo que involucra muchos factores y sus respectivos receptores. La estructura clásica de ramificación consiste en un conducto primario que luego se divide en ramificaciones de mayor orden (secundario, terciario, etc); estas estructuras son componentes estructurales de muchos órganos y permiten obtener una mayor superficie que favorece un funcionamiento óptimo (Gumbiner, 1992). Los trabajos de investigación en esta área se han concentrado en el desarrollo del pulmón (Hogan, 1999), el riñón (Horster et al., 1999), la glándula salivar (Munaut et al., 1999; Fukuda et al., 1988) y la glándula mamaria (Daniel et al., 1989). Esta última es única entre todos estos órganos porque la mayor parte del proceso de ramificación se lleva a cabo luego del nacimiento, con lo cual las posibilidades de manipulación por parte del investigador son mucho mayores.

### **La glándula mamaria.**

La glándula mamaria ha evolucionado para suministrar alimento a la prole recién nacida. Estos nutrientes están ensamblados en un fluido rico en proteínas y grasas al cual denominamos leche. El diseño anatómico y morfológico de la glándula mamaria así como la

regulación de su desarrollo y funcionalidad están condicionados en última instancia por su papel fundamental en la supervivencia de la prole. El desarrollo y la funcionalidad de la glándula mamaria han atraído la curiosidad de científicos por más de un siglo. A partir de la primera descripción anatómica de la mama (Cooper, 1845), la misma ha sido estudiada por fisiólogos para entender la síntesis de la leche y su secreción, por expertos en microscopía electrónica para entender su estructura, por biólogos especializados en desarrollo como ejemplo del desarrollo post natal de un órgano epitelial, por endocrinólogos como modelo de acción hormonal, por especialistas en cáncer para entender las causas que llevan a la transformación neoplásica, y por clínicos con el fin de tratar y curar a pacientes con cáncer de mama.

### **El desarrollo de la glándula mamaria del ratón.**

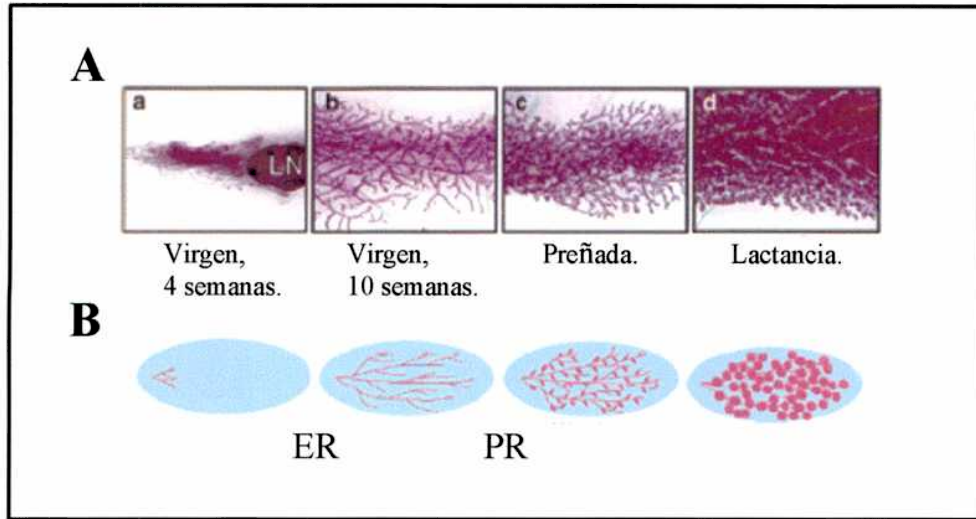
#### **La glándula mamaria neonata.**

En el ratón hembra recién nacido, el parénquima mamario consiste de cordones epiteliales conectados al pezón por un conducto primario. Los conductillos en esta etapa consisten de dos o tres capas de células epiteliales en la zona más gruesa, cerca del pezón y conteniendo varias luces pequeñas que gradualmente se fusionan para formar un conducto totalmente canalizado (Sekhri et al., 1967). Los conductos terminan en pequeños brotes terminales conteniendo numerosas figuras mitóticas.

Durante las primeras tres semanas de vida, los conductos mamarios se elongan y ramifican lentamente. Con la eliminación de las hormonas maternas el brote terminal se reduce en tamaño o desaparece, con lo cual el crecimiento se reduce.

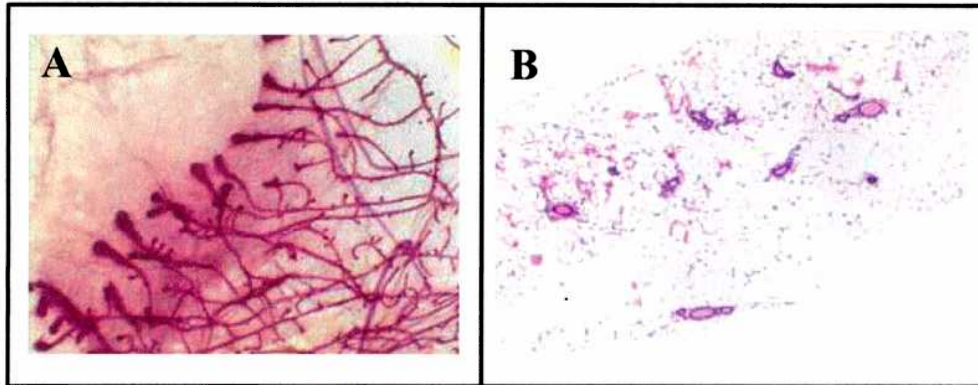
### La glándula juvenil.

La Figura 1 muestra esquemáticamente los estadios de desarrollo de la glándula mamaria del ratón. A partir de la semana tres o cuatro de vida, los brotes terminales reaparecen en los extremos de los conductos y el crecimiento se incrementa tanto en velocidad como en grado de ramificación (Nandi, 1958). En la pubertad en forma secuencial al incremento de los niveles séricos de estrógenos y progesterona, los brotes terminales dan lugar a la elongación ductal en la glándula mamaria produciendo células ductales y mioepiteliales diferenciadas (Figura 2) (Fendrick et al., 1998). Los brotes terminales regulan el crecimiento lineal, la formación de ramificaciones y la dirección del crecimiento. Por otra parte, a partir de los conductos primarios surgen las ramificaciones laterales. Estos conductos laterales permiten que se llene el tejido adiposo en todas sus áreas. Los conductos detienen su crecimiento cuando llegan al límite del tejido adiposo; esto ocurre alrededor de las 10 semanas de vida en los ratones; el tiempo exacto depende de cada cepa (Fata et al., 1999). Tras las 10 semanas, el ratón hembra ya es adulto y su glándula mamaria está bajo la influencia del ciclo estral, que induce una leve diferenciación y regresión alveolar con cada ciclo estral (Ferguson et al., 1992; Andres y Strange, 1999; Fata et al., 2001). La preñez trae consigo los mayores cambios morfológicos en la glándula mamaria del ratón adulto. El número de ramificaciones laterales incrementa, seguido de la diferenciación lóbulo-alveolar



**Figura 1:** Estadios de desarrollo de la glándula mamaria del ratón.

A) Montajes totales representativos de los distintos estadios de desarrollo post-natal de la glándula mamaria del ratón. B) Representación esquemática de los estadios de desarrollo. La fase de elongación ductal está regulada por la vía del receptor de estrógenos (ER) y la ramificación lateral y diferenciación lóbulo-alveolar por la del receptor de progesterona (PR) como se explica más adelante en el texto.



**Figura 2:** Montaje total y corte histológico de glándula mamaria de un ratón hembra virgen.

(A) Montaje total de glándula mamaria de un ratón hembra de cuatro semanas de edad, mostrando los brotes terminales invadiendo el estroma. (B) Corte de glándula mamaria mostrando una estructura ductal simple.

en preparación para la lactancia. Este proceso está regulado por la vía del PR (Shyamala, 1999). Finalizada la lactancia, la involución se caracteriza por una apoptosis masiva de las células epiteliales y una extensa remodelación tisular que tiene como resultado una glándula mamaria que morfológicamente es similar a la encontrada en los animales nulíparos (Werb et al., 1996).

### **Factores involucrados en la morfogénesis de la glándula mamaria del ratón.**

La morfogénesis es un proceso controlado en forma precisa por varios factores tanto sistémicos como locales, que regulan el comportamiento celular. Ya hemos mencionado brevemente el rol de los estrógenos y la progesterona; junto con los factores locales, controlan eventos como el balance entre la proliferación y la muerte celular, la adhesión de las células a la matriz extracelular, la regulación de la composición de los componentes de la matriz extracelular, las interacciones célula-célula, la migración, la capacidad de invadir y la diferenciación (Gumbiner, 1992). Todos estos procesos son el producto de una coordinada interacción entre el epitelio y el mesénquima de la glándula mamaria. A continuación analizaremos las características de estas interacciones y los factores que a nuestro juicio influyen sobre el desarrollo de la glándula mamaria.

#### **Factores sistémicos:**

##### **Estrógenos y progesterona.**

Los niveles de estrógenos y progesterona regulan la proliferación y diferenciación de la glándula mamaria. Sin embargo, para entender los mecanismos involucrados en esta regulación es indispensable entender en qué compartimiento celular, estroma o parénquima, se expresan. De esta manera se podrá analizar luego en que medida afectan estas hormonas sistémicas a los factores que regulan localmente el desarrollo y la diferenciación de la glándula mamaria.

En la glándula mamaria del ratón, el receptor de estrógenos (ER) existe en dos tipos moleculares, ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Saji et al., 2000). Estudios analizando el fenotipo de la glándula mamaria de los ratones knock-out para ER $\beta$  indican hasta el momento que la falta de este receptor no afectaría el desarrollo y funcionalidad de la glándula mamaria (Shyamala et al., 2002). En embriones de 14-16 días la expresión del ER $\alpha$  se detecta en el mesénquima mamario, rodeando el rudimento epitelial, tanto por técnicas bioquímicas de unión al ligando (Narbaitz et al., 1980), como por técnicas de inmunohistoquímica (Shyamala et al., 2002). En la glándula mamaria de ratones hembra de 1 día de vida, el ER $\alpha$  está presente tanto en las células epiteliales como en el estroma fibroblástico periférico. El mismo patrón de expresión se encuentra en ratones de 7 días, pero la intensidad de la marca se incrementa en este período. En el ratón adulto con alrededor de 10 semanas de vida ER $\alpha$  se detecta mayoritariamente en las células epiteliales luminales, y no hay marca en las células mioepiteliales. En general no se ve expresión en el estroma fibroblástico alrededor de los conductos distales; sin embargo sí se detecta en el estroma denso en la zona del pezón y alrededor de los conductos primarios. El ER $\alpha$  también se detecta con un patrón heterogéneo en el estroma adiposo (Shyamala et al., 2002). Con el comienzo de la preñez, los niveles de

ER $\alpha$  disminuyen junto con la proporción de células positivas para ER $\alpha$ . En la preñez avanzada solo el 3-5% de las células epiteliales resultan positivas. A diferencia de lo que ocurre durante la preñez, con la lactancia se detecta un incremento en los niveles de ER $\alpha$  (Shyamala y Guiot, 1992). El mismo patrón de expresión de ER $\alpha$  durante la preñez y la lactancia ha sido descrito para la rata (Saji et al., 2000).

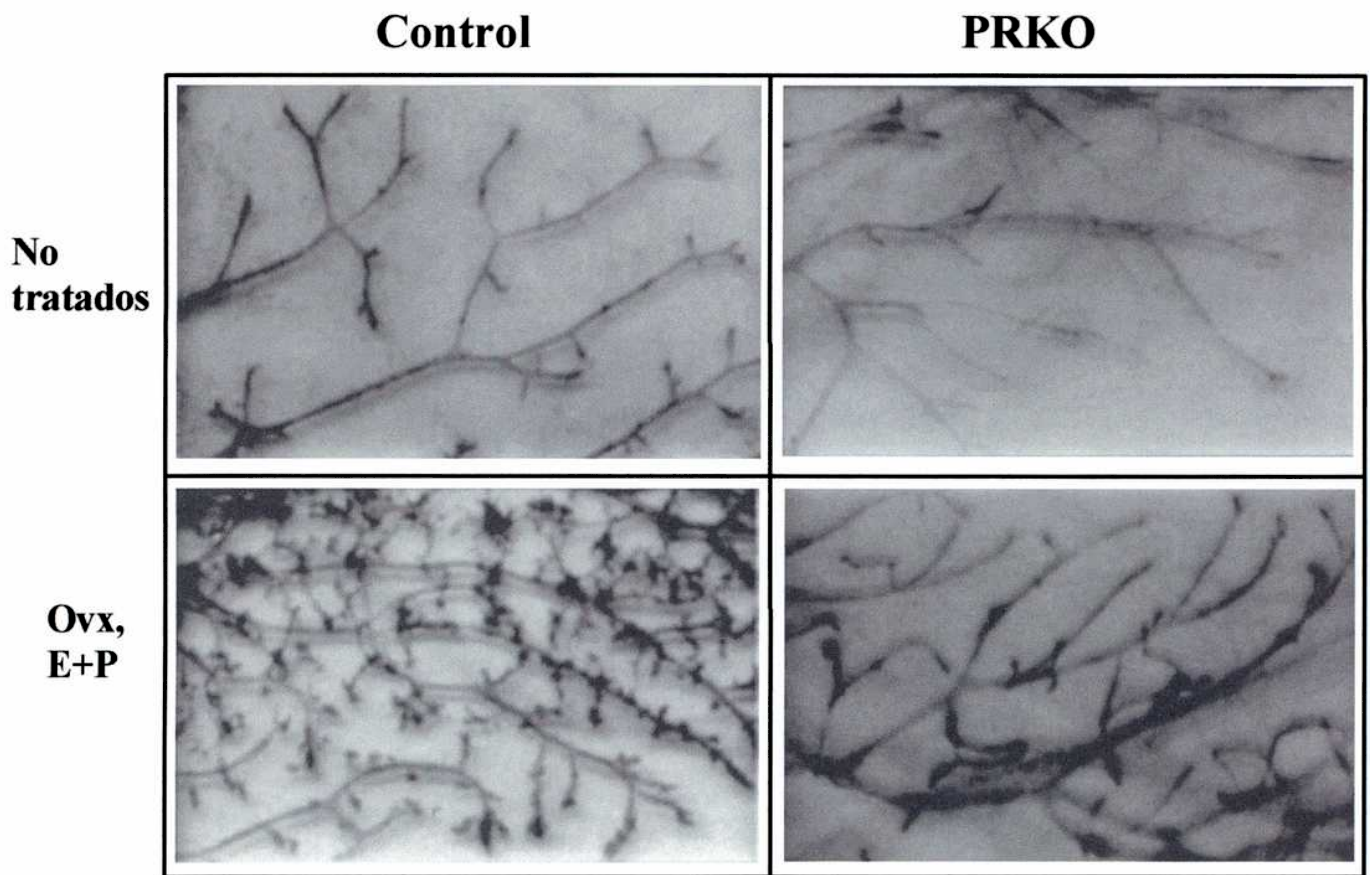
La síntesis del receptor de progesterona (PR) en la glándula mamaria, como en muchos otros órganos, es regulada por el 17- $\beta$ -estradiol. Por lo tanto, la expresión de PR sirve como marcador tanto de la acción estrogénica como progestacional. Sin embargo hay notables diferencias entre los patrones de expresión de ambos receptores. PR se detecta en aproximadamente el 8% de las células epiteliales del primordio epitelial en embriones de 18-19 días, pero no en el mesénquima subyacente (Shyamala et al., 2002). En ratones de 1 día, a pesar de ser detectado, hay una disminución significativa en el porcentaje de células epiteliales positivas (2%). A los 7 días se incrementa tanto el número de células positivas como la intensidad de la marca medida por inmunohistoquímica. Un incremento mayor se da entre los 7 días y la pubertad, momento en el cual se detectan alrededor de un 55% de células epiteliales positivas (Shyamala et al., 1997; Shyamala et al., 2002). Este incremento en el número de células positivas está acompañado por un incremento en la cantidad de receptor por célula. En el ratón hembra adulto tanto el PR como su mRNA solo se detectan en el compartimiento epitelial luminal (Silberstein et al., 1996; Shyamala et al., 2002). No se ha detectado marca en las células mioepiteliales, ni en el estroma fibroblástico ni en el adiposo (Shyamala et al., 2002). Con la preñez y la aparición de las estructuras lóbulo alveolares hay una disminución en los niveles de PR tanto en lo que respecta al número de células positivas,



como con respecto a la intensidad de la marca (Shyamala et al., 2002). En glándulas mamarias de hembras en preñez avanzada sólo entre un 3-5% del total de las células epiteliales expresa PR. Este resultado sugiere una relación inversa entre el grado de diferenciación y los niveles de expresión de PR. Con la involución, el número de células positivas se incrementa nuevamente a aproximadamente un 20%. Cabe destacar que el total de células positivas para PR en las hembras múltiparas es de aproximadamente 20%; este número es menor al 40% que se detecta en hembras vírgenes de la misma edad (Shyamala et al., 2002).

El análisis de los fenotipos en animales knock-out para PR (PRKO) y ER (ERKO) permitieron discernir los roles de ER y PR en la morfogénesis de la glándula mamaria. La elongación ductal está severamente comprometida en los ratones ERKO, y en los PRKO tratados con anti-estrógenos (Bocchinfuso y Korach, 1997). Esto permitió establecer que la presencia de ER es fundamental para la morfogénesis ductal. Los ratones PRKO, por otra parte, se caracterizan por una falta total de crecimiento y diferenciación lóbulo alveolar (Lydon et al., 1995), incluso en condiciones de administración de estrógenos y progesterona, que en animales genéticamente intactos inducen diferenciación lóbulo alveolar (Figura 3). Por lo tanto, la diferencia más importante a tener en cuenta entre la señalización vía ER y PR es que sólo la proliferación inducida vía progesterona-PR está acoplada al desarrollo de estructuras lóbulo alveolares y diferenciación celular.

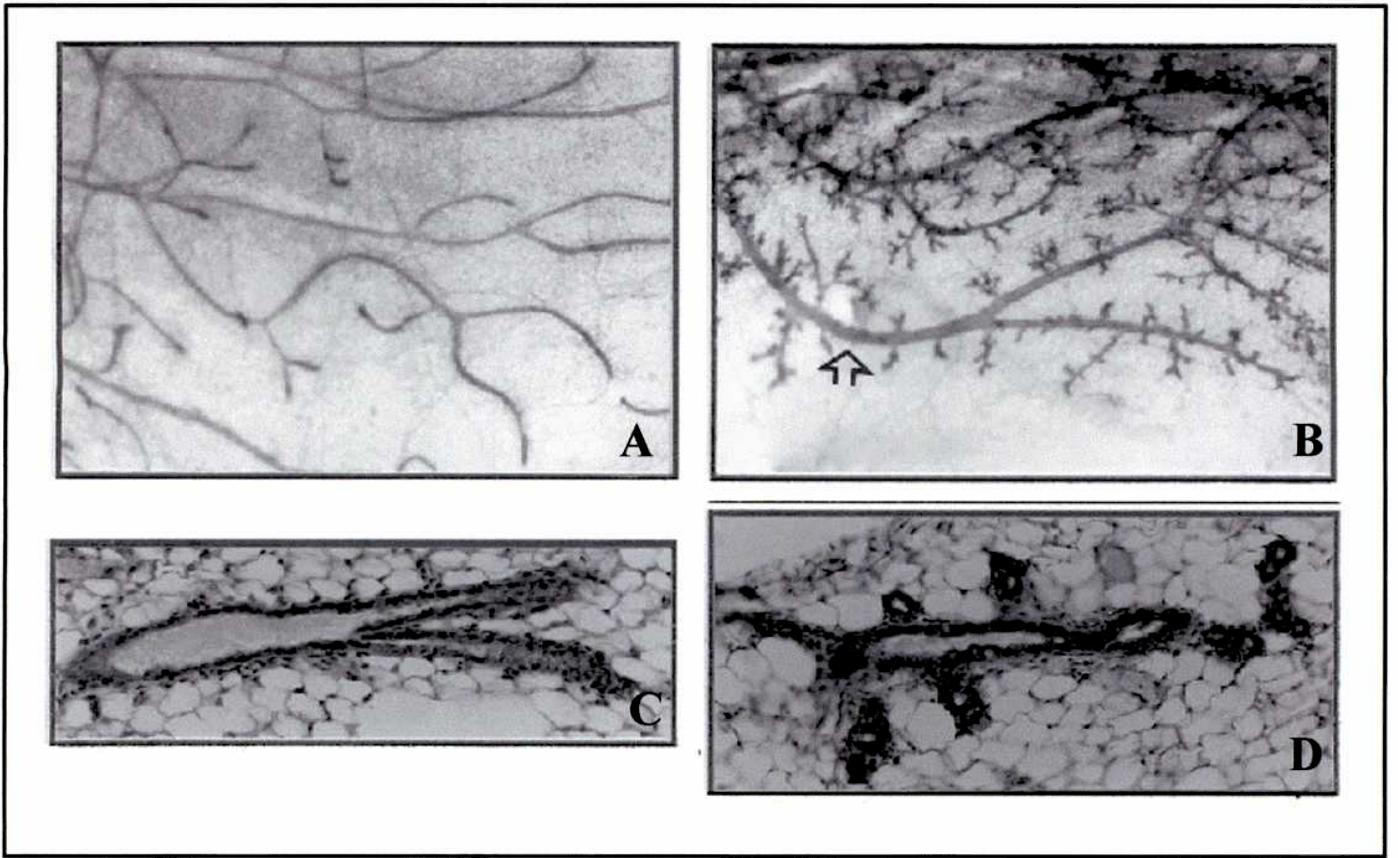
Hasta ahora hemos considerado al PR como único, sin embargo se trata de un gen que codifica para dos isoformas del receptor; la forma A (PR-A) y la forma B (PR-B). Estudios *in*



**Figura 3:** Fenotipo de la glándula mamaria de ratones PRKO.

Los paneles muestran el fenotipo de ratones control y PRKO. En el caso de los animales no tratados las glándulas mamarias de los knock-out muestran una disminución en el grado de ramificaciones laterales. Sin embargo no se ve afectada la elongación ductal. Al ovariectomizar y tratar con estrógeno + progesterona (E+P) en los ratones controles hay un incremento importante en el número de ramificaciones laterales y diferenciación lóbulo alveolar. Esto no se ve en las glándulas de los ratones PRKO tratados con E+P.

*in vitro* han demostrado que las dos isoformas pueden tener funciones diferentes en la misma célula y que la actividad de cada isoforma del receptor puede variar entre distintos tipos celulares (Vegeto et al., 1993). Mas aún, dependiendo del tipo celular, la isoforma A puede tanto inhibir o estimular la actividad de la isoforma B (Vegeto et al., 1993). En base a estas observaciones se cree que una apropiada respuesta a progesterona depende tanto de la expresión como de la actividad de las dos isoformas de PR (Wen et al., 1994). Esto ha sido comprobado tras la generación de ratones transgénicos para cada isoforma del PR. Los ratones que sobre expresan la isoforma A del receptor, denominados transgénicos PR-A, tienen una pérdida del balance de isoforma A:B (normalmente es de 3:1), con una sobreexpresión de la forma A (Shyamala et al., 1998). Estos ratones se caracterizan por tener un aumento en el número de ramificaciones laterales y algunos conductos de excesivo grosor (Figura 4). Este aumento en el número de ramificaciones laterales es comparable al observado en las glándulas mamarias de hembras salvajes preñadas. Estas ramificaciones laterales en muchos casos terminan en estructuras “bulbosas”. El análisis histológico de las hembras transgénicas PR-A reveló que muchos conductos tienen varias capas de células epiteliales, en lugar de una capa de células luminales. Por otra parte el análisis de la membrana basal demostró que la misma no es continua, lo cual indicaría una pérdida de integridad. Mas aún, la E-cadherina también mostró un patrón irregular de expresión, lo cual no es observado en los controles genéticamente no modificados (Shyamala et al., 1998). Estos resultados sugerirían que una apropiada señalización vía PR es necesaria para mantener la integridad de la membrana basal y la adhesión celular.



**Figura 4:** Fenotipo de la glándula mamaria de ratones transgénicos PR-A.

Montaje total y corte histológico de una glándula mamaria de un ratón virgen control (A y C) y de un ratón virgen transgénico ( B y D) de la misma edad (aproximadamente 10 semanas). Es llamativo el incremento de ramificaciones laterales que se observa en la glándula del ratón transgénico en comparación con su control, tanto por montaje total como por métodos histológicos.

Por otra parte los ratones que sobreexpresan la isoforma B del PR (transgénicos PR-B) tienen un fenotipo muy diferente al observado en los transgénicos PR-A (Shyamala et al., 2000). Se caracterizan por una capacidad limitada de crecimiento ductal, sin estar afectada la capacidad de diferenciación lóbulo alveolar.

Estos resultados, junto con los obtenidos con los transgénicos PR-A sugerirían que la vía del PR estaría involucrada en la determinación del destino celular. Esto tendría importantes implicancias en la morfogénesis de la glándula mamaria.

#### **Factores locales:**

##### Los factores de crecimiento polipeptídicos.

Las interacciones epitelio-mesénquima son críticas para el desarrollo ductal y la morfogénesis. Varios factores de crecimiento polipeptídicos juegan un papel como mediadores autócrinos y parácrinos del proceso de desarrollo de la glándula mamaria y otros órganos. Entre ellos un excelente ejemplo de un factor estromal que actúa en sinergismo con la progesterona es el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF o FGF-7). El KGF es secretado por las células estromales pero tiene un efecto sobre la proliferación de las células epiteliales (Finch et al., 1989). La síntesis de KGF está regulada durante los distintos estadios de desarrollo de la glándula mamaria (Coleman-Krnacik y Rosen, 1994); sin embargo, la progesterona no regula la síntesis del KGF, sino la de su receptor, que sólo se expresa en el compartimiento epitelial (Pedchenko y Imagawa, 2000). Las glándulas mamarias de animales

transgénicos para KGF se caracterizan por presentar un fenotipo hiperplásico sugiriendo nuevamente un papel en la morfogénesis (Kitsberg y Leder, 1996). El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF-2) es capaz de actuar a través del mismo receptor que KGF. Este factor de crecimiento se ha detectado en el estroma de la glándula mamaria del ratón y su síntesis está regulada durante el desarrollo de la misma (Coleman-Krnacik y Rosen, 1994). Ratones knock-out para el receptor de FGF de tipo 2 (FGFR2) revelaron una incapacidad de diferenciación lóbulo-alveolar (Jackson et al., 1997), lo cual implicaría a esta vía de señalización como fundamental en esta etapa del desarrollo de la glándula mamaria.

Así como los FGFs, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) también es sintetizado por el estroma de la glándula mamaria del ratón (Yang et al., 1995) y su receptor se encuentra en las células epiteliales; sin embargo no se ha observado una regulación hormonal (Yang et al., 1995). En cultivos tridimensionales el HGF estimula la formación de ramificaciones en células epiteliales de distintos orígenes (Montesano et al., 1991), incluyendo las de glándula mamaria (Niranjan et al., 1995; Yant et al., 1998). Experimentos utilizando oligonucleótidos antisentido del HGF bloquean la morfogénesis en un sistema de cultivo de órgano entero (Yang et al., 1995). Ratones transgénicos para HGF tienen un fenotipo hiperplásico caracterizado por un aumento en la morfogénesis ductal y en el número de brotes terminales (Yant et al., 1998).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también ha sido implicado en el desarrollo de la glándula mamaria (Coleman et al., 1988). Su receptor se expresa en el estroma y parénquima durante el desarrollo ductal; sólo en el parénquima de la glándula diferenciada

(Schroeder y Lee, 1998). La eliminación genética del receptor para EGF permitió concluir que esta vía de señalización es requerida para que el proceso de morfogénesis ocurra *in vivo* (Sebastian et al., 1998; Wiesen et al., 1999); sin embargo, cabe destacar que experimentos de recombinación de tejidos permitieron concluir que sólo la fracción de receptor que se encuentra en el estroma es necesaria para el desarrollo ductal (Wiesen et al., 1999).

Finalmente, el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ha sido implicado tanto en la estimulación (Soriano et al., 1996) como en la inhibición (Silberstein y Daniel, 1987; Daniel et al., 1989) de la morfogénesis. Los receptores para TGF- $\beta$  (tipo I y II) se encuentran tanto en las células epiteliales como en las estromales (Pollard, 2001). Por otra parte, existen tres isoformas de TGF- $\beta$  (1, 2 y 3) que son sintetizadas tanto por el epitelio como por el estroma de la glándula mamaria durante todos los estadios del desarrollo (Robinson et al., 1991); sin embargo la respuesta a los mismos está finamente regulada durante el desarrollo de la glándula mamaria (Pollard, 2001). La generación de animales transgénicos para TGF- $\beta$ 1 confirman un papel para este factor de crecimiento en la inhibición del desarrollo ductal y la diferenciación alveolar (Pierce, Jr. et al., 1993; Jhappan et al., 1993).

Todos estos factores de crecimiento en alguna medida estimulan o inhiben la formación de ramificaciones de células epiteliales de distinto origen. Sin embargo, también están implicados en la estimulación o inhibición de la proliferación celular. Cabe preguntarse si el efecto es solamente sobre la proliferación, o si se está induciendo el proceso morfogénico en sí. La diferencia entre los dos radica en que si sólo se estuviese

estimulando la proliferación celular, entonces estos factores afectarían el número celular, pero no tendrían un rol en los mecanismos que determinan la formación de una estructura tubular. En nuestro laboratorio hemos caracterizado un factor estromal-mioepitelial denominado epimorfina (o syntaxina-2) que a diferencia de los factores de crecimiento polipeptídicos mencionados, no estimula la proliferación celular, pero sí regula la morfogénesis (Hirai et al., 1998).

### La epimorfina

La epimorfina fue originalmente caracterizada como una proteína estromal de superficie con un rol en la morfogénesis epitelial en el embrión (Hirai et al., 1992); un estudio posterior demostró que el mismo gen codifica para una proteína de la familia de la syntaxina (Bennett et al., 1992). La capacidad morfogenética de la epimorfina ha sido implicada en varios procesos, como es el desarrollo de vasos (Oka y Hirai, 1996), del parénquima del hígado (Hirose et al., 1996; Watanabe et al., 1998), y el desarrollo embrionario de los pulmones (Koshida y Hirai, 1997). En la glándula mamaria la epimorfina está presente en la superficie de los fibroblastos y de las células mioepiteliales (Hirai et al., 1998), y por lo tanto es un excelente candidato en la regulación de la morfogénesis de la glándula mamaria. Estudios realizados en geles tridimensionales de colágeno utilizando una línea celular funcionalmente normal de glándula mamaria de ratón denominada SCp2 (Desprez et al., 1993), permitieron caracterizar el rol de la epimorfina en la morfogénesis (Hirai et al., 1998). Cuando es presentada en forma basal y polar, la epimorfina induce la formación de ramificaciones, mientras que cuando es presentada de forma no polar desencadena la

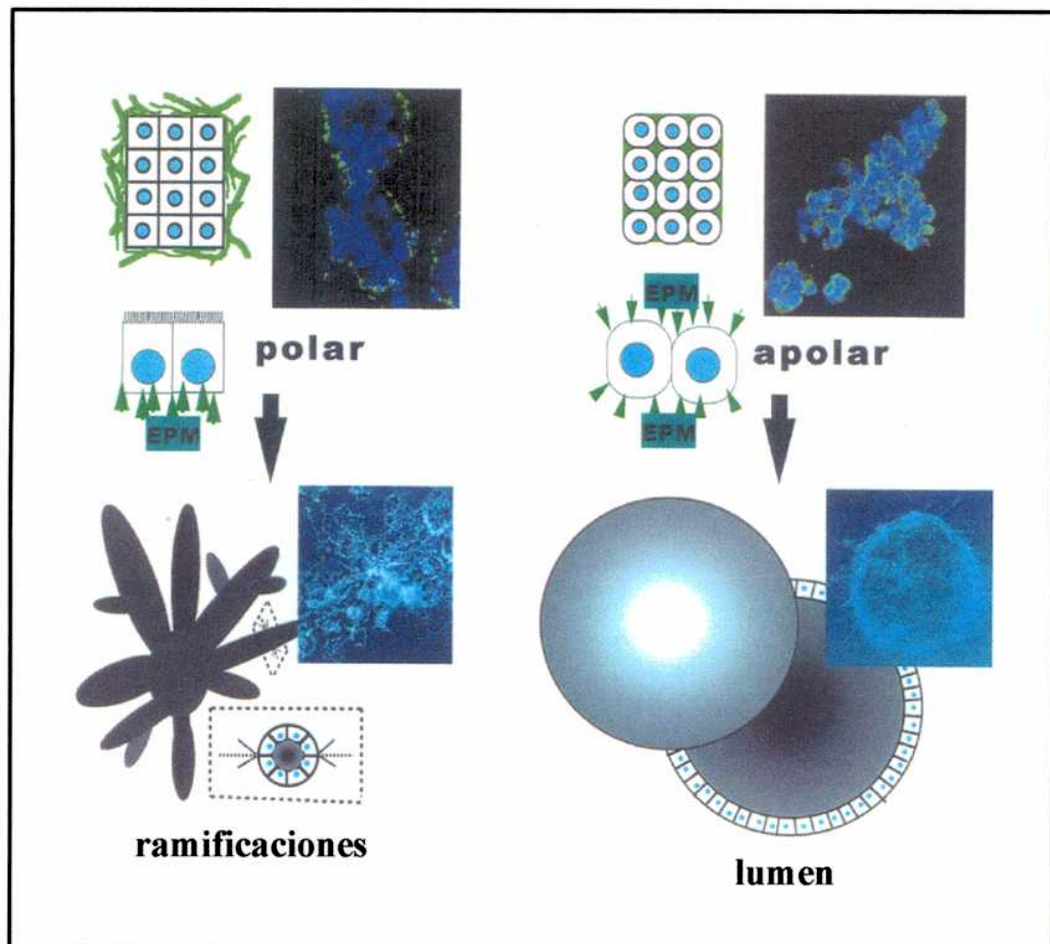


formación de estructuras alveolares (Figura 5). Los mecanismos de esta actividad morfogenética no han sido dilucidados aún, sin embargo se sabe que el factor de transcripción C/EBP $\beta$  es regulado por la epimorfina y podría ser un importante mediador de su actividad morfogenética (Hirai et al., 2001). Los ratones transgénicos para epimorfina se caracterizan por tener un aumento en el tamaño de los conductos mamarios y una expresión aumentada de C/EBP $\beta$  (Hirai et al., 2001). Es más, este factor de transcripción ya ha sido implicado en varios procesos involucrados en el desarrollo (Lekstrom-Himes y Xanthopoulos, 1998). En la glándula mamaria del ratón el papel de C/EBP $\beta$  fue investigado mediante la generación de ratones knock-out para esta proteína (Seagroves et al., 1998; Seagroves et al., 2000). Estos animales se caracterizan por tener glándulas mamarias con conductos agrandados o quísticos, una disminución en el número de ramificaciones laterales y tienen comprometida la capacidad de diferenciación lóbulo-alveolar (Seagroves et al., 1998).

### **La interacción con el medio ambiente.**

#### El rol de la matriz extracelular.

El desarrollo adecuado de la glándula mamaria no sólo depende de sus distintos tipos celulares, sino de cómo las células interactúan con su medio ambiente (Bissell y Ram, 1989). La composición y ensamblaje de la matriz extracelular juega un rol fundamental tanto en el desarrollo como en el funcionamiento de la glándula mamaria. Los conductos mamarios consisten en una capa de células epiteliales luminales asociadas a células mioepiteliales en la parte basal de las mismas. Este tubo está rodeado por una membrana basal y por fuera de ella por una matriz fibrosa intersticial dentro del tejido conectivo laxo. El tejido adiposo, que está



**Figura 5:** Efecto de la epimorfina sobre células epiteliales de mama.

El esquema muestra los efectos de la epimorfina sobre la línea celular de mama SCp2. Al ser presentada en forma polar induce la formación de ramificaciones y al ser presentada en forma no polar induce la formación de un lumen o estructura alveolar. En ambos casos el efecto se ve al cultivar las células en geles de colágeno de tipo I.

constituido por adipocitos y matriz extracelular, está por fuera del estroma periepitelial. Dentro de la unidad ductal, las células mioepiteliales son las que mayor contacto tienen con la membrana basal. Durante el proceso de morfogénesis, que permite la formación de los conductos, se encuentran diferencias en la composición de la membrana basal al comparar los brotes terminales con los conductos ya maduros. Por ejemplo, en los extremos de los brotes terminales el espesor de la membrana basal es mucho menor que en los costados. Es más, el extremo del brote terminal es altamente rico en ácido hialurónico, el cual podría tener un papel en la morfogénesis (Silberstein y Daniel, 1982). Los conductos, por otra parte, tienen una membrana basal formada por colágeno IV, laminina-1 y -5, proteoglicanos y otros componentes como la entactina, vitronectina, y fibronectina (Guelstein et al., 1993).

El rol de los componentes de la membrana basal en la morfogénesis de la glándula mamaria fue estudiado en un principio *in vivo*. El tratamiento de la zona contigua al brote terminal con hialuronidasa lleva a alteraciones en la estructura de los brotes y finalmente a la inhibición de la elongación ductal (Silberstein y Daniel, 1982). Por otra parte, el incremento de los niveles de TGF- $\beta$ 1 (que induce la deposición de componentes de la matriz extracelular (Hoccevar y Howe, 2000)) en la zona de los brotes terminales produce un incremento de los niveles de colágeno IV y glicosaminoglicanos alrededor de los extremos de los brotes. Esto resulta en una inhibición del crecimiento ductal y de la proliferación celular (Silberstein et al., 1990). A raíz de estos resultados, hace ya alrededor de 15 años quedó claro que la morfogénesis de la glándula mamaria depende tanto de la composición como del mantenimiento de la matriz extracelular.

## Las integrinas

Las señales morfogenéticas de la matriz extracelular son transducidas a la célula a través de receptores denominados integrinas. Estos receptores consisten en una subunidad alpha ( $\alpha$ ) y una beta ( $\beta$ ) que forman heterodímeros  $\alpha\beta$ . Las integrinas tienen una subunidad extracelular que se une a componentes de la matriz extracelular, una región transmembrana y una región C-terminal intracelular capaz de mediar señales intracelulares que afectan el comportamiento celular (Clark y Brugge, 1995). En la glándula mamaria se han encontrado varios receptores de laminina del tipo de las integrinas, como el  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$ ,  $\alpha6\beta4$  (Delcomenne y Streuli, 1999; Deugnier et al., 1995; Keely et al., 1995; Mercurio et al., 2001). La integrina  $\alpha6\beta4$ , que se expresa principalmente en células mioepiteliales, pero también es localizada en la superficie de células epiteliales luminales en cultivo, provee el anclaje a la matriz intersticial (Borradori y Sonnenberg, 1996; Stahl et al., 1997; Nievers et al., 1999; Mercurio et al., 2001). La integrina  $\alpha2\beta1$  es la responsable de la adherencia al colágeno de tipo I y IV (Eble et al., 1993; Xu et al., 2000), y también es capaz de reconocer las cadenas  $\alpha1$  y  $\alpha2$  de laminina-1, así como la laminina-5 (Colognato et al., 1997; Orian-Rousseau et al., 1998). En geles tridimensionales de colágeno de tipo I, la morfogénesis inducida por HGF es inhibida por anticuerpos bloqueantes contra las  $\alpha2$  o  $\beta1$ , afectando tanto la interacción célula-matriz extracelular como la interacción célula-célula (Berdichevsky et al., 1992; Alford et al., 1998). El mecanismo de acción del anticuerpo contra  $\beta1$  implica un aumento en la adhesión celular al colágeno, lo que se podría hipotetizar, afectaría la migración y la invasión necesarias para la formación de estructuras tubulares. Por otra parte, la implantación de pellets con anticuerpos bloqueantes contra la subunidad  $\beta1$  en

la glándula mamaria del ratón inducen la regresión de los brotes terminales e inhiben su formación (Klinowska et al., 1999). Estos efectos son específicos sobre los brotes terminales y no afectan el desarrollo de ramificaciones laterales; es más, el efecto es reversible, no altera los niveles de apoptosis ni de proliferación en los brotes terminales. En este trabajo no se pudo determinar si el anticuerpo bloqueante afecta la interacción con el colágeno I, la fibronectina o la laminina. Sin embargo, el tratamiento con anticuerpos anti la cadena  $\gamma 1$  de la laminina también reduce el número de brotes terminales en una forma similar al anticuerpo contra la integrina  $\beta 1$  (Klinowska et al., 1999). Los animales transgénicos que expresan una forma dominante negativa de la integrina  $\beta 1$  bajo el control de un promotor MMTV no exhiben una reducción en el número de brotes terminales, pero sí una disminución en la diferenciación alveolar y en la capacidad de producir leche. Estos efectos están acompañados por un incremento en el número de células apoptóticas en las estructuras alveolares (Faraldo et al., 1998). A pesar de que fue posible detectar la expresión del transgen en la glándula mamaria de animales nulíparos, no se expresó en los brotes terminales. Esto hace difícil la comparación de los resultados obtenidos en los animales transgénicos, con los conseguidos con el anticuerpo bloqueante. A pesar de todo podemos concluir a partir de estos resultados que la interacción entre la laminina y la integrina  $\beta 1$  es importante para el desarrollo de la glándula mamaria *in vivo*. Queda por determinar cuál es realmente su mecanismo de acción.

### **Las metaloproteasas y los componentes de la matriz extracelular.**

Las proteasas extracelulares juegan un rol fundamental en un sinnúmero de procesos relacionados con el desarrollo, así como con el surgimiento de enfermedades. La habilidad

para degradar proteínas de la matriz extracelular es esencial para que una célula pueda interactuar de forma adecuada con su entorno inmediato y así permitir el desarrollo normal de organismos multicelulares. Este concepto era ya evidente años antes de que se observara por primera vez cómo enzimas difundibles producidas por fragmentos de cola de renacuajo eran capaces de degradar geles de colágeno fibrilar (Gross y Lapiere, 1962). Desde aquella primera observación, se ha caracterizado una familia de enzimas que se encuentran desde la hidra hasta el humano, denominadas metaloproteasas de matriz (MMPs). Éstas se caracterizan por 1) depender de iones metálicos para llevar a cabo su actividad catalítica, 2) tener la capacidad de degradar proteínas estructurales de la matriz extracelular y 3) poseer secuencias específicas que las distinguen evolutivamente de otras metaloproteasas (Stocker et al., 1995). Las MMPs también clivan proteínas de la superficie celular y otras proteínas pericelulares que no son parte de la matriz lo que les permiten regular de varias maneras el comportamiento celular (Sternlicht y Werb, 2001).

Dado su rol en la regulación del comportamiento celular, era de esperar que las proteasas tuviesen varios niveles a partir de los cuales se controlaría su producción y actividad. Llevó prácticamente una década desde la primera observación de actividad colagenolítica hasta descubrir que las MMPs son sintetizadas como zimógenos (Harper E et al., 1971), y más aún, para identificar a los inhibidores endógenos de las MMPs, los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) (Bauer et al., 1975). Desde entonces se han descubierto otros niveles de regulación de las MMPs: a nivel transcripcional, a nivel proteico a través de la acción de sus activadores e inhibidores, y por factores que regulan su secreción, su localización en la superficie celular y finalmente su degradación y clearance. Los

organismos superiores expresan múltiples MMPs, cada una con su patrón de expresión, localización, activación, inhibición y degradación. Sin embargo, hay una gran redundancia en cuanto a los sustratos, lo que demuestra una superposición de funciones. Esta redundancia tal vez actúe como un mecanismo de control en caso de pérdida de alguna función regulatoria. Dada su capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular, las metaloproteasas han sido implicadas en procesos invasivos normales y patológicos. Sin embargo, dada la complejidad del sistema y su regulación, los mecanismos moleculares de su acción todavía no han sido comprendidos.

#### MMPs: la superfamilia de las metzicinas.

Las enzimas proteolíticas se clasifican como exopeptidasas o endopeptidasas en función de su capacidad de clivar uniones peptídicas terminales o internas respectivamente. Las endopeptidasas se clasifican en serina, cisteína, aspartil o metaloproteasas basándose en sus mecanismos de acción catalítica y sensibilidad a inhibidores. Las metaloproteasas a su vez se clasifican en función de su secuencia en cinco superfamilias. De estas, la superfamilia de la metzicinas se distingue por una secuencia altamente conservada que contiene tres histidinas que se unen a zinc en el sitio catalítico, y una metionina que está espacialmente por debajo del zinc que se halla en el sitio activo (Stocker et al., 1995). La secuencia de unión al zinc es la siguiente: HEBXHXBGBXHZ, donde los residuos histidina (H), ácido glutámico (E) y glicina (G) no varían; la B representa un residuo hidrofóbico grande, la X es un residuo variable y la Z es un residuo específico para cada familia. Las metzicinas a su vez se subdividen en cuatro familias multigénicas: las serralisinas, las astacinas, las

ADAMs/adamalisinas y las MMPs. Esta clasificación se basa en la identidad del residuo Z, que es una serina en casi todas las MMPs.

### Estructura y función de las MMPs.

Hasta el presente se han identificado 25 MMPs de vertebrados y 22 homólogos humanos (Nagase et al., 1990; Nagase y Woessner, 1999; Sternlicht y Bergers, 2000; Sternlicht y Werb, 2001; Lohi J et al., 2001). Además se han identificado varias MMPs en organismos no vertebrados. En los vertebrados las MMPs tienen por lo general sustratos específicos, aunque hay un gran solapamiento entre distintas MMPs. En consecuencia, entre todas pueden clivar numerosos sustratos extracelulares y casi todos los componentes de la matriz extracelular.

Las MMPs se denominan tanto con nombres comunes, o a través de una nomenclatura numérica (Tabla 1). Además se agrupan de acuerdo a su estructura modular (Figura 6). Todas las MMPs contienen una secuencia de señalización N-terminal o secuencia señal (también denominada dominio “pre”) que es removida una vez que la proteína entra en el retículo endoplasmático. La mayoría de las MMPs son secretadas, sin embargo seis de ellas presentan dominios transmembrana y se expresan en la superficie celular. El dominio “pre” es seguido por un dominio propeptídico “pro” que mantiene la latencia enzimática. Por último contienen un dominio catalítico con la secuencia de unión al zinc conservada (Nagase y Woessner, 1999). A excepción de MMP-7 (matrilisina), MMP-26 (matrilisina-2/endometasa) y MMP-23, todas las MMPs tienen un dominio tipo hemopexina/vitronectina



**Tabla 1**

<b>MMP</b>	<b>Nombre común</b>
MMP-1	Colagenasa-1
MMP-2	Gelatinasa-A
MMP-3	Estromelisina-1
MMP-7	Matrilisina
MMP-8	Colagensas-2
MMP-9	Gelatinasa-B
MMP-10	Estromelisina-2
MMP-11	Estromelisina-3
MMP-12	Metaloelastasa de macrófago
MMP-13	Colagenasa-3
MMP-14	MT1-MMP
MMP-15	MT2-MMP
MMP-16	MT3-MMP
MMP-17	MT4-MMP
MMP-18	Colagenasa-4 ( <i>Xenopus</i> )
MMP-19	RASI-1
MMP-20	Enamelisina
MMP-21	XMMP ( <i>Xenopus</i> )
MMP-22	CMMP (pollo)
MMP-23	
MMP-24	MT5-MMP
MMP-26	MT6-MMP
MMP-27	
MMP-28	Epilisina

**1) MMPs con dominio mínimo.**

MMP-7 y MMP-26



**2) MMPs con dominio hemopexina simple.**

MMP-1, 8, 13, 18, 3, 10, 27, 12, 19, 20 y 22.



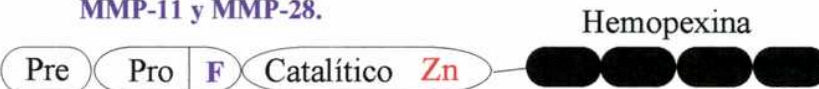
**3) MMPs con dominios de unión a gelatina.**

MMP-2 y MMP-9.



**4) MMPs activadas por furina.**

MMP-11 y MMP-28.



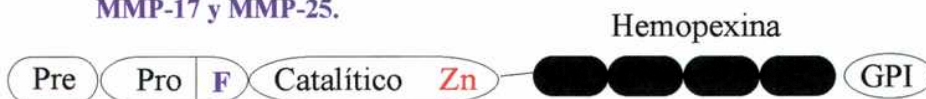
**5) MMPs de membrana.**

MMP-14, 15, 16 y 24.



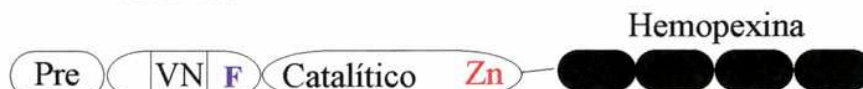
**6) MMPs unidas a GPI.**

MMP-17 y MMP-25.



**7) MMPs con dominio tipo vitronectina.**

MMP-21.



**8) MMPs con dominio rico en cisteína/prolina tipo IL-1.**

MMP-23.



Figura 6: Estructura de las MMPs.

que se conecta al dominio catalítico a través de una región bisagra o linker. MMP-7 y MMP-26 directamente no tienen este dominio, mientras que MMP-23 tiene un dominio único rico en cisteínas, prolínas y dominios tipo receptor tipo II de IL-1 en lugar del dominio hemopexina (Gururajan et al., 1998; Park et al., 2000). El dominio hemopexina afecta la capacidad de unión de los TIMPs, así como la unión de determinados sustratos, la activación a nivel de membrana celular de las MMPs y la actividad proteolítica de las mismas. La región bisagra, por otra parte, varía en longitud y secuencia entre distintas MMPs y también afecta la especificidad por los sustratos (Knauper et al., 1997). Las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9 respectivamente) se distinguen por tener tres dominios ricos en cisteína dentro de su dominio catalítico. Estos dominios se asemejan a los dominios de unión a colágeno tipo IV de la fibronectina y son necesarios para la unión y clivaje de la elastina y el colágeno (Murphy et al., 1994; d'Ortho et al., 1998; Shipley JM et al., 1996). MMP-9 tiene además un dominio extra tipo colágeno de tipo IV al final de su región bisagra para el cual no se ha encontrado una función hasta el momento. Por último las MMPs de membrana, MT-MMPs, tienen un dominio transmembrana y una pequeña cola citoplasmática C-terminal (MMPs 14, 15, 16 y 24) o una región C-terminal hidrofóbica que actúa como una señal de anclaje a membrana tipo glicofosfatidil inositol (GPI) (MMPs 17 y 25) (Itoh et al., 1999; Kojima et al., 2000). Estos dominios tienen una función importante en la regulación de la localización de la actividad proteolítica a regiones específicas de la superficie celular.

#### Regulación de la actividad MMP.

Para cumplir con sus funciones normales o patológicas, las MMPs deben estar presentes en el tipo celular específico, en la correcta localización pericelular, en el momento justo, la cantidad adecuada y además ser activadas o inhibidas apropiadamente. Todo esto requiere una regulación estricta tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. A continuación se explican cada uno de estos niveles de regulación.

#### Regulación a nivel transcripcional.

La función biológica de las MMPs está en gran medida regulada por diferentes patrones de expresión. A pesar de la gran superposición en cuanto a sustratos, las diferencias temporales y espaciales de expresión entre las MMPs les confieren características únicas a cada una. La mayoría de las MMPs están celosamente reguladas a nivel transcripcional, a excepción de MMP-2 que por lo general se expresa de forma constitutiva y está controlada a nivel de activación por un mecanismo particular (Strongin et al., 1995), y en menor medida post-transcripcionalmente a nivel de estabilización de su mRNA (Overall et al., 1991). La expresión basal de MMP-2, MMP-14 (MT1-MMP) y TIMP-2 está co-regulada lo cual es consistente con el rol de MT1-MMP y TIMP-2 en la activación de MMP-2 (explicado más adelante). Es más, las secuencias de los promotores de estas tres proteínas muestran similitudes en cuanto a su regulación transcripcional (Lohi J et al., 2000; Lohi J et al., 2001). En general la expresión génica de las MMPs está regulada por numerosos factores estimulatorios y supresores que afectan varias vías de señalización (Fini et al., 1998). Por ejemplo la expresión de varias MMPs puede ser estimulada o reprimida por esteroides de forbol, señales derivadas de integrinas, proteínas de la matriz extracelular, estrés celular o cambios en la forma de la célula (Kheradmand et al., 1998). El colágeno de tipo I intacto actúa como

un ligando induciendo la expresión de MMP-1 vía una cascada que involucra tirosina quinasas; el efecto contrario se logra cuando la célula percibe los productos de clivaje de colágeno tipo I por parte de MMP-1 (Vogel et al., 1997; Shrivastava et al., 1997). Por lo tanto la expresión de MMP-1 estaría regulada por su sustrato y específicamente reprimida por el producto de su actividad proteolítica. Por otra parte, la expresión de las MMPs es regulada por varias citoquinas y factores de crecimiento como las interleuquinas, los interferones, el EGF, KGF, NGF bFGF, VEGF, PDGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y el inductor de MMPs o EMMPRIN (Fini et al., 1998). Muchos de estos estímulos inducen la expresión y/o activación de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*, que se heterodimerizan y unen a sitios “activadores de proteína-1” (AP-1) dentro de los promotores de los genes de varias MMPs. El caso del TGF- $\beta$  es un claro ejemplo de cómo una señal puede tener efectos particulares sobre distintas MMPs. En este caso el TGF- $\beta$ 1 suprime la transcripción de MMP-1 y MMP-3 pero induce la expresión de MMP-13 (Uria et al., 1998). Además, algunas MMPs se expresan en un tipo celular muy reducido y determinado, como es el caso de la MMP-20 que parece estar restringida a células presentes durante el desarrollo dental (Sternlicht y Bergers, 2000) y MMP-9 que se expresa mayormente en osteoclastos, macrófagos, trofoblastos, neuronas del hipocampo y queratinocitos migratorios en los bordes de heridas en procesos de cicatrización (Mohan et al., 1998; Munaut et al., 1999). La inducción célula específica de MMPs también ha sido observada *in vitro*; por ejemplo los ésteres de forbol inducen la expresión de MMP-3 en fibroblastos y de MMP-10 en queratinocitos (Windsor et al., 1993). Por lo tanto la forma en que se regula la expresión de una MMP no sólo depende de la organización de su promotor, sino también de la presencia o ausencia de otras señales, es decir, del contexto celular.

Varios elementos regulatorios actúan en *cis* influenciando la expresión génica de las MMPs. Entre ellos ya hemos mencionado a los sitios AP-1. También se han hallado sitios Ets adyacentes a los sitios AP-1, y en algunos casos éstos actúan en forma sinérgica, como en el caso de la MMP-1, pero no, por ejemplo, en el caso de MMP-13 (Pendas et al., 1997). Esto sería consecuencia de una mayor distancia entre los dos sitios en el caso de la MMP-13, con lo cual ya no se lograría el efecto sinérgico (Gutman y Wasylyk, 1990). Como indicación de la importancia de estos sitios, la eliminación del factor de transcripción Ets2 en ratones llevó a letalidad embrionaria temprana, con una expresión deficiente de MMP-9. Cultivos de fibroblastos embrionarios de estos ratones también expresaron bajos niveles de MMP-3 y MMP-13 (Yamamoto et al., 1998). Se han identificados otros elementos en los promotores de varias MMPs, como por ejemplo un sitio específico de osteoblastos en el promotor de MMP-13, se trata de un elemento que responde al “core binding factor 1” o CBFA1 (Jimenez et al., 1999); un sitio regulado por  $\beta$ -catenina del tipo LEF/TCF cerca del sitio de iniciación de la transcripción de MMP-7 (Crawford et al., 1999); elementos inhibitorios para TGF- $\beta$ ; y finalmente sitios AP-2, Sp1, Sp3, NF- $\kappa$ B, CBP/ $\beta$  y sitios de respuesta a ácido retinoico (Fini et al., 1998; Lohi J et al., 2000; Ludwig et al., 2000). Por otra parte se ha identificado un sitio de unión a p53 en el promotor de MMP-2 (Bian y Sun, 1997). A pesar de la identificación de todos estos sitios regulatorios en las regiones de los promotores de las MMPs, poco se entiende de cómo estas vías interactúan entre sí y llevan a una regulación integral de la expresión de las MMPs.

#### Regulación a nivel post-transcripcional.

Mecanismos post-transcripcionales pueden regular la expresión de las MMPs. Por ejemplo, los mRNA que codifican para MMP-1 y MMP-3 son estabilizados por ésteres de forbol y el EGF, mientras que los de MMP-13 son estabilizados por PDGF y glucocorticoides y desestabilizados por el TGF- $\beta$  (Delany et al., 1995; Vincenti, 2001). El turnover del mRNA de MMP-1 estaría regulado por secuencias ricas en AU en las zonas 3' no traducidas; secuencias similares podrían llegar a regular la estabilidad de los mensajeros de otras MMPs (Vincenti, 2001). Por otra parte, la forma soluble y proteolíticamente activa de MT3-MMP se generaría por splicing alternativo más que por su liberación de la membrana celular. Las formas alternativas de MMP-13, MMP-17 y MMP-20 se generarían por poliadenilación alternativa (Sternlicht y Werb, 1999).

#### Regulación de la secreción.

Aunque la mayoría de las MMPs se secretan en forma constitutiva, en algunos casos particulares existen mecanismos de control de la secreción. MMP-8 y MMP-9 son sintetizadas por granulocitos en diferenciación en la médula ósea, almacenadas en gránulos específicos de los neutrófilos circulantes y liberadas tras la activación de los neutrófilos por parte de mediadores inflamatorios (Hasty et al., 1990). En los macrófagos, la plasmina y la trombina inducen la secreción de MMP-12 por parte de los macrófagos sin alterar la velocidad de transcripción (Raza et al., 2000).

#### Activación de MMPs latentes.

Las MMPs se sintetizan como proenzimas inactivas o zimógenos. La latencia se mantiene por el grupo sulfhidrilo cisteína cerca de extremo C-terminal del dominio

propeptídico. Este grupo sulfhidrilo actúa como un cuarto ligando para el ion zinc del sitio activo, y la activación de la MMP requiere que se elimine la interacción cisteina-zinc a través de la remoción proteolítica del dominio propeptídico o por perturbación ectópica de esta interacción (Van Wart y Birkedal-Hansen, 1990). Una vez eliminado, el grupo tiol es reemplazado por una molécula de agua que puede entonces atacar las uniones peptídicas que son los blancos de acción de las MMPs.

A pesar de que casi todas las MMPs se secretan como zimógenos latentes, hay algunas excepciones. Por ejemplo, la MMP-11 y MMP-27 y las MT-MMPs contienen una secuencia RXX/RR de reconocimiento por enzimas de tipo furina entre sus sitios propeptídicos y los catalíticos. Esto permite que sean activadas intracelularmente por serina proteasas antes de ser secretadas o llegar a la superficie celular (Pei y Weiss, 1995). En el caso de la MMP-23 no está presente la cisteína que es requerida para la latencia de la enzima (Gururajan et al., 1998). Todas las demás MMPs no poseen esta secuencia de activación intracelular y son activadas en el espacio extracelular.

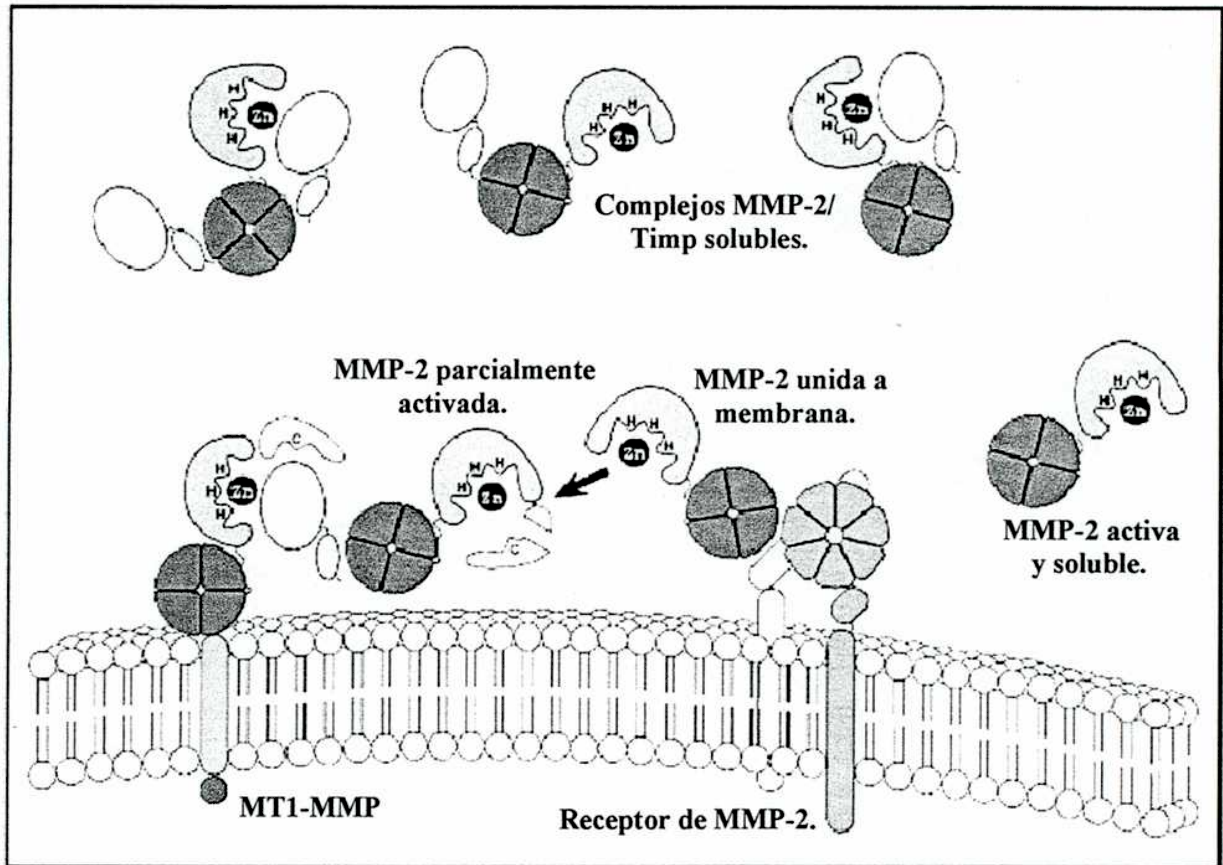
La activación de las MMPs puede darse por la acción de otras MMPs ya activadas, o por serina proteasas que pueden clivar uniones peptídicas dentro de los prodominios de las MMPs (Woessner y Nagase, 2000). En el caso de MMP-2 en particular, la activación se realiza en la superficie celular por un mecanismo que involucra a MT-MMPs y TIMP-2 (Strongin et al., 1995). MT1-MMP es la más eficiente activadora de MMP-2, mientras que MT4-MMP (en el caso del humano) y MT2-MMP son las únicas MT-MMPs que no son capaces de activar MMP-2 (Zucker et al., 1998; Miyamori et al., 2000; English et al., 2000).



El mecanismo, explicado gráficamente en la Figura 7, consiste en la unión de TIMP-2 a través de su extremo N-terminal a la MT-MMP. El extremo C-terminal de TIMP-2 queda libre y es capaz de actuar como un receptor para unir el dominio hemopexina de pro-MMP-2. Una vez lograda esta interacción, una MT-MMP adyacente que no está unida a un TIMP-2 cliva parte del pro-dominio de MMP-2 y la misma es activada parcialmente. La formación de una MMP-2 totalmente madura y activa se da al clivarse una porción residual del pro-péptido por otra MMP-2 ya activa (Deryugina et al., 2001). El rol de TIMP-2 en la activación de MMP-2 es su principal función *in vivo*. Mientras que el extremo C-terminal de TIMP-2 participa en el anclaje y activación de MMP-2, su extremo N-terminal actúa como inhibidor de la actividad MMP. Por lo tanto, niveles bajos de TIMP-2 promueven la activación de MMP-2, mientras que niveles más altos inhiben esta acción ya que saturan e inhiben las moléculas de MT-MMP libres necesarias para clivar el pro-dominio de MMP-2 (Strongin et al., 1995). Es interesante resaltar que los niveles de proteína de TIMP-2 son reducidos y la activación de MMP-2 es aumentada en presencia de colágeno de tipo IV, un sustrato de MMP-2 (Maquoi et al., 2000).

### Inhibidores endógenos de las MMPs.

Los TIMPs representan una familia de por lo menos cuatro proteínas secretadas de entre 20-29 kDa (TIMPs 1 a 4) que inhiben en forma reversible a las MMPs en una relación estequiométrica de 1:1. Comparten una homología de secuencia de entre el 37-51%, con 12 cisteínas posicionadas de forma muy similar. Estas cisteínas forman seis puentes disulfuro intracatenarios para dar seis loops y una estructura final de dos dominios. Porciones del



**Figura 7:** Esquema ilustrativo del mecanismo de activación de MMP-2 por MT1-MMP.

Activación de MMP-2 en la superficie celular. Una molécula de MT1-MMP activada es inhibida por TIMP-2 y el dominio hemopexina de una molécula de Pro-MMP-2 se une a la región C-terminal de TIMP-2 para formar un complejo tripartito. A continuación una molécula de MT1-MMP no inhibida activa parcialmente a Pro-MMP-2 clivando la mayor parte del propéptido. La región restante del propéptido es eliminada por otra molécula de MMP-2 activa que está unida a membrana. La nueva molécula de MMP-2 activa puede ser ahora liberada o unida a otro receptor de membrana.

dominio N-terminal son las que interactúan con el sitio catalítico de las MMPs (Murphy y Willenbrock, 1995), aunque ambos dominios son necesarios para establecer la unión enzima-inhibidor (Willenbrock y Murphy, 1994). Los distintos TIMPs difieren en su capacidad de inhibir los distintos MMPs (Woessner y Nagase, 2000). Por ejemplo, TIMP-2 y 3 inhiben la acción de MT1-MMP, mientras que TIMP-1 no es capaz de hacerlo. TIMP-1 es un inhibidor pobre de MT3-MMP y TIMP-3 parece ser un inhibidor más potente de MMP-9 que los demás TIMPs. Por otra parte, los TIMPs difieren en su regulación a nivel transcripcional y sus patrones de expresión varían en distintos tejidos (Edwards, 2001).

Además de actuar como inhibidores de las MMPs, los TIMPs promueven el crecimiento celular independientemente de su capacidad inhibitoria de MMPs. TIMP-1 fue inicialmente clonada como un factor potenciador de eritrocitos o EPA, y desde entonces TIMP1, 2 y 3 han demostrado ser mitogénicos para varios tipos celulares (Gomez et al., 1997). Esta actividad mitogénica persiste a pesar de la introducción de mutaciones que eliminan su capacidad inhibitoria de la actividad MMP, sugiriendo que estas actividades son independientes (Hoegy et al., 2001). No se han detectado, sin embargo, receptores para TIMPs, sugiriendo que estos actuarían alterando moléculas capaces de dar señales a las células.

Los Timps no son los únicos inhibidores de MMPs. La  $\alpha$ 2-macroglobulina es un potente inhibidor endógeno de las MMPs (Sottrup-Jensen y Birkedal-Hansen, 1989). Dado que esta proteína es muy abundante en el plasma, representa el mayor inhibidor de MMPs en los fluidos tisulares, mientras que se cree que los TIMPs tendrían una función más local

dentro de los tejidos en sí. Los complejos  $\alpha$ 2-macroglobulina/MMP son sacados de circulación por endocitosis tras su unión a receptores “scavenger”, con lo cual la  $\alpha$ 2-macroglobulina tendría un rol importante en la eliminación irreversible de las MMPs, mientras que el efecto de los TIMPs sería reversible.

#### Localización pericelular de la actividad proteolítica.

Muchas de las señales extracelulares que regulan el comportamiento celular ocurren a nivel de la membrana o muy cerca de ella; es más, muchas de estas señales son creadas o canceladas mediante proteólisis pericelular (Werb, 1997). Por lo tanto, ya que es un proceso irreversible, la proteólisis parece ser un mecanismo adecuado para regular señales extracelulares. Hay mecanismos específicos que tienen como función concentrar a las proteasas en la vecindad de la membrana celular. Entre ellos se halla la expresión de las MT-MMP; la unión de MMPs a receptores de membrana; la presencia de receptores de membrana para las enzimas responsables de la activación de las MMPs y la concentración de MMPs sobre moléculas de la matriz extracelular en las inmediaciones de la célula. Estos mecanismos favorecen la activación de las MMPs, limitan el acceso de los inhibidores de las MMPs, concentran a las MMPs en la zona donde se encuentran sus blancos de acción, y limitan la proteólisis a regiones discretas del entorno pericelular.

#### Los sustratos de las MMPs.

Numerosos componentes de la matriz extracelular han sido identificados como sustratos de MMPs *in vitro*, aunque hasta el momento muy pocos de ellos han sido confirmados *in vivo*. La Tabla 2 muestra los sustratos conocidos hasta el año 2001 (Sternlicht y Werb, 2001). Sin embargo las MMPs también son capaces de clivar proteínas circulantes, de la superficie celular y de ubicación pericelular, con lo cual su capacidad de regular el comportamiento celular es amplio. Estos mecanismo afectan tanto la interacción célula-matriz como la de célula-célula; implican la activación o inactivación de moléculas capaces de proveer señales parácrinas o autócrinas y la modificación de receptores de la superficie celular.

#### **La remodelación de la matriz extracelular y la regulación del comportamiento celular.**

La degradación de la matriz extracelular puede interpretarse por un lado, como el mero clivaje y remodelación de barreras estructurales que permiten que se lleve a cabo la invasión celular, tanto en procesos relacionados con el desarrollo, así como durante la invasión por parte de células neoplásicas. Sin embargo, la matriz extracelular no tiene sólo una función estructural para el tejido; sus componentes afectan el comportamiento celular secuestrando factores como los de crecimiento, y actuando como ligandos para receptores de adhesión, como las integrinas, que son capaces de transducir señales al interior de la célula (Streuli, 1999). La matriz extracelular controla procesos tan básicos como la forma que adopta la célula, su movimiento, crecimiento, diferenciación y supervivencia (Lukashev y Werb, 1998). Por lo tanto, es de esperar que las MMPs tengan efectos sobre estos mismos procesos ya que alteran la composición y estructura de la matriz, alterando por los tanto las

MMP	1	2	3	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	26
Proteína de la MEC															
Agregano															
Colágeno I															
Colágeno II															
Colágeno III															
Colágeno IV															
Colágeno V															
Colágeno VI															
Colágeno VII															
Colágeno VIII															
Colágeno IX															
Colágeno X															
Colágeno XI															
Colágeno XIV															
Decorina															
Elastina															
Fibractina															
Fibrilina															
Fibronectina															
Fibulina															
Gelatina I															
Haminina															
Osteonectina															
Tenascina															
Vitronectina															

Tabla 2

señales que la misma provee a la célula. Es más, la acción de las MMPs permite la liberación de productos de la matriz extracelular que tienen actividad biológica. Por ejemplo, la degradación del colágeno fibrilar permite la exposición de sitios RGD que pueden ser ligados por las integrina  $\alpha v\beta 3$ , y esta interacción promueve la supervivencia y el crecimiento de células de melanoma (Petitclerc et al., 1999). Por otra parte el clivaje de laminina-5 por MMP-2 genera un fragmento de la cadena  $\gamma 2$  denominado  $\gamma 2x$  que induce la motilidad de células epiteliales de mama (Giannelli et al., 1997). Las moléculas de la matriz extracelular también actúan como reservorio para factores de crecimiento y citoquinas que son liberados tras la degradación de la matriz. Por ejemplo, la decorina, un proteoglicano asociado al colágeno, actúa como depósito de TGF- $\beta$ , y su degradación por parte de las MMPs permite la liberación de este factor de crecimiento para poder llevar a cabo sus funciones biológicas (Imai et al., 1997). Una de estas funciones es inhibir la expresión de varias MMPs. A otro nivel, MMP-2 y MMP-9, localizadas en la superficie celular, son capaces de activar la forma latente del TGF- $\beta$  (Yu y Stamenkovic, 2000).

Además de permitir la liberación y activación de factores de crecimiento, las MMPs también pueden clivar receptores de la superficie celular. MMP-2, por ejemplo, es capaz de liberar un fragmento del receptor de tipo 1 de FGF; este fragmento conserva la capacidad de unión al ligando y podría afectar los niveles disponibles de FGF en circulación (Levi et al., 1996). Por otra parte también pueden afectar proteínas involucradas en adhesión célula-célula, como es el caso de la E-cadherina. MMP-3 y MMP-7 son capaces de clivar la E-cadherina y el fragmento liberado altera la agregación celular y promueve la invasión en forma parácrina e independiente del evento de clivaje en sí (Lochter et al., 1997a; Noe et al.,

2001). Por último las MMPs pueden clivar otras proteasas como es el caso de las serina proteasas plasminógeno y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) (Sternlicht y Werb, 1999). En ambos casos el clivaje crea un producto biológicamente activo.

### **Las metaloproteasas en el desarrollo de la glándula mamaria.**

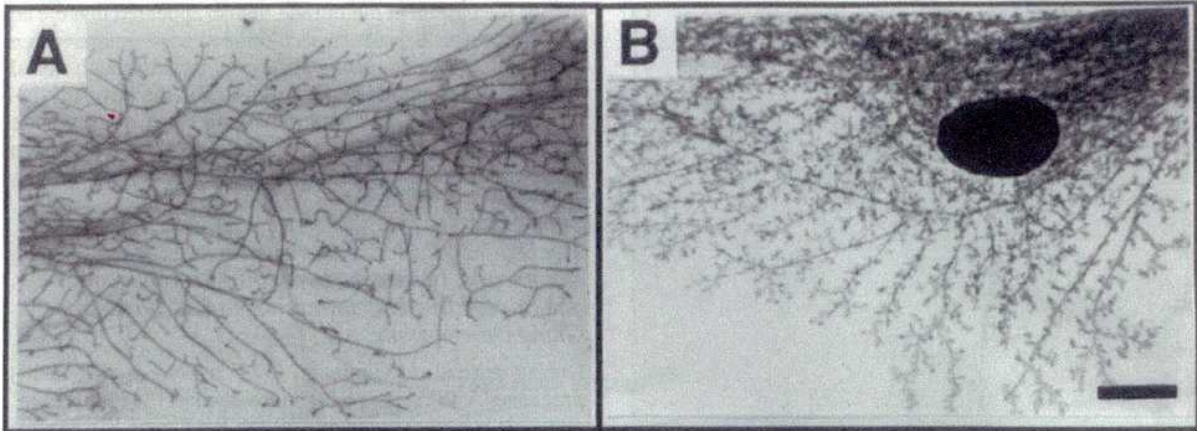
La morfogénesis de la glándula mamaria implica un proceso invasivo, donde el epitelio forma conductos que penetran el estroma adiposo. Dado que las MMPs están involucradas en la remodelación de la matriz extracelular, es reconocida su capacidad de facilitar la invasión celular, tanto en procesos patológicos como fisiológicos (Egeblad and Werb, 2002; Nelson et al., 2000). La expresión y activación de las metaloproteasas está regulada tanto temporal como espacialmente. Su actividad ha sido implicada en el desarrollo de los pulmones (Infeld, 1997; Kheradmand et al., 2002), el riñón (Kanwar et al., 1999) y la glándula salivar (Fukuda et al., 1988). En la glándula mamaria el mRNA y la actividad de las MMPs está correlacionada con la morfogénesis (Talhok et al., 1991; Fata et al., 1999). Los niveles de estromelina-1 (Str-1) y gelatinasa A correlacionan con el desarrollo ductal que se da con la llegada de la pubertad; los niveles más altos de mRNA son detectados alrededor de los brotes terminales y cerca de los extremos de las ramificaciones (Witty et al., 1995). Esta misma distribución de la marca para MMPs se encuentra durante la preñez (Witty et al., 1995). Durante la lactancia los niveles de MMPs se reducen y vuelven a subir durante la involución; la estromelina-1 y 3, la gelatinasa A y el uPA aumentan tras cesar la lactancia (Talhok et al., 1992) y son responsables de la degradación de la matriz extracelular y la concomitante inducción de apoptosis que lleva a la pérdida de funcionalidad y remodelación



tisular (Lund et al., 1996). Estudios de hibridación *in situ* revelaron que las MMPs son sintetizadas por los fibroblastos estromales y periductales que rodean los alveolos colapsados, sugiriendo que la fase degradativa de la involución implica una interacción epitelio-mesenquimal.

Con el objetivo de evaluar cuál era el resultado de alterar la proporción de MMPs en la glándula mamaria se crearon ratones transgénicos que sobre expresan la forma activa de la Str-1. Se encontró que las glándulas mamarias de ratones hembra vírgenes tienen un desarrollo ductal y diferenciación alveolar precoz (Figura 8) (Sympson et al., 1994; Witty et al., 1995). Por otra parte se observa una pérdida parcial de la membrana basal al analizar componentes como la laminina y el colágeno IV (Thomasset et al., 1998). Exámenes histológicos de glándulas de ratones durante la preñez revelan un colapso de las estructuras alveolares, proceso que normalmente se da al concluir la lactancia. Se detecta también un aumento en el número de células apoptóticas y una reducción en la cantidad de leche producida. Todas estas características sugieren un proceso de involución precoz.

Los ratones transgénicos para MT1-MMP también mostraron un fenotipo hiperplásico (Ha et al., 2001). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado con los ratones transgénicos para Str-1, el fenotipo se hizo evidente tras sucesivas preñeces. Se detectaron hiperplasias ductales, disrupción de las estructuras alveolares, fibrosis periductal y eventualmente cambios displásicos en el epitelio ductal, hiperplasias y adenocarcinomas. Los autores no mencionan en el trabajo un fenotipo en la glándula mamaria del ratón virgen.



**Figura 8:** Fenotipo de la glándula mamaria de ratones transgénicos para Str-1.

Montaje total de glándula mamaria de un ratón virgen control (A) y de un ratón transgénico para Str-1 (B). Como en el caso de los ratones transgénicos PR-A, es llamativo el incremento en el número de ramificaciones laterales y diferenciación lóbulo alveolar que se observa en el transgénico para Str-1 respecto de su control.

A diferencia de lo observado para Str-1 y MT1-MMP, en el caso de los ratones transgénicos para matrilisina (MMP-7) no se detectó un fenotipo explícito en cuanto a la morfogénesis de la glándula mamaria. En cambio estos animales se caracterizan por tener una producción precoz de leche (Rudolph-Owen et al., 1998). Dado que la matrilisina, como la Str-1 son miembros de la misma familia de MMPs, son capaces de degradar muchos de los mismos componentes de la matriz extracelular y clivar moléculas como la E-cadherina, involucrada en la adhesión celular, resulta sorprendente las diferencias encontradas entre ambos animales transgénicos. Una mayor comprensión de los mecanismos de acción de ambas MMPs permitirá dilucidar porqué una resulta morfogénica y la otra no.

### **Modelos experimentales.**

La membrana basal no solo da estructura al tejido, sino que confiere a las células señales de polaridad, supervivencia, crecimiento, diferenciación, apoptosis y regulación de la expresión génica (Boudreau y Bissell, 1998; Hansen y Bissell, 2000). Cómo estas señales se integran para regular la formación de un tubo está siendo actualmente descifrado utilizando cultivos tridimensionales y animales transgénicos. Los primeros permiten al experimentador manipular factores individuales y así ver cuál es el efecto sobre el sistema con el que se está trabajando. Este tipo de enfoque no es siempre posible de realizar *in vivo* ya que las variables por manejar son infinitas. Los modelos de cultivos utilizados por lo general evalúan la capacidad de formar ramificaciones por parte de células de cultivos primarios provenientes de mamoplastías, en el caso de utilizar material humano, o glándula

mamaria de ratón. También hay disponibles varias líneas celulares de mama humana y ratón que son no tumorigénicas y son funcionalmente normales. La inducción de la formación de las ramificaciones por lo general involucra la adición de uno o más factores difusibles en un medio químicamente definido. La tridimensionalidad del sistema se logra cultivando las células en matrices que pueden ser de colágeno tipo I, laminina o fibronectina. También se ha utilizado ampliamente un gel rico en laminina denominado Matrigel, que se obtiene de un tumor de ratón. Ni los factores solubles ni los geles tridimensionales individualmente son capaces de inducir la formación de conductos, lo cual sólo confirma la hipótesis de que tanto la estructura como los factores solubles son indispensables para una morfogénesis adecuada.

En el laboratorio de la Dra Mina Bissell hace ya muchos años que se trabaja en dilucidar el rol de la matriz extracelular y las MMPs en la morfogénesis de la glándula mamaria. A mediados de los años 90 se generaron ratones transgénicos para Str-1 y se observó en los mismos un fenotipo hiperplásico (Simpson et al., 1994). Simultáneamente, trabajos *in vitro* utilizando modelos de cultivos tridimensionales permitieron establecer que la epimorfina actúa como un factor morfogénico en la glándula mamaria (Hirai et al., 1998; Hirai et al., 2001). Por otra parte, la Dra G. Shyamala, que trabaja en la misma División del Lawrence Berkeley National Laboratory, generó independientemente ratones transgénicos que sobre expresan la isoforma A (PR-A) o B (PR-B) del PR (Shyamala et al., 1998). El fenotipo observado en el transgénico PR-A fue muy similar al encontrado en el transgénico para Str-1, sugiriendo un posible rol del PR en la regulación de la actividad proteolítica en la glándula mamaria.

La posibilidad de realizar cultivos tridimensionales, junto con la caracterización de animales transgénicos, son una valiosa herramienta para establecer cuál es el mecanismo de acción e interrelación entre las MMPs, los factores de crecimiento polipéptidos, la epimorfina y las hormonas estrógenos y progesterona en la morfogénesis de la glándula mamaria del ratón.

# *Objetivo e Hipótesis*

## Objetivos

El objetivo de este trabajo fue evaluar cuán protagónico es el rol de las metaloproteasas en la morfogénesis de la glándula mamaria del ratón. Se investigó utilizando un sistema *in vitro* si las metaloproteasas son esenciales para la formación de ramificaciones en geles de colágeno de tipo I. Por otra parte se evaluó cual es la relación entre las metaloproteasas, los factores de crecimiento polipeptídicos y la epimorfina, un agente morfogenético. El objetivo de la segunda parte del trabajo fue investigar si las hormonas esteroideas, estrógeno y progesterona regulan la actividad proteolítica de la glándula mamaria. En particular se hizo énfasis en la vía del PR en vista de los fenotipos encontrados en los ratones PRKO y transgénicos PR-A.

## Hipótesis

Esperamos encontrar que las metaloproteasas juegan un rol importante en la formación de ramificaciones *in vitro*, en vista de los resultados encontrados con los animales transgénicos para Str-1, que demostraron que la misma es morfogenética en la glándula mamaria. Por otra parte suponemos encontrar una relación entre los factores de crecimiento, la epimorfina y las metaloproteasas si todas ellas están coordinadas para regular el proceso morfogenético. Por último respecto del rol de la vía del PR y la actividad MMP, esperamos encontrar una regulación positiva por parte de PR, en vista de los fenotipos encontrados en los animales knock-out y transgénicos.

# *Materiales y Métodos*



## **Materiales y Métodos**

### **Preparación de organoides primarios de glándula mamaria de ratón.**

Los organoides primarios fueron preparados de ratones hembra vírgenes de 10 semanas de vida de la cepa CD-1. Brevemente, la glándula inguinal fue extirpada en condiciones de esterilidad, cortada en forma mecánica y luego digerida enzimáticamente con una solución de 0.2% tripsina (Life technologies), 0.2% colagenasa A (Boehringer Mannheim) en medio de cultivo DMEM/F12 (1:1, Life Technologies), 5% suero fetal bovino, 5 µg/ml de insulina (Sigma) y 50 µg/ml de gentamicina (Life Technologies) (medio de crecimiento). La suspensión celular resultante fue centrifugada a 80 Xg durante 10 minutos. Después de descartar el sobrenadante que contenía tejido adiposo, el pellet de células fue resuspendido en medio de crecimiento suplementado con 1000 U de DNasa I, incubado durante 2 minutos a temperatura ambiente y lavado con medio de crecimiento. La separación de la fracción unicelular (compuesta mayoritariamente de fibroblastos estromales) de los organoides epiteliales se realizó por centrifugación diferencial en medio DMEM/F12 en ausencia de suero. Se centrifugó 10 veces a 50 segundos a 80 Xg. Para cultivar los fibroblastos, el sobrenadante de la primera centrifugación diferencial fue sembrado en placas de cultivo de 10 cm de diámetro.

### **Preparación de los cúmulos de células SCp2.**

La línea celular de glándula mamaria de ratón, SCp2 (Desprez et al., 1993) fue mantenida de rutina en medio de crecimiento. Los cúmulos epiteliales fueron preparados como se describió previamente (Hirai et al., 1998). Brevemente, 250 µl de 2% agarosa

preparada en PBS fueron agregados a los posillos de una placa de 24. Después de que la agarosa solidificó, se agregaron 1.5 ml de medio de crecimiento y se incubó la placa a 37°C durante 30 minutos. Este medio fue luego descartado y se reemplazó por una suspensión de  $5 \times 10^4$  células en 500  $\mu$ l de medio de crecimiento con 1000 U de Dnasa I (Sigma). La placa se incubó con rotación suave (100 rpm) a 37°C durante 24 horas. Terminada la incubación, las células habían formado cúmulos celulares redondeados de aproximadamente 150-200  $\mu$ m de diámetro. Las células que no se incorporaron a los cúmulos fueron eliminadas por centrifugación diferencial.

### **Cultivos tridimensionales.**

Los organoides primarios y los cúmulos de células SCp2 se embebieron en una matriz de colágeno de tipo I (Hirai et al., 1998). Para ello se mezclaron colágeno ácido-soluble (8 volúmenes de una solución 0.5%, Cellagen<sup>TM</sup> AC-5, ICN) con 1 volumen de DMEM/F12 10X y un volumen de NaOH 0.1N. En cada hoyo se preparó una capa basal de colágeno, y una superior que contuvo las células. Para permitir la solidificación de la capa inferior, se agregaron 100  $\mu$ l de la solución de colágeno en cada hoyo de una placa de 48 y se incubó la misma durante 15 minutos a 37°C. Los organoides o cúmulos epiteliales fueron resuspendidos en DMEM/F12 a una concentración de 2500-4000 organoides/ cúmulos por ml y se mezclaron con 5 ml de la solución de colágeno fría. Esta mezcla (100  $\mu$ l) se vertió sobre la capa basal de colágeno ya solidificada y la placa se colocó de inmediato a 37°C. Esto permitió obtener entre 40-80 organoides/ cúmulos por hoyo. Una vez solidificada la capa superior se agregaron 200  $\mu$ l de medio químicamente definido que consistió de DMEM/F12, suplementado con Nitrodoma NS (suplemento para medio de cultivo (Boehringer

Mannheim)) e ITS (insulina/ transferrina/ selenito, Sigma). Los factores de crecimiento utilizados fueron: factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos de tipo básico (bFGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (todos de Collaborative Research) a una concentración final de 50 ng/ml. Experimentos previos a la realización de este trabajo permitieron determinar que 50 ng/ml era una concentración adecuada para realizar los experimentos de morfogénesis (Lochter y Bissell, resultados no publicados). El factor transformante beta -1 (TGF- $\beta$ 1; R&D Systems) se utilizó a una concentración final de 20 ng/ml. Todos los reactivos fueron agregados a los organoides de forma inmediata, tras la solidificación del colágeno. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días.

#### **Proteasas e inhibidores.**

La leupeptina, pepstatina A y E64 (todos de Sigma) fueron utilizados a una concentración final de 1, 1.5 y 10  $\mu$ M respectivamente. El ácido hidroxámico, GM6001 y GM1210 (su análogo estructural inactivo), obsequio del Dr R. Galardy (Glycomed, Alameda, Ca), fueron disueltos en dimetil sulfóxido a una concentración de 100 mM y usados en los cultivos en una concentración final de 10  $\mu$ M. GM6001 es un inhibidor general de metaloproteasas con un  $K_i$  menor a 100 nM (Grobelny et al., 1992; Gijbels et al., 1994). Tiene un  $K_i$  de 27 nM para Str-1, 0.4 nM para colagenasa de fibroblastos de piel, 0.5 nM para gelatinasa A, 0.2 nM para gelatinasa B y 0.1 nM para colagenasa de neutrófilos (Galardy et al., 1994). Han sido ampliamente utilizados en sistemas de cultivo y no han tenido efectos tóxicos sobre nuestro sistema de células en particular (Lochter et al., 1997b). TIMP-1 y TIMP-2 recombinantes humanos fueron un obsequio de Joni Mott y Michael

Banda (Lawrence Berkeley National Laboratory). Se utilizaron a una concentración final de 150 y 50 nM respectivamente.

Estromelisina-1 recombinante humana se expresó y purificó de la levadura *Pichia Pastoris* (Lochter et al., 1999). Zimogramas de caseína indicaron que la enzima estaba proteolíticamente activa. Antes de ser utilizada en los cultivos celulares, la Str-1 se dializó contra DMEM/F12. A continuación, 1 mg/ml de la misma se activó por incubación con 1 µg/ml de tripsina (Life Technologies) durante 1 hora a 37°C. La tripsina fue luego inhibida por el agregado de inhibidor de tripsina de soja (SBTI, Sigma) que se agregó a una concentración final de 10 µg/ml. Una mezcla de tripsina y SBTI fue utilizada como control en los experimentos en los cuales se utilizó Str-1.

El plasminógeno (Sigma), la plasmina (America Diagnostica) y el uPA (Sigma) fueron utilizados en una concentración final de 8.5 µg/ml, 10 µg/ml y 10 µg/ml respectivamente.

### **Análisis de la morfogénesis.**

Se analizó el proceso de ramificación durante la morfogénesis de los organoides y los cúmulos epiteliales en geles de colágeno de tipo I tras 4-6 días en cultivo. Se definió un fenotipo ramificado como un organoide o cúmulo epitelial con por lo menos una ramificación que se extendía del cuerpo central. Para asegurarnos de que se trataba de una ramificación y no una extensión de una sola célula, los cultivos fueron teñidos con DAPI y analizados bajo un microscopio de fluorescencia. La cuantificación se realizó contando el

porcentaje de organoides o cúmulos con ramificaciones en cada hoyo, o el número de ramificaciones por organoide/ cúmulo utilizando un microscopio invertido. Los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado. La significancia estadística se determinó por ANOVA, con el post test de Dunnett cuando se compararon todos los grupos con el control, o el post test de Tukey para comparar todos los grupos entre sí. Se utilizó el programa de estadística InStat de GraphPad.

### **Zimografía.**

Se efectuaron zimogramas de gelatina y caseína del medio de cultivo químicamente definido condicionado durante 2 días por los cultivos celulares, como se describió previamente (Talhok et al., 1991; Lochter et al., 1997a). El medio condicionado se concentró 20 veces utilizando filtros Centricon 10 (Amicon) y luego se mezcló con buffer Laemmli sin agentes reductores. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 37°C y luego se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 8% conteniendo 1 mg/ml de  $\alpha$ -caseína o gelatina (ambos de Sigma). Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron incubados durante 30 minutos en una solución de 2.5% Triton X-100 y luego durante 2 días a 37°C en 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 conteniendo 15 mM CaCl<sub>2</sub>. Los geles fueron teñidos con Coomassie Blue R-250 y desteñidos con agua. La aparición de zonas claras contra un fondo oscuro reveló la presencia de actividad proteolítica. Para confirmar que las bandas obtenidas eran realmente debidas a la actividad de metaloproteasas (y no otro tipo de proteasa), el inhibidor de metaloproteasas, 1, 10-fenantrolina (1mM), fue agregado a las muestras y estas se incubaron durante 30 minutos a 37°C previo al agregado del buffer de corrida (Unemori and Werb, 1986). Este inhibidor se agregó en todos los pasos de incubación después de la

electroforesis. Para confirmar que las bandas correspondían a las forma activas de las metaloproteasas, las muestras se trataron durante una hora con 1 mM APMA (acetato p-aminofenilmercúrico; Sigma). Las bandas obtenidas fueron luego comparadas con las de las muestras no tratadas con APMA. En cada caso se muestran zimogramas representativos de por lo menos tres experimentos independientes.

### **Immunofluorescencia.**

Para analizar la organización de los organoides primarios, los geles de colágeno conteniendo los organoides se fijaron en 10% formalina (Sigma) durante 30 minutos. A continuación se lavaron durante 20 minutos con 50 mM glicina en PBS, seguido de 2 lavados con PBS de 30 minutos cada uno. Luego, los geles fueron incubados “overnight” a 4°C en una solución de 20% sucrosa en PBS. Esta luego se reemplazó por una solución de 30% sucrosa en PBS y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, los geles fueron montados con OCT durante una hora y luego congelados en una mezcla de etanol-hielo seco. Se realizaron cortes de 5-20  $\mu\text{m}$  en un crióstato. Se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se fijaron con formalina 10% o metanol:acetona (1:1). Se lavaron tres veces con 50 mM glicina (solo en el caso de la fijación con formalina), y se bloquearon durante 30 minutos con solución de bloqueo compuesta por 15% suero fetal bovino y 0.2% Tween-20 en PBS.

Los anticuerpos primarios utilizados y las diluciones fueron las siguientes: policlonal hecho en conejo contra queratinas bovinas (dilución 1/10, Dako), monoclonal de ratón contra actina de músculo liso  $\alpha$  (dilución 1/200, Sigma), policlonal hecho en conejo contra

laminina (dilución 1/200, Sigma), monoclonal de rata contra entactina (dilución 1/60, Upstate Biotechnologies), monoclonal hecho en ratón contra vimentina (dilución 1/200, Sigma). En todos los casos se incubó la muestra con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 30 minutos, a excepción de la vimentina, que requirió una incubación a 4°C “overnight”. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, los vidrios fueron lavados 5 veces con PBS e incubados con los respectivos anticuerpos secundarios. Se utilizaron los siguientes: contra ratón hecho en cabra conjugado con Texas Red (dilución 1/100, Caltag), contra conejo hecho en oveja conjugado con FITC (dilución 1/100, Zymed), y contra rata hecho en cabra conjugado con Texas Red (dilución 1/100, Caltag). Los mismos se incubaron en buffer de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portas fueron luego lavados 5 veces en PBS y los núcleos teñidos con DAPI (dilución 1/10,000 en PBS, Sigma). Finalmente, fueron montados con Vectashield (Vector Laboratories).

En el caso de las inmunofluorescencias realizadas en tejidos de ratones control, transgénicos PR-A y knock-out se procedió de la misma manera que para los cortes de organoides. En todos los casos se trabajó con tejido congelado que fue cortado utilizando un crióstato en cortes de entre 8-10  $\mu\text{m}$ . Los mismos fueron fijados en metanol:acetona (1:1). Los tiempos de incubación con los anticuerpos primarios fue de entre 1 a 12 horas a temperatura ambiente para los tiempos cortos, y a 4°C si se dejaban toda la noche. Se utilizaron como controles hermanos de la misma camada no alterados genéticamente, y en el caso de no contar con ellos, se utilizaron ratones de la misma cepa y de la misma edad. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: policlonal hecho conejo contra MT1-MMP (dilución 1/125, Chemicon International, Inc.) , monoclonal de ratón contra MMP-2 (dilución

1/100, Chemicon International, Inc.), policlonal hecho en conejo contra laminina-1 (dilución 1/100, Telios Pharmaceuticals), policlonal hecho en cabra contra colágeno III (dilución 1/100, Southern Biotechnology), policlonal hecho en cabra contra colágeno IV (dilución 1/100, Southern Biotechnology) y policlonal contra laminina-5, que fue un obsequio del Dr. Vito Quaranta, dilución 1/50, (Koshikawa et al., 2000). Para la detección de PCNA se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con fluoresceína (dilución 1/10, DAKO). Para detectar los anticuerpos primarios generados en cabra se utilizó un anti-cabra fluoresceinado (Pierce, Rockford, IL). En el caso de utilizar anticuerpos monoclonales de ratón sobre los tejidos congelados se realizó un bloqueo adicional con M.O.M. (Mouse on Mouse, Vector Laboratories). Los experimentos de integridad de la membrana basal en los ratones PR-A fueron realizados en por lo menos tres experimentos independientes (salvo en el caso de la doble marcación MMP-2/laminina-5, que fue realizado dos veces) con por lo menos dos animales transgénicos en cada caso, y sus respectivos controles. Con respecto a la marcación para MT1-MMP en los estadios de desarrollo de la glándula mamaria del ratón, el mismo fue realizado en un único experimento. Se analizaron varios cortes de hembras vírgenes de 4-5 semanas, dos hembras preñadas, una lactante y dos en estado de involución. Por último con respecto a los animales PR-A y knock-out, para los transgénicos se realizó un único experimento con dos animales, y en el caso del knock-out se analizaron dos ratones con sus respectivos controles en dos experimentos independientes.

Para determinar los porcentajes de cada tipo celular en los cultivos primarios los organoides fueron sembrados en “chamber slides” en medio conteniendo 5% suero fetal bovino, y mantenidos en cultivo durante 2 días. A continuación se lavaron 2 veces con PBS y



se fijaron y marcaron como se indicó en el párrafo superior. El porcentaje de cada tipo celular se determinó contando el número de células positivas para queratina, vimentina y actina de músculo liso en 3 áreas elegidas al azar. Se contaron por lo menos 200 células en cada área. Este experimento se realizó dos veces.

### **Adquisición y procesamiento de la imagen.**

Las imágenes fueron capturadas usando un objetivo Zeiss Neofluor 40x con una apertura numérica de 0.75 en un Axiovert Zeiss equipado con epifluorescencia. Un espejo dicróico con pasaje multibanda, y un filtro de longitudes de onda diferencial fueron usados para excitar a los fluorocromos en secuencia. Las imágenes fueron capturadas con un dispositivo adosado de grado científico de 12-bit con una cámara digital XIIIx (Vancouver, Canada). La intensidad relativa de las imágenes fue obtenida cuando las figuras fueron construidas usando Scilimage (TNO Institute of Applied Physics, Delt, The Netherlands) para poner en escala los datos de 12-bit y convertirlos a 8-bit. La estandarización de las imágenes fue lograda comparando sólo imágenes marcadas el mismo día, en el mismo experimento con el mismo anticuerpo, y capturadas con idénticos parámetros y procesadas de la misma manera.

### **Proliferación celular y detección de células apoptóticas.**

Los experimentos de proliferación celular se realizaron en placas de 96 hoyos. Tanto los organoides como los cúmulos epiteliales se embebieron en geles de colágeno tipo I. Para embeberlos, se utilizaron 50  $\mu$ l de colágeno tanto para la capa basal como para la superior. Las células fueron mantenidas en cultivo durante 6 días en 100  $\mu$ l de medio químicamente

definido suplementado con los factores de crecimiento. Para medir el número celular, 20  $\mu$ l de Alamar Blue (Accumed International; Ahmed et al., 1994) fueron agregados a cada pocillo e incubados durante 4 horas a 37°C. La absorbancia fue medida a 570 y 600 nm y el número celular relativo calculado. Los ensayos fueron realizados por cuadruplicados.

Para medir apoptosis se utilizó el kit de detección de apoptosis in situ (Boehringer Mannheim), el cual marca con FITC los extremos 3'OH de los fragmentos de DNA. Esto se realizó en cortes de crióstato de 10  $\mu$ m (Boudreau et al., 1995; Weaver et al., 1997). El experimento que se muestra es representativo de dos experimentos independientes.

#### **Preparación de epimorfina recombinante.**

La epimorfina recombinante fue producida en la cepa de *Escherichia coli* BL-21 y purificada en presencia de 8M urea como se describió previamente (Oka y Hirai, 1996, Hirai et al., 2001). Brevemente, el cDNA de una mutante de delección que carece del dominio 3' coil-coil de epimorfina marcada con la secuencia 6Xhis, fue generada por PCR e insertada en el vector de expresión PET3a (Novagen). La proteína recombinante fue purificada con esferas de Ni-NTA-agarosa (Qiagen) y dializada contra 150 mM NaCl durante 1 hora, seguido por 12 horas de dializado contra PBS. La solución resultante fue luego esterilizada por filtración.

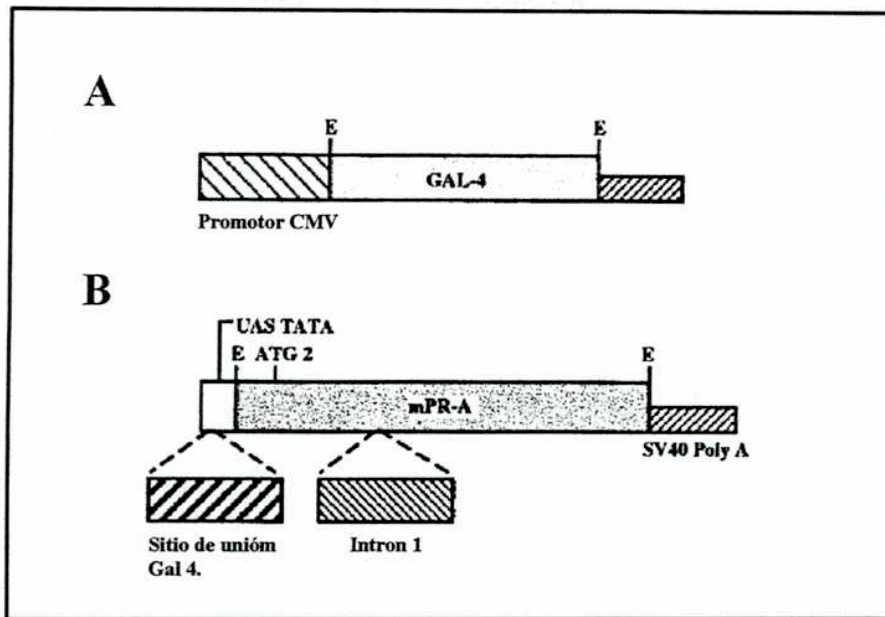
#### **RT-PCR**

Para la síntesis de cDNA, 2.5  $\mu$ g de RNA total celular preparado con TRIzol (Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones de la compañía y 20 unidades de transcriptasa

reversa (Boehringer Mannheim), a 37°C durante 3 horas. La Str-1 fue amplificada con un primer 5' (5'-GCT GCC ATT TCT AAT AAA GAG A-3') y un primer 3' (5'-GCA CTT CCT TTC ACA AAG-3') como se describió previamente (Lochter et al., 1997a). Como control de integridad del RNA, se realizó una RT-PCR para actina con los siguientes primers: primer 5' (5'- GCT GGT CGT CGA CAA CGG CT-3'), y 3' (5'-ATG ACC TGG CCG TCA GGC-3'). Para controlar que no hubiese DNA genómico en la preparación de RNA, se realizó una PCR con el RNA previo a la síntesis de cDNA. Los fragmentos obtenidos tras la RT-PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. La imagen fue capturada con un sistema de análisis de imagen Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, Ca). El experimento que se muestra es representativo de dos experimentos independientes.

### **Ratones transgénicos y knock-out.**

Los ratones transgénicos PR-A sobreexpresan la isoforma A del PR. La forma en que se generaron estos ratones y el fenotipo de los mismos ha sido descrito previamente (Shyamala et al., 1998). Para evitar la posibilidad de que la sobreexpresión de la isoforma A del PR afectase la fertilidad de los ratones, se utilizó para su generación un sistema transgénico binario en el cual un gen GAL-4, bajo un promotor de citomegalovirus murino (ratones CMV-GAL-4) sirvió como transactivador para el gen PR-A, que contenía en su promotor cuatro sitios de unión para GAL-4 (ratones UAS-PR-A). La cruce de los ratones CMV-GAL-4 con los UAS-PR-A resultó en ratones bigénicos que sobreexpresaban el gen PR-A. La Figura 9 muestra los plásmidos utilizados para la construcción del sistema binario. Para verificar que los ratones expresasen el transgen se realizaron controles por RT-PCR.



**Figura 9:** Representación esquemática de los los plasmidos utilizados en el sistema binario.

(A) Inserción del gen GAL-4 en un vector de expresión conteniendo secuencias de splicing y poliadenilación de SV40. (B) cDNA del PR de ratón conteniendo solo el ATG 2, el intrón 1 y los sitios de splicing y poliadenilación de SV40, fusionado con el fragmento UAS TATA que contiene cuatro sitios de unión para GAL4.

Los primers utilizados fueron los siguientes: para el transgen PR-A: primer 5', de la secuencia del cDNA de PR, PR-2527, 5'-CGAATTGATCAAGGCAATTGGT-3'; primer 3', de la secuencia de terminación del SV40, 5'-AGACACTCTATGCCTGTGTGGAG-3'; para el transgen GAL-4: primer 5' se usó la secuencia líder no traducida de GAL-4 (UTL), 5'-GAAGCAAGCCTCCTGAAAGA-3', para el primer 3' a partir de GAL-4 784: 5'-CACTGAAGCCAATCTATCTG-3'; y para el PR endógeno, para el primer 5', a partir de la secuencia UTL del PR, 5'-AAAAGGGGAGCTTGGGTCGT-3', para el primer 3' a partir de la secuencia 440 de PR, 5'-CAAAGAGACACCAGGAAGTG-3'.

Los ratones knock-out para el PR han sido descritos previamente (Lydon et al., 1995). Los mismos fueron generados por inserción de un cassette de resistencia a neomicina en el primer exón del gen que codifica para PR, lo cual resultó en un mensajero truncado y no codificante.

#### **Preparación de los montajes totales de glándula mamaria.**

La glándula mamaria inguinal número 4 fue extirpada y fijada en solución de Carnoy (etanol ácido) a temperatura ambiente. El tejido fue luego lavado en 70% etanol, enjuagado en agua destilada y teñido overnight en solución de carmine (0.2% carmine, 0.5% sulfato de aluminio potasio (ambos de Sigma)) a temperatura ambiente. Los tejidos teñidos fueron deshidratados por incubaciones en un gradiente seriado de etanol, tolueno y luego guardados en metil salicilato. Para exámenes histológicos, las estructuras de interés fueron cortadas y embebidas en parafina, para luego realizar cortes de 4  $\mu\text{m}$  y teñirlos con hematoxilina/ eosina

en forma estándar. Los montajes totales mostrados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes.

### **Tratamientos hormonales.**

En todos los casos se utilizaron ratones de la cepa FVB, excepto en el caso de los ratones knock-out que fueron generados en la cepa 129sv/C57. Ratones adultos de entre 9 y 12 semanas de edad fueron utilizados en todos los experimentos. Para los experimentos de regulación hormonal de la actividad proteolítica, los ratones fueron ovariectomizados, y tras 14 días, tratados con los esteroides durante 5 días. El estradiol (100 ng/ratón) y la progesterona (1 mg/ratón) fueron administradas diariamente por inyección intraperitoneal en solución salina como se describió previamente (Shyamala et al., 1997).

### **Zimogramas de tejidos.**

Para analizar la actividad proteolítica en las glándulas mamarias de los ratones, se extirpó la glándula número 4, se homogeneizó en buffer RIPA insoluble (50mM Tris, pH 8.0 con 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato y 1% NP40). Los homogenatos fueron centrifugados durante 15 minutos a 18 Xg a 4°C y los sobrenadantes (70 µg/calle) corridos en geles de poliacrilamida como se describió para los medios condicionados de los cultivos de organoides y cúmulos epiteliales. La cuantificación de las bandas fue realizada utilizando un densitómetro de tipo laser (Chemimager). Para determinar si las diferencias de los niveles de gelatinasas entre los transgénicos y sus controles, y los ratones knock-out y sus controles eran estadísticamente significativas, se realizó un Test t de Student, utilizando el programa de estadística InStat de GraphPad.

# *Resultados*

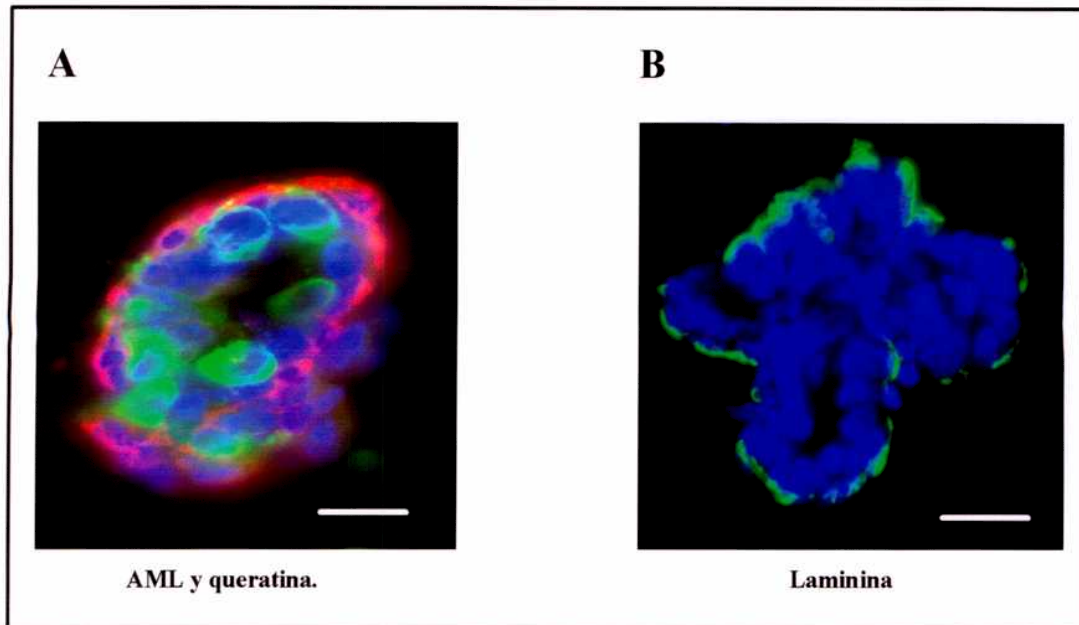
# Resultados

## Parte I

### **Las metaloproteasas están involucradas en la morfogénesis de organoides primarios de glándula mamaria de ratón.**

Para estudiar la capacidad morfogenética de células epiteliales de mama de ratón, que estuviesen en contacto entre ellas, y en un contexto adecuado, se aislaron organoides primarios a partir de glándulas mamarias de ratones hembra de la cepa CD-1, de 10 semanas edad, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los organoides estuvieron compuestos principalmente de células epiteliales y mioepiteliales, junto con una membrana basal y una proporción menor de células estromales. La preparación contuvo un  $64.9 \pm 2.1\%$  de células epiteliales luminales que son positivas para queratina y negativas para actina de músculo liso, un  $22.5 \pm 5.5\%$  de células mioepiteliales, positivas tanto para queratina como para actina de músculo liso, y un  $12.6 \pm 2.7\%$  de fibroblastos, positivos para vimentina. Los organoides en cortes de crióstato conservaron su polaridad, con un lumen central rodeado por las células epiteliales luminales y mioepiteliales (Figura 10A). Por otra parte también conservaron su membrana basal, que resultó positiva para laminina, entactina y colágeno de tipo IV (Figura 10B). Por lo tanto podemos decir que a partir de cultivos primarios de glándula mamaria de ratón se aislaron organoides estructuralmente respresentativos de la glándula mamaria normal, con todos sus componentes.

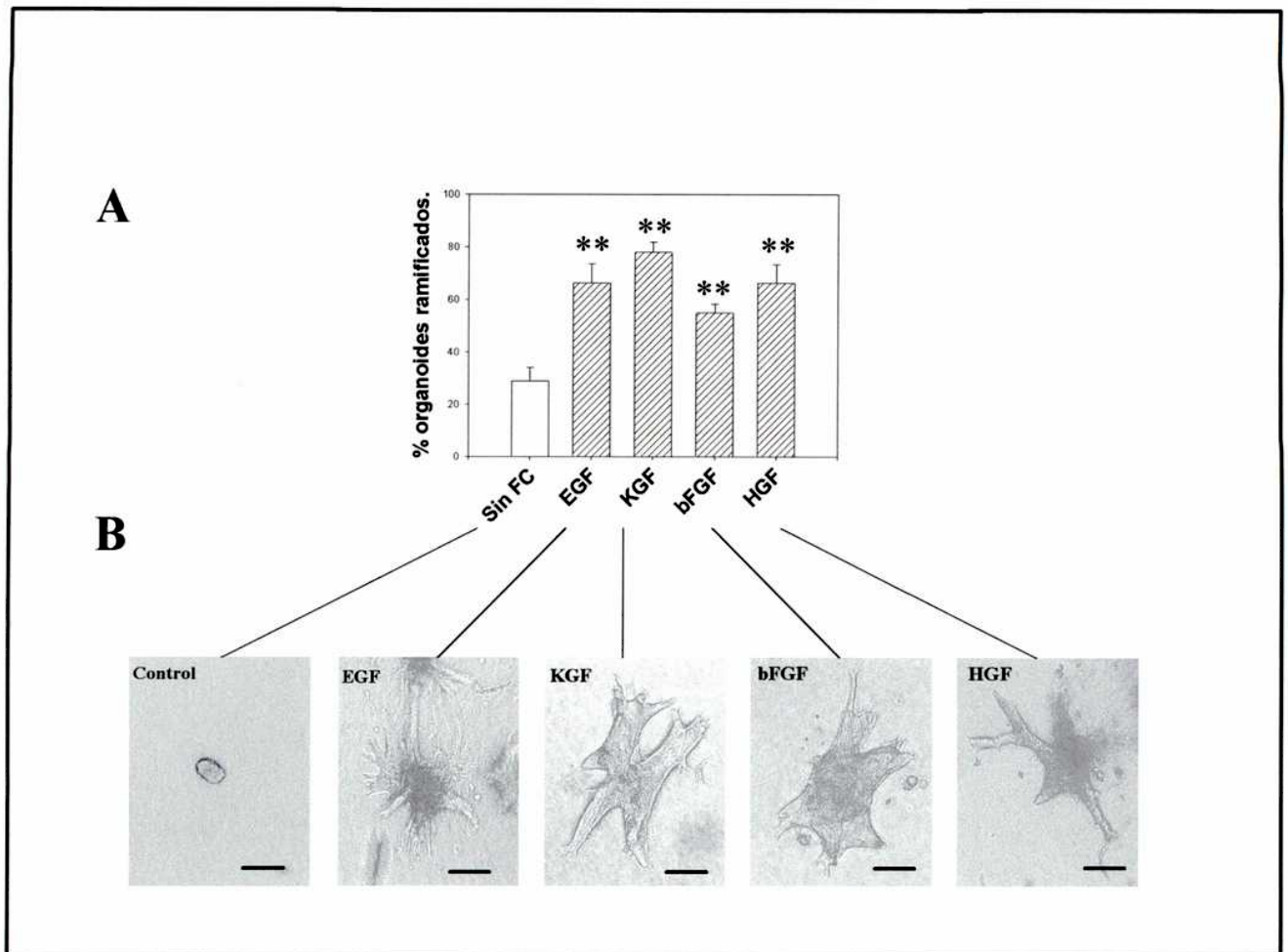




**Figura 10:** Los organoides primarios tienen células mioepiteliales y una membrana basal. Los organoides primarios fueron montados y congelados tras su preparación. (A) Detección de células positivas para queratina (verde) y actina de músculo liso (AML; rojo). (B) Detección de laminina (verde). Se observó el mismo tipo de marcación para colágeno de tipo IV y entactina (no mostrado). En ambos casos los núcleos están teñidos con DAPI (azul). La raya representa 50  $\mu\text{m}$ .

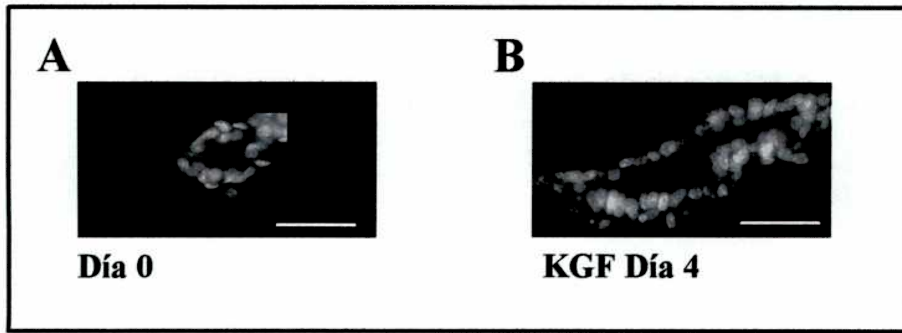
Cuando los organoides mamarios fueron embebidos en una matriz de colágeno de tipo I, e incubados durante 4-6 días en medio libre de suero conteniendo insulina como el único factor exógeno de supervivencia, la aparición de ramificaciones a partir de los organoides fue mínima; sólo un 25-30% de los mismos presentó ramas cortas. Los factores de crecimiento EGF, HGF, bFGF y KGF fueron todos capaces de promover la morfogénesis de los organoides, que se visualizó como la aparición de ramificaciones a partir del cuerpo central (Figura 11). Esta respuesta fue dosis dependiente. Por otra parte, los organoides conservaron su lumen después de varios días en cultivo, tanto en la presencia como ausencia de factores de crecimiento (Figura 12).

Como primer paso en el análisis del rol de las proteasas en el proceso morfogénico observado en el cultivo de organoides, se analizó por zimogramas la actividad proteolítica en el medio condicionado. Zimogramas de gelatina revelaron la presencia de la forma latente y activa de gelatinasa A o MMP-2 (L GA, A GA respectivamente), la forma latente de gelatinasa B o MMP-9 (L GB) y una gelatinasa de alto peso molecular (140 kDa; HG) (Figura 13A). Las bandas correspondientes a las gelatinasas A y B, pero no la de 140 kDa, fueron inhibidas por el inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina (Figura 13B). Por zimogramas de caseína detectamos la forma latente de Str-1 (L Str-1; Figura 13A), y por zimogramas de caseína-plasminógeno, un activador del plasminógeno (PA; Figura 13A). El análisis de los medios condicionados de organoides tratados con factores de crecimiento reveló que en los grupos tratados hubo un aumento en la cantidad de actividad proteolítica detectada respecto de los controles. Este aumento es muy probablemente debido al



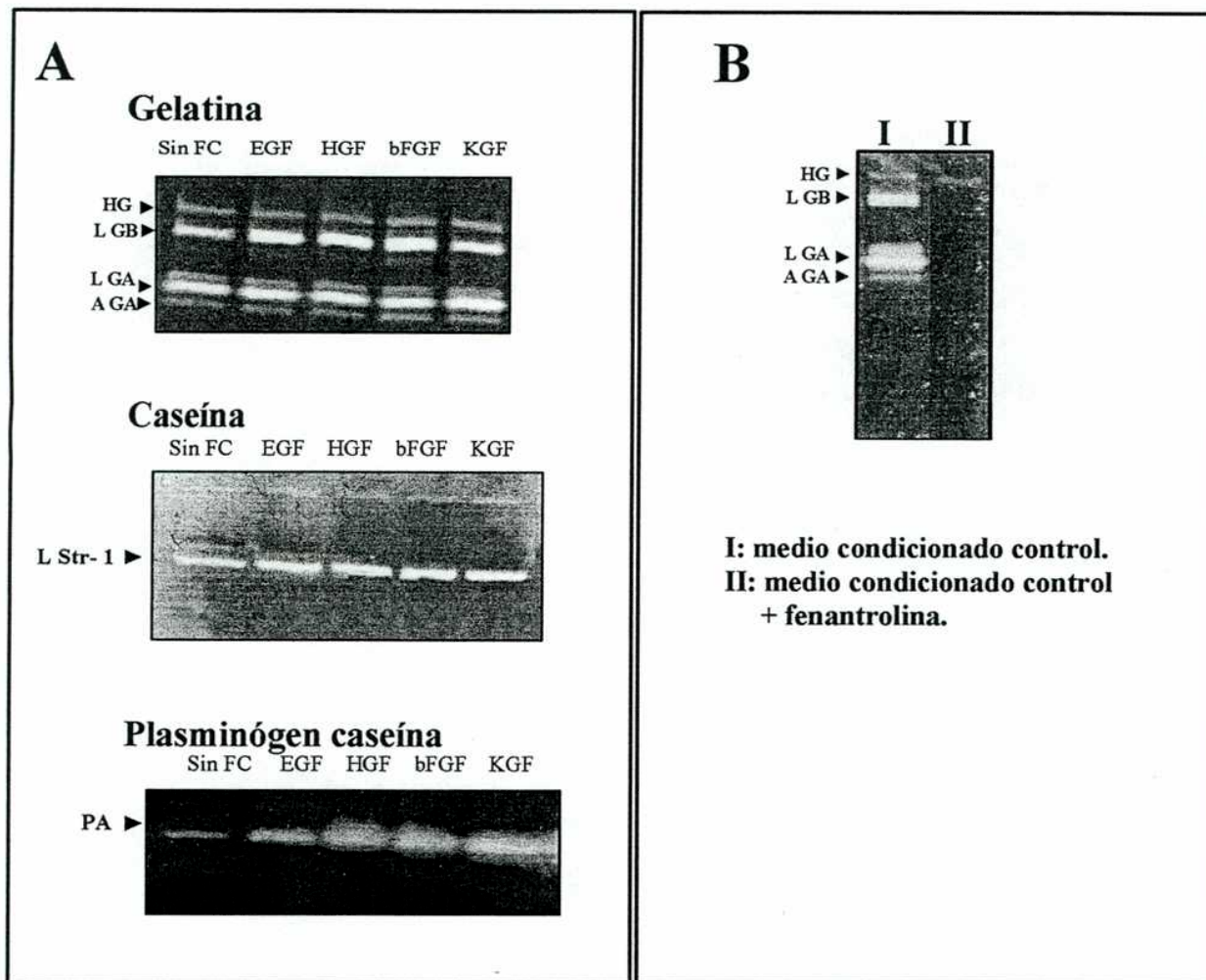
**Figura 11: Inducción de la morfogénesis por factores de crecimiento.**

Organoides primarios fueron cultivados en gels de colágeno tipo I durante 4-6 días y tratados con uno de los siguientes factores de crecimiento: EGF, KGF, bFGF o HGF a una concentración de 50 ng/ml. (A) Cuantificación del porcentaje de organoides ramificados. Se muestra la media  $\pm$  DS de tres experimentos. Las diferencias entre el grupo control y cada uno de los tratados fue estadísticamente significativa (\*\*;  $P \leq 0.05$ ). (B) Apariencia de los organoides control y tratados con factores de crecimiento. La raya representa 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12: Presencia de un lumen en organoides primarios.**

Los cortes muestran un organoide recién preparado (A) y tras 4 días de tratamiento con KGF (B). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La raya representa 100  $\mu\text{m}$ .



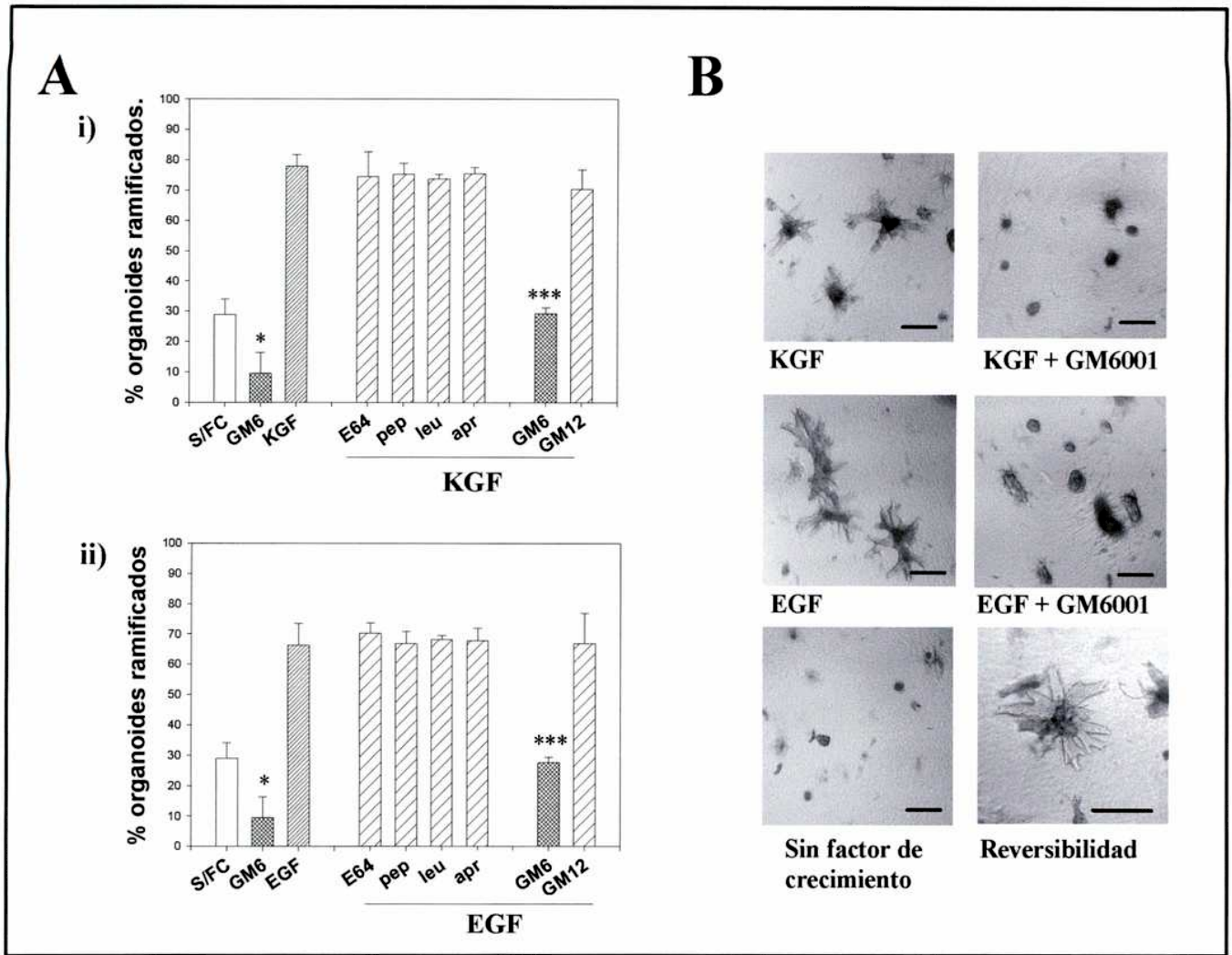
**Figura 13:** Los factores de crecimiento no afectan el grado de activación de las proteasas.

Organoides primarios fueron tratados en geles de colágeno durante 4-6 días con EGF, HGF, bFGF, KGF o no tratados (Sin FC). Los medios condicionados fueron recogidos y analizados por zimografía. (A) Zimogramas de gelatina, caseína y caseína-plasminógeno. Se detectaron bandas de actividad proteolítica correspondientes a gelatinasa A latente y activa (L GA, A GA), gelatinasa B latente (L GB) y una gelatinasa de alto peso molecular (HG). En el gel de caseína se detectó la presencia de la estromelisina-1 latente (L Str-1). En el gel de caseína plasminógeno se detecto un activador de plasminógeno (PA). (B) Inhibición de la actividad proteolítica por 1,10-fenantrolina en el caso de las gelatinasas A y B; no se inhibió la actividad de la gelatinasa de alto peso molecular por lo cual la misma no correspondería a una metaloproteasa.

incremento en el número celular. No se observaron cambios en la activación de ninguna de las proteasas detectadas.

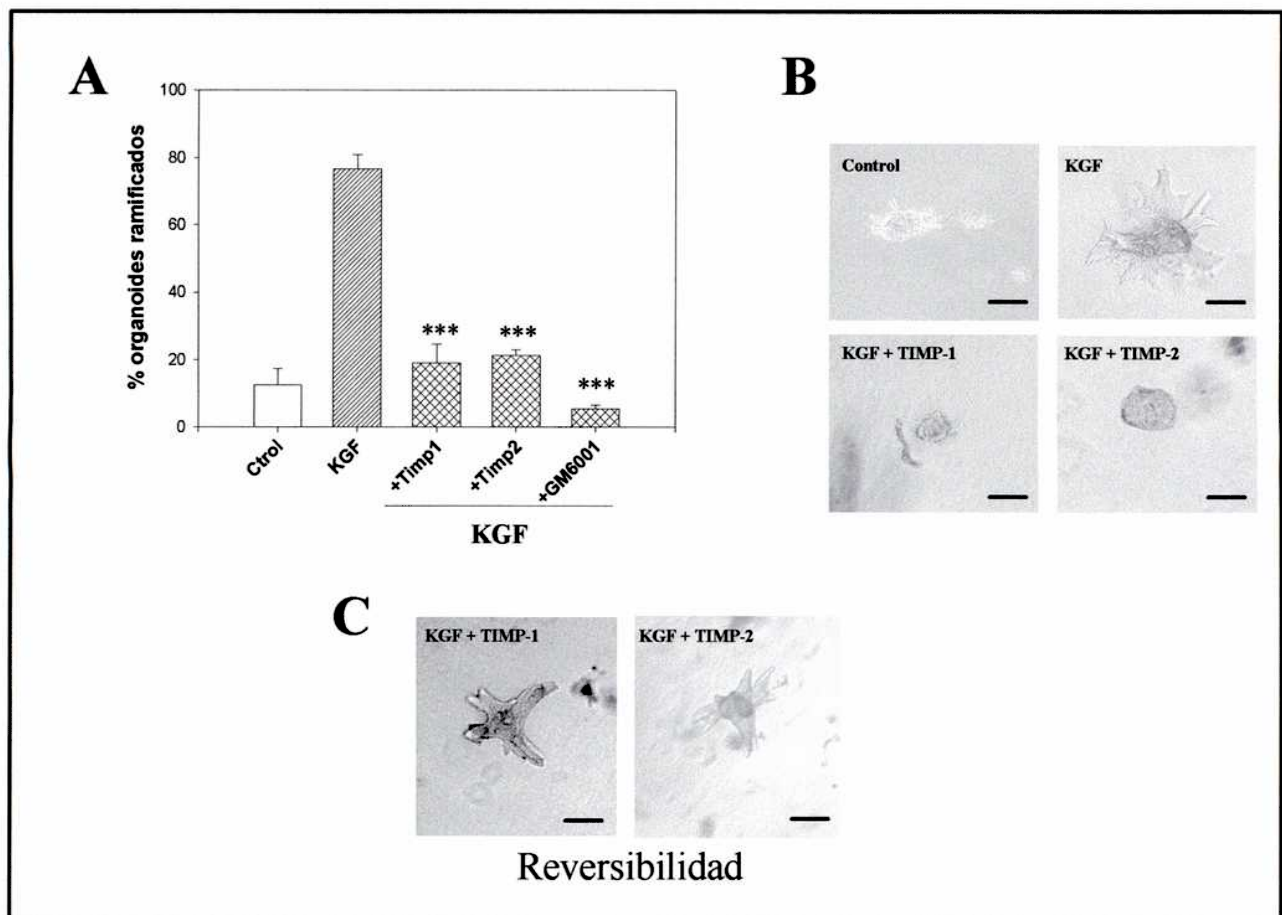
Para determinar si las proteasas estaban involucradas en el proceso morfogénico, los organoides fueron cultivados en presencia de inhibidores de proteasas. Los inhibidores específicos para cisteína proteasas (E64), serina proteasas (leupeptina y aprotinina) y aspartil proteasas (pepstatina) no afectaron la aparición de ramificaciones en los organoides, tanto en ausencia como en presencia de los factores de crecimiento. En cambio, el tratamiento con el inhibidor de metaloproteasas, GM6001, pero no con su homólogo estructural inactivo, GM1210, redujo la capacidad de morfogénesis de los organoides. Esta inhibición fue independiente del factor de crecimiento usado para estimular la ramificación e incluso inhibió los niveles basales de morfogénesis observados en ausencia de factores de crecimiento (Figura 14A y B). La inhibición de la morfogénesis por GM6001 fue reversible; organoides crecidos durante 4 días en presencia de cualquiera de los cuatro factores de crecimiento y GM6001 empezaron a ramificar cuando se lavó el GM6001 del medio y se incubó durante 6 días adicionales (Figura 14B). Para confirmar que el efecto obtenido con GM6001 era realmente debido a una inhibición específica de la actividad de metaloproteasas, se trataron los organoides en presencia de KGF con TIMP-1 y TIMP-2 recombinantes. Ambos TIMPs inhibieron la morfogénesis de los organoides, a niveles similares a los obtenidos con GM6001 (Figura 15A). Este efecto fue también reversible (Figura 15B). Estos resultados demuestran que las metaloproteasas son necesarias para la morfogénesis de los organoides mamarios, y que por otra parte los inhibidores de metaloproteasas no afectan la viabilidad de los organoides ya que el efecto fue reversible.





**Figura 14:** El inhibidor de metaloproteasas GM6001 suprime la morfogénesis.

(A) Cuantificación del porcentaje de organoides ramificados tratados con (i) KGF o (ii) EGF en presencia de los siguientes inhibidores de proteasas: E64, pepstatina (pep), leupeptina (leu), aprotinina (apr) GM6001 (GM6) o GM1210 (GM12). Sólo el inhibidor de metaloproteasas, GM6001, inhibió de forma estadísticamente significativa tanto la morfogénesis basal (sin factores de crecimiento; S/FC) como la inducida por factores de crecimiento. Se muestran la media  $\pm$  DS de dos experimentos realizados por triplicado; (\*;  $P \leq 0.05$ ), (\*\*\*)  $P \leq 0.001$ ). Resultados similares fueron obtenidos con HGF y KGF. (B) Apariencia de los organoides tratados con KGF o EGF en presencia o ausencia de GM6001 durante 6 días. No hay ramificaciones en aquellos crecidos en presencia del inhibidor de metaloproteasas. Reversibilidad: organoide que tras la eliminación del GM6001 del medio de cultivo es capaz de ramificarse en presencia de KGF. Resultados similares fueron obtenidos con los demás factores de crecimiento. La raya representa 400  $\mu\text{m}$ .



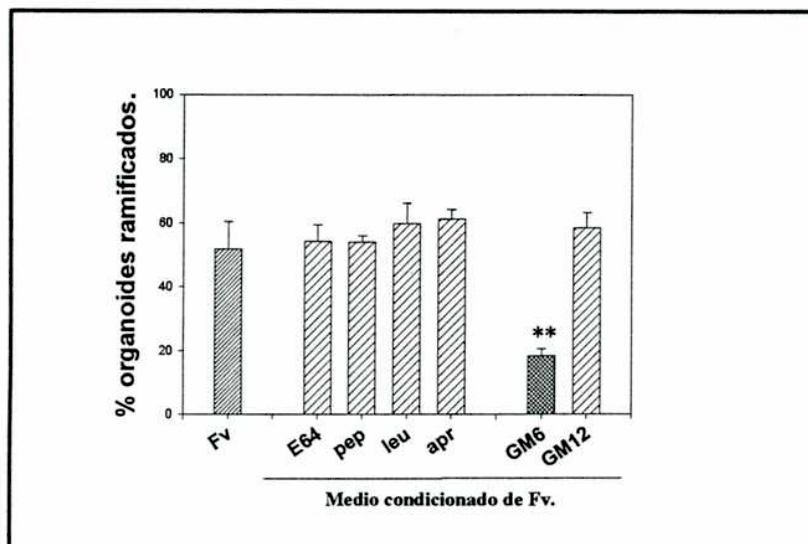
**Figura 15:** TIMP-1 y TIMP-2 inhiben la morfogénesis inducida por KGF.

(A) Cuantificación del porcentaje de organoides ramificados en presencia de KGF tratados o no con TIMP-1, TIMP-2 o GM6001. Ambos TIMPs y el GM6001 inhibieron en forma estadísticamente significativa la morfogénesis inducida por KGF. Se muestra la media  $\pm$  DS de dos experimentos realizados por duplicado; (\*\*\*,  $P \leq 0.001$ ). (B) Apariencia de los organoides en presencia de KGF tratados o no con TIMP-1 o TIMP-2. (C) Reversibilidad del efecto inhibitorio de TIMP-1 y TIMP-2; los organoides fueron cultivados en presencia de KGF durante 6 días tras la eliminación de los TIMPs del medio de cultivo. La raya representa 400  $\mu$ m.



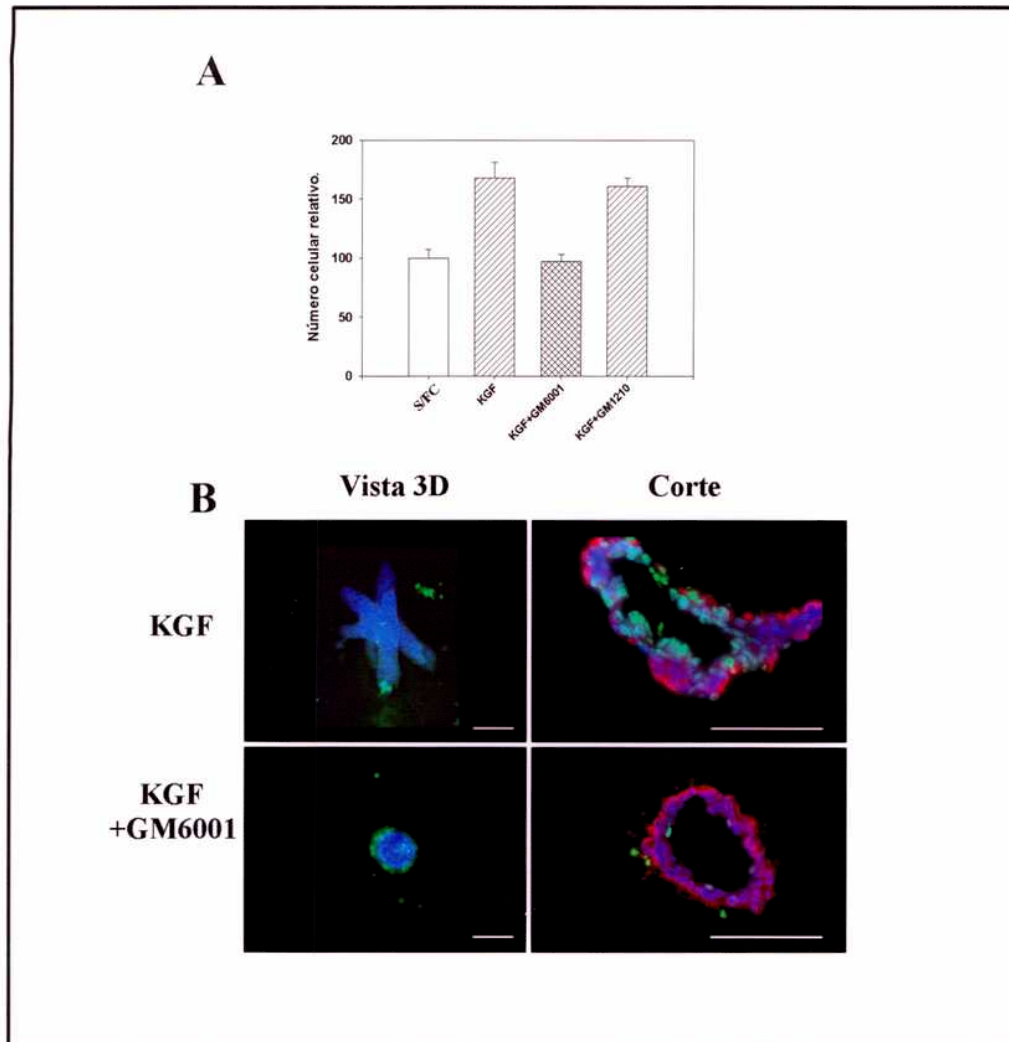
Los fibroblastos mamarios secretan el factor de crecimiento HGF, así como otros factores de crecimiento polipeptídicos que promueven la morfogénesis del epitelio mamario (Cunha, 1994). Encontramos que co-cultivos de organoides primarios con fibroblastos de glándula mamaria estimuló la morfogénesis de los organoides a un nivel similar al obtenido con los factores de crecimiento en forma individual (Figura 16). El desarrollo de estas ramificaciones fue también inhibida por GM6001, pero no por los inhibidores a los demás tipos de proteasas. Estos resultados sugieren que los efectos de los fibroblastos sobre los organoides epiteliales, aunque mediados por factores de crecimiento, requieren de la actividad de metaloproteasas.

El desarrollo de ramificaciones durante el proceso de morfogénesis requiere tanto de la proliferación celular como de la invasión de la matriz que rodea a las células epiteliales. Para determinar si el inhibidor de metaloproteasas estaba afectando la proliferación de los organoides cultivados en los geles de colágeno, se cuantificaron las células de los mismos tras un tratamiento con KGF o KGF + GM6001 por 6 días. Encontramos un menor número de células en el grupo tratado con el inhibidor de metaloproteasas (Figura 17A). Esta disminución en el número celular podría deberse a un incremento en la muerte celular, o a una disminución de la proliferación. Para ello realizamos una marcación para detectar células apoptóticas en organoides sometidos a ambos tratamientos. Encontramos que había un bajo número de células muriendo en los dos grupos (Figura 17B). En ambos casos, los organoides mantuvieron su lumen y polaridad, demostrado por marcación de actina de músculo liso que permitió detectar a las células mioepiteliales en la periferia de los organoides. Nuestros resultados sugieren que las metaloproteasas afectan la morfogénesis de los organoides



**Figura 16:** Rol de las metaloproteasas en la morfogénesis inducida por medio condicionado de fibroblastos.

Cuantificación del porcentaje de organoides ramificados al co-cultivarlos en presencia de fibroblastos provenientes de glándulas mamarias de hembras vírgenes (Fv). Solo el inhibidor de metaloproteasas GM6001 suprimió en forma estadísticamente significativa la morfogénesis. Se muestra la media  $\pm$  DS de dos experimentos realizados por triplicado; (\*\*;  $P \leq 0.01$ ).



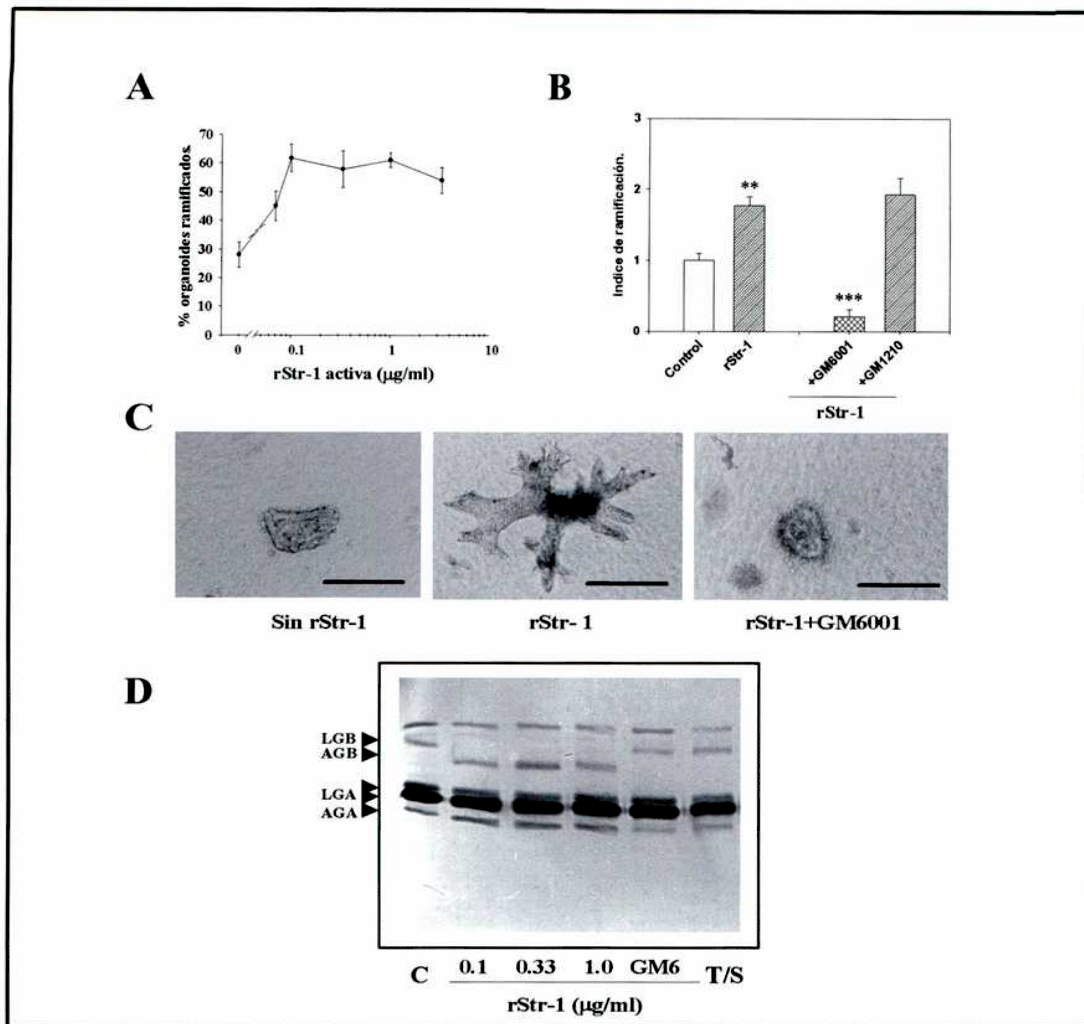
**Figura 17:** GM6001 inhibe la proliferación celular de los organoides pero no incrementa la apoptosis.

Tras 6 días de tratamiento con KGF o KGF+GM6001 se cuantificó el número celular (A) y se marcó para detectar el número de células apoptóticas (B). En el caso del grupo tratado con KGF+GM6001 el número de células fue igual al encontrado en el grupo control no tratado (S/FC). Se muestra la media  $\pm$  DS de dos experimentos realizados por octuplicado. Esto no fue el caso para el grupo tratado con KGF que incrementó el número celular en un 70% aproximadamente. La marcación de células apoptóticas (verde) reveló que este fenómeno no incrementó al tratar con GM6001. En rojo se muestra marcación para actina de músculo liso; los núcleos están teñidos con DAPI (azul). La raya representa 200 $\mu$ m.

primarios cultivados en colágeno de tipo I tanto a nivel de invasión como de proliferación celular. Sin embargo, el GM6001 no afectó la proliferación de células epiteliales aisladas cultivadas en geles de colágeno (ver más adelante), lo cual indicaría que en el caso de los organoides este sería un efecto secundario que probablemente es dependiente del contexto en el cual se hallan las células epiteliales al formar parte del organoide.

### **La estromelina-1 induce la morfogénesis de organoides primarios.**

Los experimentos usando inhibidores de metaloproteasas indican que estas son necesarias para el proceso de morfogénesis de los organoides primarios. Si las metaloproteasas actuaran río-abajo de los factores de crecimiento, entonces sería de esperar que el agregado exógeno de metaloproteasas fuese suficiente para inducir el desarrollo de ramificaciones. Efectivamente el agregado de Str-1 recombinante (rStr-1) activada a los cultivos de organoides indujo una respuesta morfogénica dosis dependiente (Figura 18A y B). El hecho de que la estromelina estaba catalíticamente activa fue demostrado por la activación de la gelatinasa B que se observó en el medio condicionado de los cultivos (Figura 18C). La expresión y/o activación de la gelatinasa A no fue alterada por el tratamiento con rStr-1. El efecto morfogénico de la rStr-1 no fue, sin embargo, resultado de la activación de la gelatinasa B; el tratamiento de organoides con gelatinasa B recombinante activada no indujo cambios en los organoides (no mostrado). Tampoco hubo efecto al agregar exógenamente gelatinasa A recombinante (no mostrado). Como era de esperar, el efecto de rStr-1 fue inhibido por GM6001 (Figura 18D). Estos datos sugieren un importante y tal vez específico efecto de Str-1 sobre la morfogénesis de organoides mamarios.



**Figura 18:** La rStr-1 induce la morfogénesis de organoides primarios.

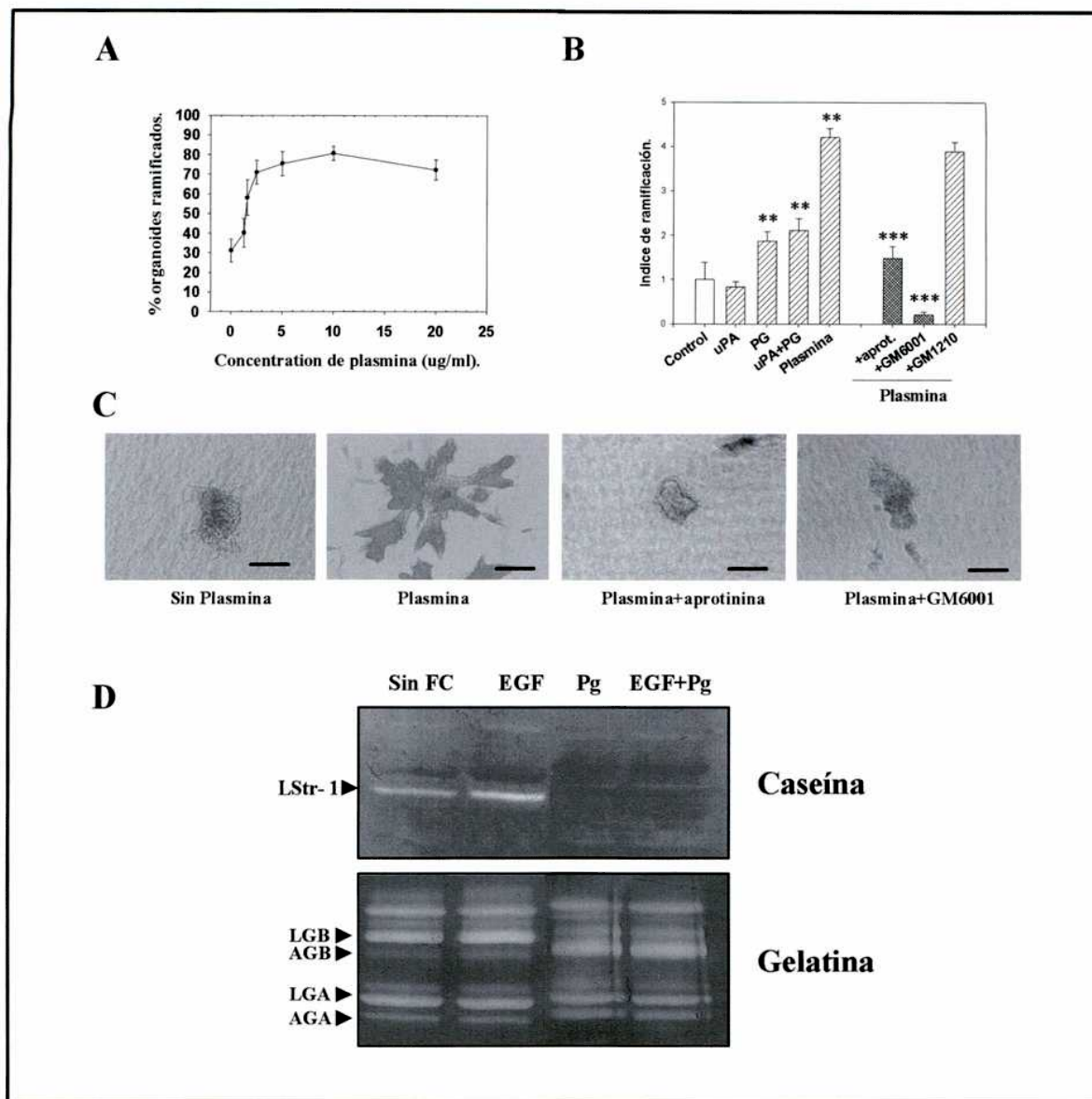
(A) Curva de dosis respuesta a rStr-1. Se muestra la media  $\pm$  DS de tres experimentos. (B) GM6001 inhibió la morfogénesis inducida por rStr-1. La rStr-1 indujo la formación de ramificaciones; la diferencia con el control fue estadísticamente significativa (\*\* $P$ ;  $\leq 0.01$ ). Este efecto fue inhibido por GM6001 (\*\*\*) ( $P \leq 0.001$ ). Se muestra la media  $\pm$  DS de tres experimentos. Para calcular el índice de ramificación los valores controles fueron igualados a 1. (C) Apariencia de los organoides en geles de colágeno I sin tratar, tratados con rStr-1 y con rStr-1+GM6001. (D) Zimograma de gelatina de medios condicionados de organoides control (C) o tratados con concentraciones crecientes de rStr-1, en ausencia o presencia de GM6001 (GM6). T/S corresponde al grupo tratado con tripsina+inhibidor de tripsina (SBTI). Notar la activación de la gelatinasa B en las calles tratadas con rStr-1; este efecto fue inhibido por GM6001. En el caso de la tripsina+SBTI no se observó activación de la gelatinasa como era de esperar. En (C) la raya representa: 200  $\mu$ m.

## **La plasmina es un regulador positivo de la morfogénesis.**

La serina proteasa, uPA, se expresa en altos niveles en la glándula mamaria del ratón virgen (Delannoy-Courdent et al., 1996). Para determinar si la cascada del plasminógeno tiene un rol fisiológico relevante durante el proceso de ramificación de la glándula mamaria, se agregó uPA, plasminógeno y plasmina a los cultivos de organoides primarios. El uPA no tuvo efecto alguno por sí solo, pero aumentó levemente el efecto morfogénético del plasminógeno. Tanto el plasminógeno como la plasmina aumentaron la capacidad de ramificación de los organoides (Figura 19A, B y C). El efecto de la plasmina fue bloqueado por el inhibidor de serina proteasas aprotinina, pero no por inhibidores de proteasas de tipo cisteína o aspárticas (Figura 19C).

La plasmina podría actuar estimulando la morfogénesis directamente o indirectamente mediante la activación de metaloproteasas. Se sabe que la plasmina es capaz de activar a la Str-1 y otras metaloproteasas; esto fue confirmado por la desaparición de la banda correspondiente a la forma latente de Str-1 y activación de gelatinasa B, al analizar por zimogramas de caseína y gelatina respectivamente, los medios condicionados de organoides tratados con plasmina (Figura 19D). Por otra parte se encontró que el GM6001 inhibió la morfogénesis inducida por plasmina (Figura 19D). Estos resultados sugieren que el plasminógeno/ plasmina inducirían la morfogénesis a través de un mecanismo que involucraría la activación de metaloproteasas.





**Figura 19:** La plasmina induce la morfogénesis de los organoides primarios.

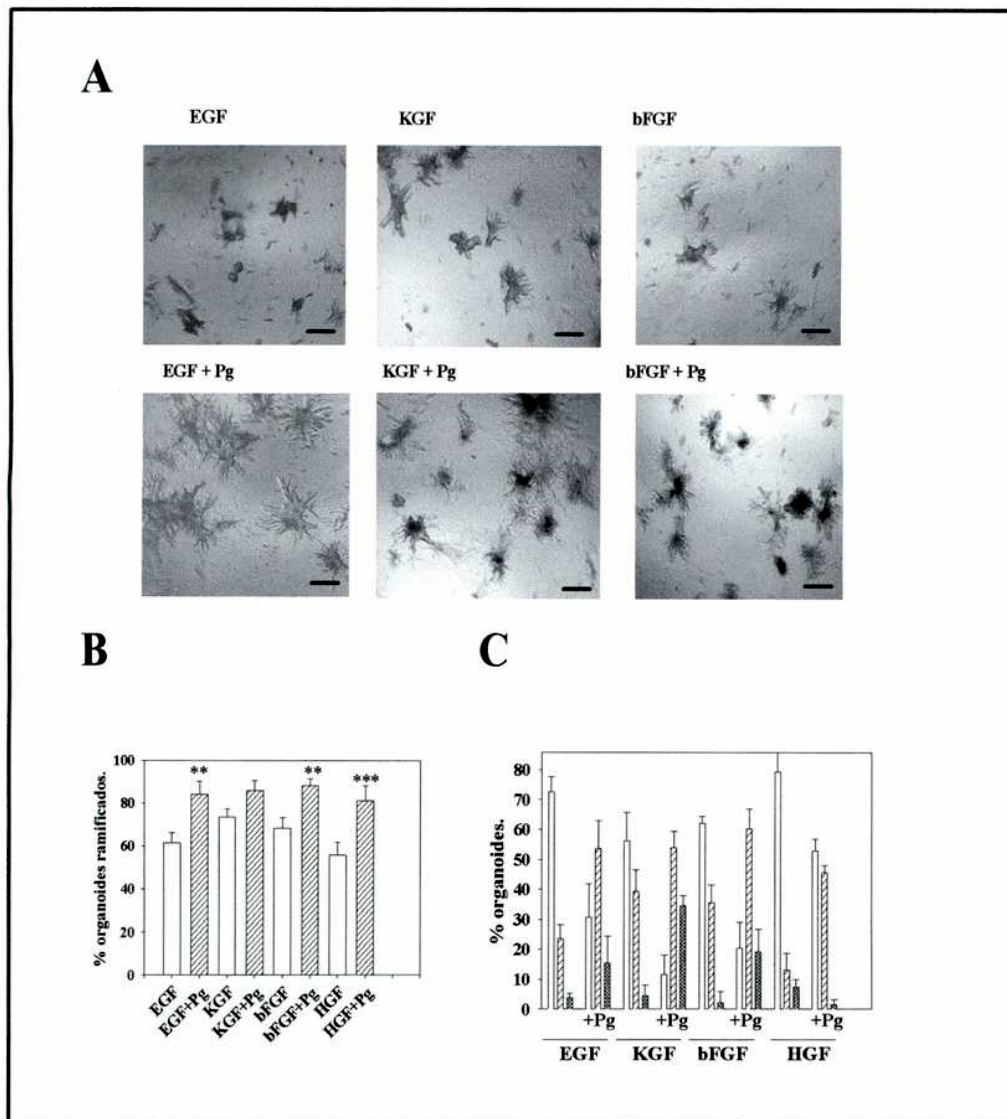
(A) Curva de dosis respuesta a concentraciones crecientes de plasmina. Se muestra la media  $\pm$  DS de tres experimentos. (B) La plasmina y el plasminógeno (Pg) indujeron la morfogénesis (\*\*;  $P \leq 0.01$ ). Este efecto fue bloqueado por inhibidores de proteasas; tanto el GM6001 como la aprotinina inhibieron de forma estadísticamente significativa la formación de ramificaciones (\*\*\*,  $P \leq 0.001$ ). Se muestra la media  $\pm$  DS de tres experimentos. Para calcular el índice de ramificación los valores controles fueron igualados a 1. (C) Apariencia de organoides tratados por 6 días con plasmina en ausencia o presencia de aprotinina o GM6001. (D) Activación de MMPs por Pg. Medio condicionado de organoides tratados o no con EGF y Pg revelaron la activación de Str-1 en el gel de caseína y de gelatinasa B (GB) en el gel de gelatina. En (C) la raya representa 150  $\mu$ m.

El plasminógeno/plasmina tuvieron un efecto sinérgico al ser agregados junto con factores de crecimiento a los cultivos de organoides. El agregado de plasminógeno junto con cualquiera de los cuatro factores de crecimiento aumentó tanto el porcentaje de organoides con ramificaciones, como el número de ramificaciones por organoide (Figura 20A, B y C). El mismo resultado se obtuvo con plasmina (no mostrado). El hecho de que el número de ramificaciones haya aumentado con el agregado de plasminógeno/ plasmina sugeriría que el número de sitios que dan origen a ramificaciones estaría regulado por la actividad proteolítica.

### **La epimorfina regula la morfogénesis mamaria en forma metaloproteasa dependiente.**

Los datos presentados hasta este momento demuestran que las metaloproteasas y/o los factores de crecimiento son suficientes para promover la morfogénesis de organoides primarios que están compuestos por células epiteliales luminales, mioepiteliales y fibroblastos. Sin embargo, las células mioepiteliales y los fibroblastos producen varios factores, algunos de ellos morfogenéticos, que afectarían la respuesta de los organoides. Para definir los requerimientos mínimos para que se ramifiquen células epiteliales luminales, realizamos los siguientes experimentos utilizando la línea celular SCp2, una línea epitelial de glándula mamaria de ratón que es capaz de ramificarse al ser cultivada en geles de colágeno tipo I, en presencia de epimorfina, una molécula morfogenética (Hirai et al., 1992; Hirai et al., 1998).





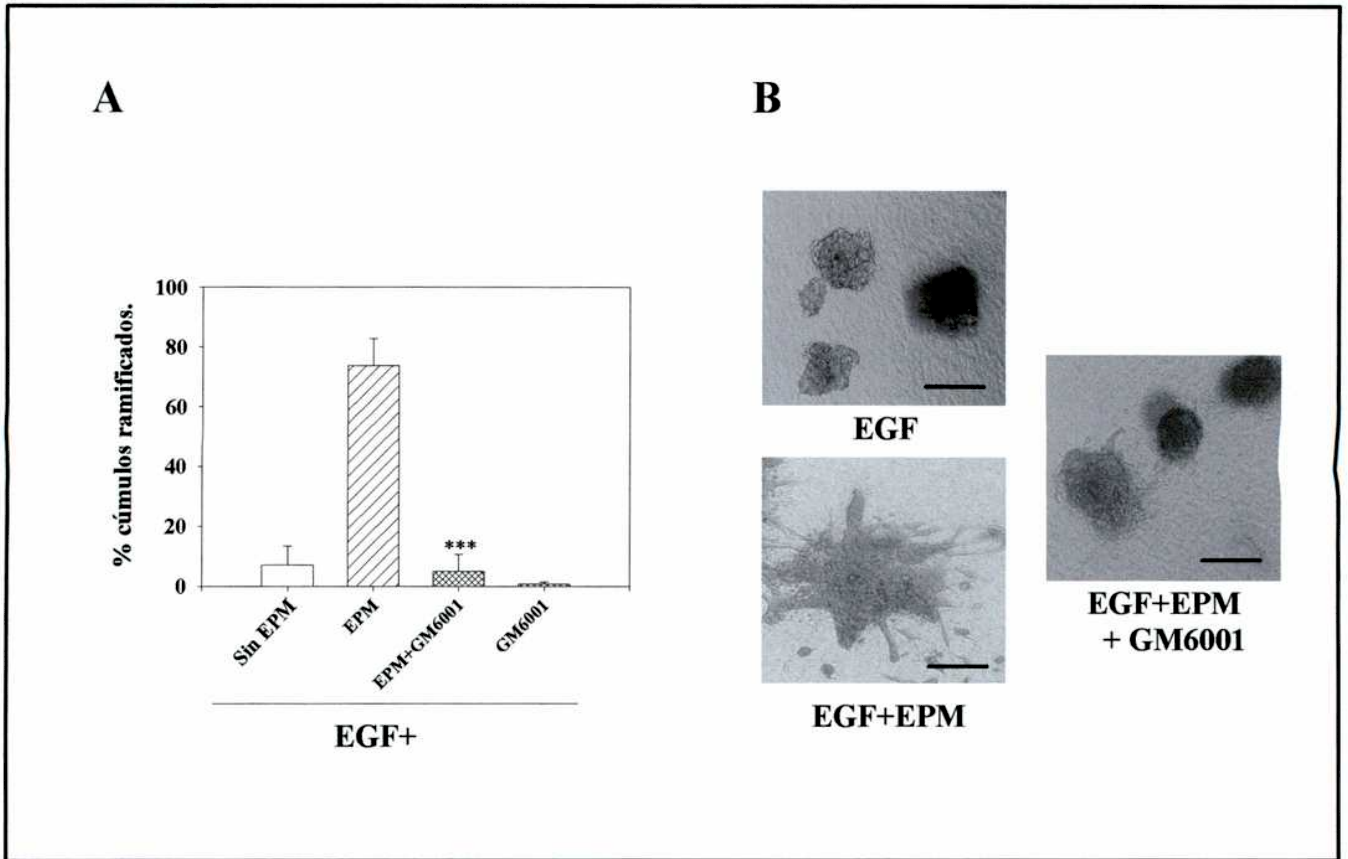
**Figura 20:** El plasminógeno y la plasmina actúan en forma sinérgica con los factores de crecimiento.

(A) Apariencia de organoides tratados con factores de crecimiento en ausencia o presencia de plasminógeno (Pg). Notar el incremento tanto en tamaño como en número de ramificaciones al agregar el Pg. (B) Cuantificación del porcentaje de organoides ramificados en presencia de factores de crecimiento, con o sin Pg. En todos los casos, salvo para el KGF, hubo un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de organoides ramificados en los grupos tratados con Pg (\*\*;  $P \leq 0.01$ ) y (\*\*\*,  $P \leq 0.001$ ). (C) Efecto del Pg sobre el número de ramificaciones por organoide: 1 a 5 ramas (barras blancas); 6 a 10 ramas (barras rayadas) y más de 10 ramas (barras cruzadas). En todos los casos al agregar el Pg incrementó el número de ramificaciones por organoide. Las figuras muestran la media  $\pm$  DS de dos experimentos realizados por triplicado. Escala en (A): 400  $\mu$ m.

Encontramos que el tratamiento con GM6001 inhibió la morfogénesis estimulada por la epimorfina de células SCp2 cultivadas en geles tridimensionales de colágeno (Figura 21A y B). Este resultado indicó que, como en el caso de los organoides primarios, la actividad de metaloproteasas es necesaria para la formación de ramificaciones en la línea celular utilizada. Este resultado sugiere que la actividad metaloproteasa podría estar regulada por la epimorfina. El tratamiento de células SCp2 con epimorfina durante 3 días llevó a un gran incremento en la síntesis de gelatinasa A, B y Str-1, al evaluar los medios condicionados por zimografía (Figura 22A). Por otra parte, análisis del mensajero para Str-1 por RT-PCR reveló un aumento del mRNA de Str-1 en presencia de epimorfina (Figura 22B). Este resultado, junto con la inhibición de la morfogénesis por GM6001 sugieren que las metaloproteasas estarían actuando río abajo de la epimorfina. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las señales inducidas por la epimorfina son también necesarias, ya que en ausencia de epimorfina las células SCp2 no se ramifican (Hirai et al., 1998). A diferencia del resultado obtenido con los organoides, donde la epimorfina es aportada al sistema por las células mioepiteliales, la Str-1 adicionada por sí sola o en presencia de factores de crecimiento no fue capaz de inducir la morfogénesis de las células SCp2 en colágeno (no mostrado).

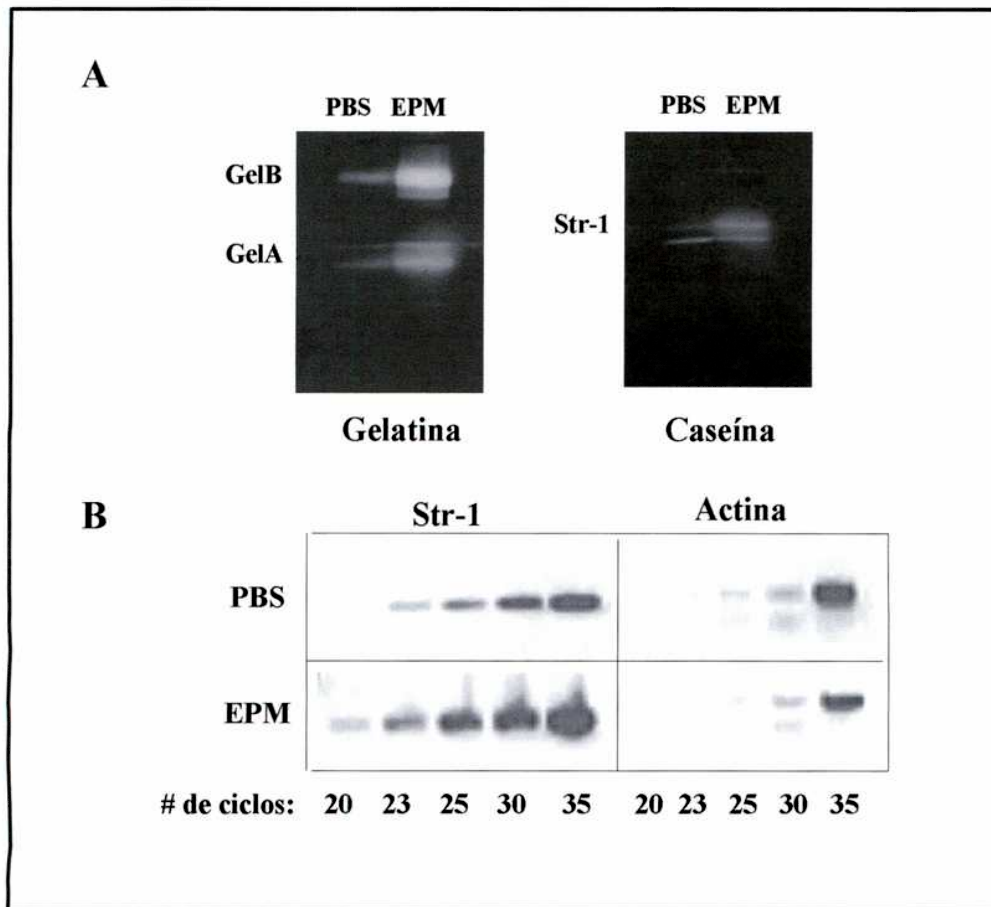
### **Las metaloproteasas son requeridas para la proliferación o la morfogénesis?**

La proliferación celular es necesaria para visualizar la morfogénesis (Hirai et al., 1998). Ya que en todos los experimentos mencionados hasta este punto el GM6001 inhibió el desarrollo de ramificaciones, era importante determinar si la inhibición inducida por



**Figura 21:** GM6001 inhibe la morfogénesis de cúmulos celulares inducida por epimorfina.

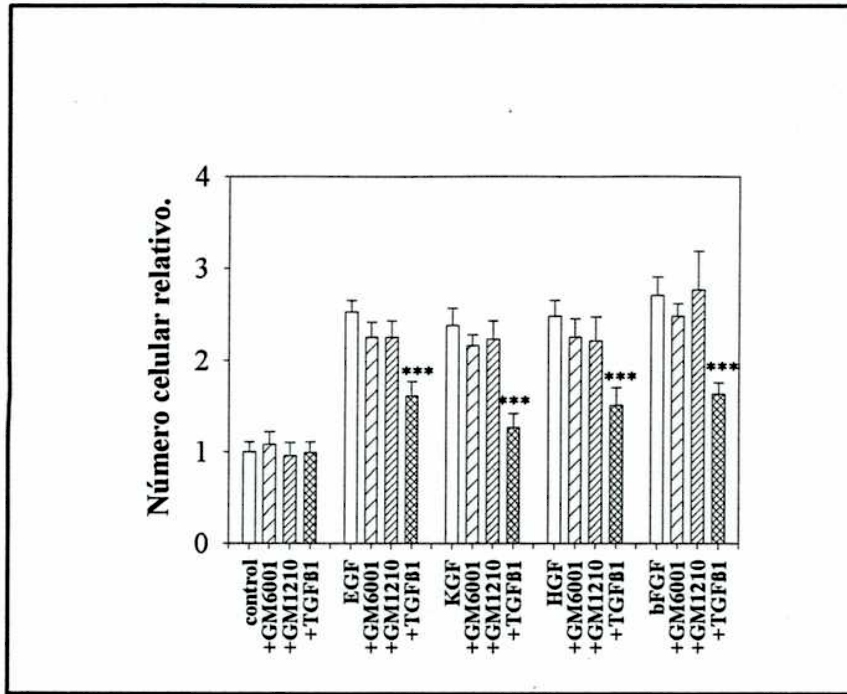
Cúmulos de células SCp2 fueron embebidos en colágeno tipo I y tratados por 6 días con EGF, EGF+ epimorfina (EPM) en ausencia o presencia de GM6001. (A) Cuantificación del porcentaje de cúmulos ramificados. El GM6001 inhibió de forma estadísticamente significativa la morfogénesis. Se muestra la media  $\pm$  DS de tres experimentos (\*\*\*)  $P; \leq 0.001$ ). (B) Apariencia de los cúmulos tratados con EGF, EGF+EPM y EGF+EPM+GM6001. La raya representa 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 22:** La epimorfina incrementa los niveles de Str-1 y gelatinasa A y B en células SCp2.

(A) Células SCp2 fueron tratadas durante 48 horas con epimorfina (EPM) o PBS. Los medios condicionados fueron luego analizados por zimogramas de gelatina y caseína. Tanto los niveles de gelatinasa A (Gel A), de gelatinasa B (Gel B) y de estromelisina-1 (Str-1) aumentaron en presencia de epimorfina. (B) La epimorfina incrementa los niveles de mRNA de la Str-1. Se realizó una RT-PCR de células SCp2 tratadas durante 48 horas con EPM o PBS. Veinte, 23, 25, 30 y 35 ciclos de amplificación se llevaron a cabo para detectar Str-1 y actina. Mientras que los niveles de actina no variaron entre el grupo tratado con PBS y EPM, hubo un aumento en los niveles de Str-1 en el grupo tratado con EPM.

GM6001 era resultado de una inhibición de la proliferación de las células epiteliales, o si su efecto era directamente sobre la inhibición de la actividad proteolítica. Para responder esta pregunta se cultivaron cúmulos de células SCp2 en geles tridimensionales de colágeno, en presencia de los factores de crecimiento junto con GM6001. Tras seis días de tratamiento se evaluó el número celular tanto en el grupo control como en los tratados. Se encontró, a diferencia de lo que sucedió con los organoides primarios, que el GM6001 no afectó la proliferación celular (Figura 23). Como control positivo para inhibición de la proliferación celular, tratamos a las células con TGF- $\beta$ 1, y obtuvimos el resultado inhibitorio esperado (Figura 23). Nuestros resultados demuestran que en las condiciones experimentales utilizadas, la actividad de las metaloproteasas es necesaria para la morfogénesis pero no para la proliferación celular.



**Figura 23:** El GM6001 no inhibe la proliferación de células SCp2.

Células SCp2 fueron embebidas en geles de colágeno tipo I y tratadas durante 6 días con medio solo o con el agregado de uno de uno de los siguientes factores de crecimiento: EGF, bFGF, HGF, KGF en presencia o ausencia de GM6001, GM1210 o TGFβ-1. La cuantificación celular fue realizada utilizando Alamar Blue. Se muestra la media  $\pm$  DS de tres experimentos. Los datos se normalizaron equiparando el valor de los controles a 1. Solo el TGFβ-1 redujo en forma estadísticamente significativa el número celular (\*\*\*;  $P \leq 0.001$ ).



## Introducción Parte II

En esta primera parte del trabajo analizamos en un sistema *in vitro* el rol de las metaloproteasas en la morfogénesis de organoides primarios y cúmulos de células epiteliales en geles de colágeno de tipo I. Encontramos, entre otras cosas, que las mismas son un requerimiento esencial para la formación de ramificaciones. Además pudimos confirmar el efecto morfogenético de la Str-1, previamente observado con la generación de animales transgénicos. Como se mencionó en Introducción, el fenotipo encontrado en las glándulas mamarias de ratones transgénicos para Str-1 es muy similar al observado en ratones que sobreexpresan la isoforma A del PR (ratones PR-A); ambos muestran un incremento en el grado de ramificación de su glándula mamaria (comparar Figuras 4 y 8). Por otra parte, ratones knock-out para PR tienen un fenotipo que se caracteriza por un grado menor de desarrollo respecto de sus controles (Figura 3). Estos resultados sugerirían que la vía del PR podría tener un rol en la regulación de la actividad proteolítica en la glándula mamaria del ratón. El hecho de que las glándulas mamarias de los ratones transgénicos PR-A presenten además una pérdida de laminina-1 en su membrana basal apoya esta hipótesis.

El objetivo de la segunda parte de este trabajo fue evaluar el rol de la vía del PR en la regulación de la actividad proteolítica de la glándula mamaria. Se utilizaron como modelos experimentales ratones transgénicos PR-A, ratones knock-out para PR y sus respectivos controles.

## **Parte II**

**La pérdida de la membrana basal en glándulas mamarias de ratones transgénicos PR-A está acompañada por un incremento de la proliferación celular.**

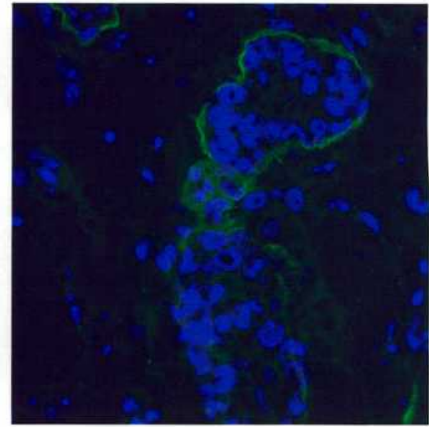
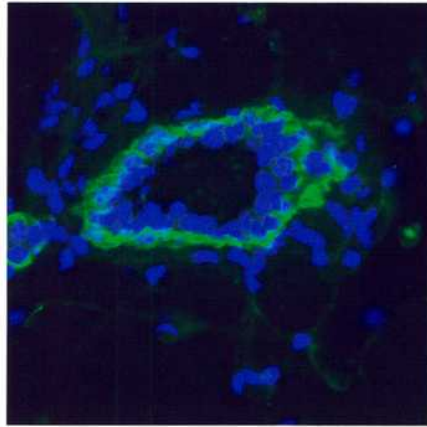
Se demostró previamente que la glándula mamaria de los ratones transgénicos PR-A presenta una pérdida en la continuidad de la membrana basal; la misma se evidenció por una marcación discontinua para laminina-1 (Shyamala et al., 1998). Esta pérdida en la continuidad de la membrana basal no fue característica de toda la glándula en los ratones transgénicos, sino que estuvo solamente asociada a zonas de desorganización a nivel tisular, con la presencia de estructuras epiteliales aberrantes. Además de la laminina-1, la laminina-5 y el colágeno de tipo IV son componentes esenciales de la membrana basal. Para determinar si estos componentes de la membrana basal estaban afectados en los ratones transgénicos, examinamos la inmunolocalización de los mismos. Encontramos que tanto para la laminina-5 como para el colágeno IV la marcación no era continua en las zonas aberrantes de las glándulas mamarias de los ratones PR-A (Figura 24), confirmando la observación previa respecto de alteraciones en los componentes de la membrana basal en los ratones PR-A. A continuación analizamos la inmunolocalización del colágeno III. Como con la marcación para componentes de la membrana basal, la marcación para colágeno III se vió alterada en las zonas de morfología anormal en las glándulas mamarias de los ratones PR-A (Figura 24). Por lo tanto en las glándulas mamarias de los ratones PR-A la disminución en la marcación



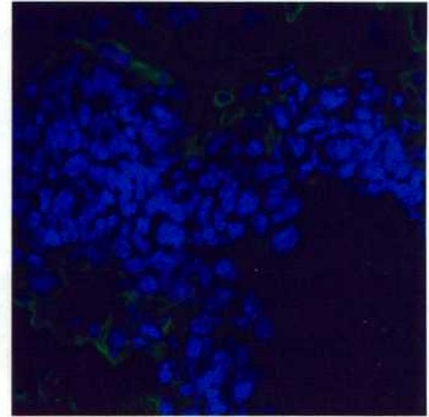
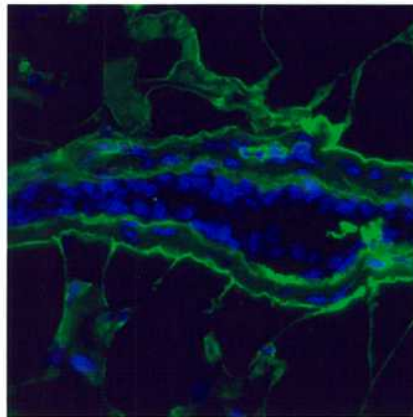
**Control**

**PR-A**

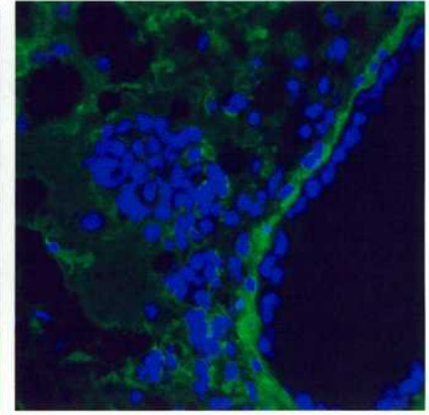
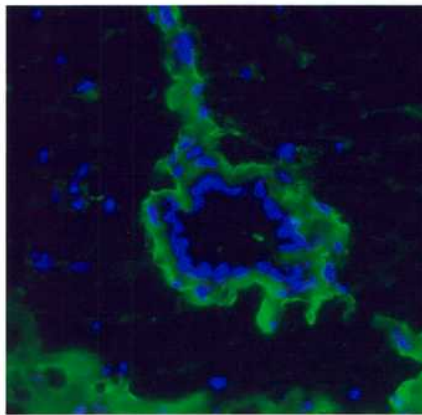
**LN-5**



**Co IV**



**Co III**

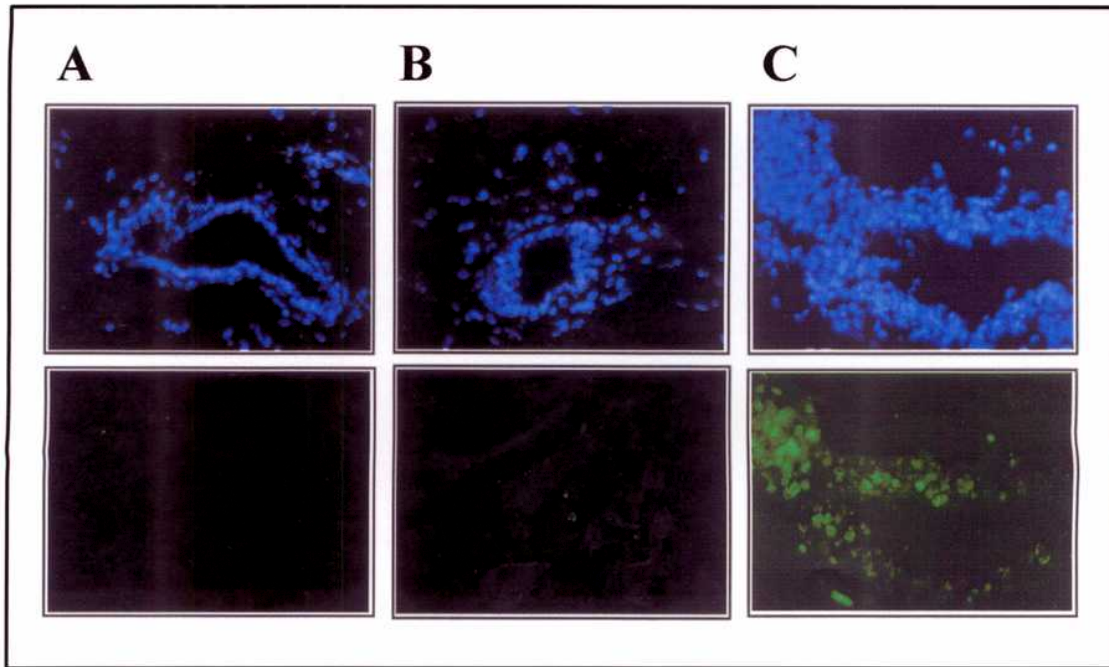


**Figura 24:** En las glándulas mamarias de los ratones transgénicos hay una pérdida en la marcación para laminina-5, colágeno IV y colágeno III.

Se extirparon glándulas mamarias de ratones transgénicos PR-A y de sus controles y se congelaron y procesaron para inmunofluorescencia. Las imágenes de la columna izquierda corresponden a los controles y las de la derecha a los transgénicos PR-A. En cada caso se indica el componente de la matriz extracelular marcado. En todos los casos se observó una marcación continua en los controles; en las zonas aberrantes de las glándulas mamarias de los ratones PR-A la marca fue discontinua para los tres componentes. En el caso de la marcación para colágeno III se muestra una zona con morfología normal (marcada) adyacente a una aberrante donde se ve menor intensidad de marcación. En verde están marcados la laminina-5, y los colágeno III y IV. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

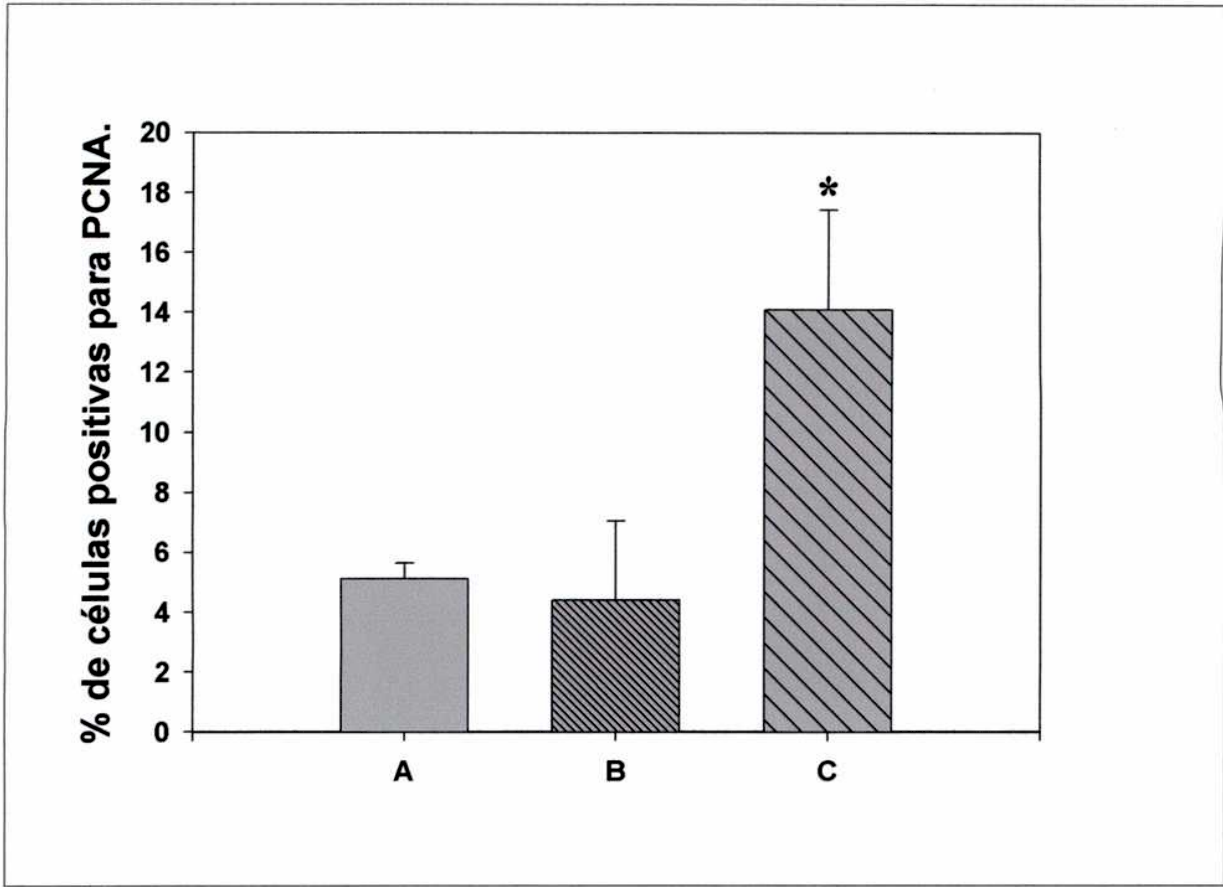
para lamininas y colágenos confirmaron que la matriz extracelular estaba ampliamente alterada.

Durante el desarrollo de la glándula mamaria, la morfogénesis está acompañada por remodelación de la membrana basal cuando las células epiteliales proliferantes invaden el estroma. Tanto la remodelación de la membrana basal como el incremento en proliferación durante el desarrollo de la mama se dan como respuesta a un aumento en los niveles circulantes de estrógenos y progesterona. Análisis de la frecuencia de células positivas para PCNA, un índice de la proliferación celular, reveló que había un incremento en la proporción de células positivas en las glándulas mamarias de los ratones PR-A (Figura 25 y 25B). Si este incremento en la proliferación celular junto con la pérdida de los componentes de la matriz extracelular son resultado de alteraciones en las vías de señalización de ER y PR, entonces esperaríamos revertir el fenotipo de los ratones transgénicos con la ovariectomía de los mismos. En animales transgénicos ovariectomizados se recuperó la integridad de la membrana basal, lo cual se evidenció por una marcación continua para laminina-1 (Figura 26). Esta marcación fue similar a la observada en glándulas mamarias de animales no transgénicos. Además, exámenes de la estructura de la glándula mamaria de los ratones PR-A por montaje total reveló también que el fenotipo era reversible (Figura 27); tras la ovariectomía, el árbol mamario adoptó un fenotipo normal. Por otra parte, la administración exógena de estrógeno y progesterona durante cinco días a los ratones transgénicos ovariectomizados llevó a que nuevamente se perdiera la integridad de la membrana basal (Figura 26), y se recuperara la estructura tubular característica de los transgénicos (Figura 27). Estos tratamientos no alteraron la continuidad de la membrana basal en las glándulas



**Figura 25:** Incremento en el número de células positivas para PCNA en las glándulas mamarias de ratones transgénicos PR-A.

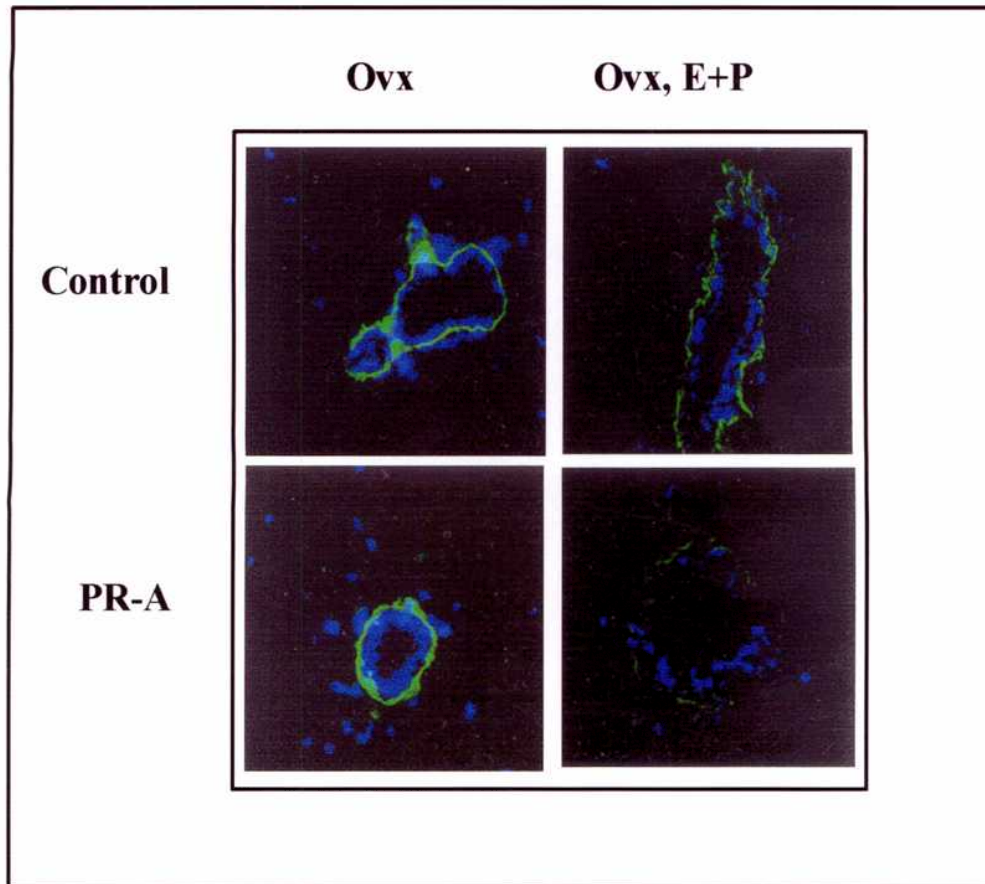
Glándulas mamarias de ratones transgénicos y control vírgenes fueron extirpadas, congeladas y procesadas para inmunofluorescencia. En cada panel se muestra la marca para DAPI (azul) y su correspondiente marcación para PCNA (verde). Corte de glándula mamaria de un ratón control(A); una zona de morfología normal de un ratón PR-A (B) y un área aberrante del mismo ratón transgénico. Se observó que tanto para las glándulas mamarias de ratones control, como en áreas de morfología normal de ratones transgénicos, había un bajo porcentaje de células positivas para PCNA. Este no fue el caso en zonas de morfología aberrante en los transgénicos donde se detectó un alto número de células positivas para PCNA.



**Figura 25B:** Cuantificación del número de células positivas para PCNA.

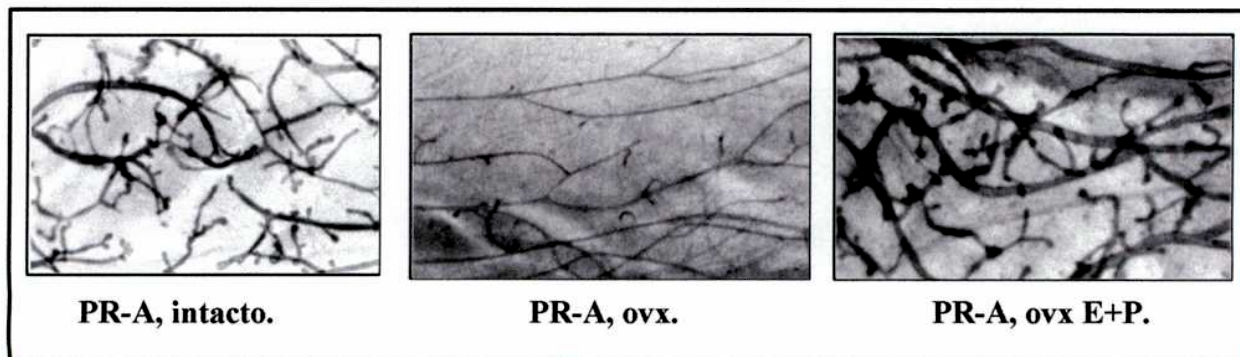
El gráfico muestra la cuantificación de la marcación para PCNA correspondiente a la figura 25. Se analizaron tres animales controles y tres transgénicos y se contaron por lo menos 1500 células en cada caso. Se representa la media  $\pm$  SEM de los tres experimentos. Las diferencias entre A (grupo control) y C (zonas de morfología aberrante en los ratones PR-A) fueron estadísticamente significativas (\*;  $P \leq 0.05$ ); test t de Student.





**Figura 26:** Inmunolocalización de laminina-1 en glándulas mamarias de ratones transgénicos PR-A y controles.

Ratones transgénicos PR-A y controles fueron ovariectomizados (Ovx) y un grupo fue posteriormente tratado con estrógeno y progesterona (E+P). Las glándulas mamarias fueron extirpadas, congeladas y procesadas para inmunofluorescencia. En verde se ve la marca para laminina-1 y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Se observó una marcación continua para laminina-1 tanto en ratones control como PR-A ovariectomizados. Sin embargo tras la administración de E+P sólo en el caso de los transgénicos se perdió parcialmente la marca para laminina-1.



**Figura 27:** Reversibilidad del fenotipo de la glándula mamaria de los ratones PR-A.

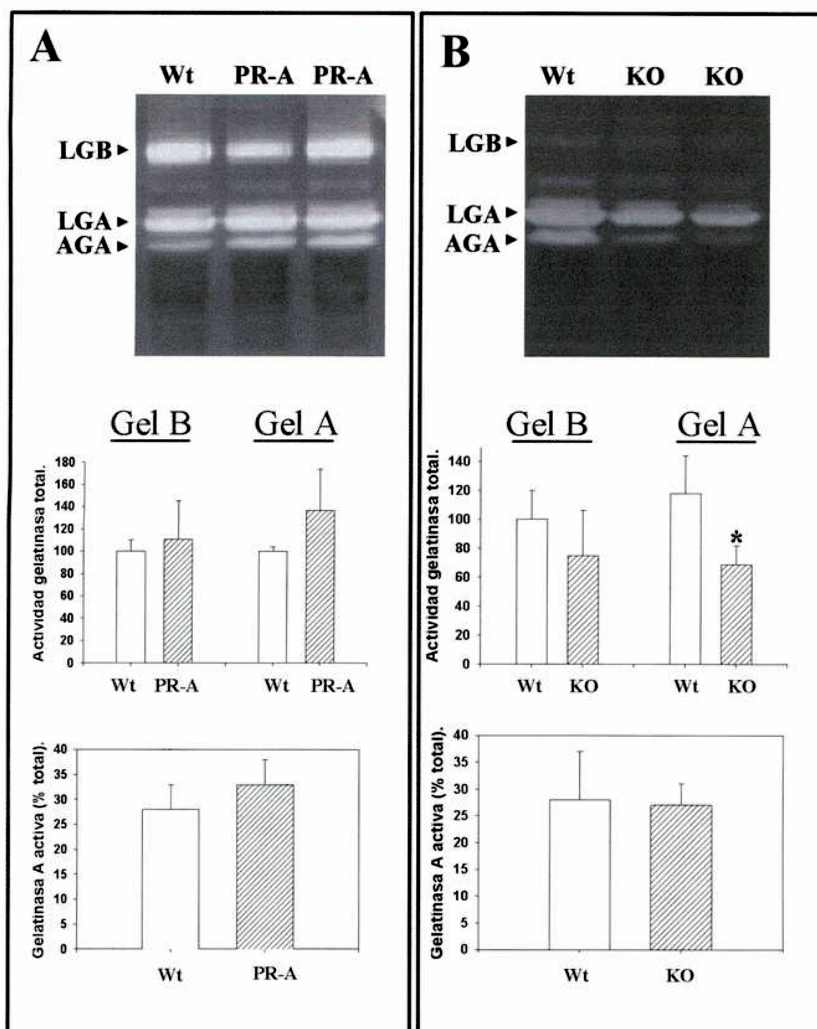
Montaje total de glándula mamaria de ratones PR-A intacto, ovariectomizado (ovx) y ovariectomizado y tratado con estrógeno y progesterona (E+P). Como en el caso de la marcación para laminina-5, el fenotipo a nivel de montaje total fue reversible en las glándulas mamarias de los ratones PR-A. Al administrar E+P, nuevamente se observó el fenotipo característico del ratón transgénico.

mamarias de los ratones control (Figura 26). El mismo resultado respecto de la reversibilidad de la pérdida de la membrana basal fue observado realizando la marcación para colágeno IV (Shyamala y colaboradores, comunicación personal).

### **Análisis de la actividad proteolítica en las glándulas mamarias de ratones transgénicos PR-A y PR-knock out.**

Para analizar si existía una relación entre la pérdida de la integridad de la membrana basal observada en las glándulas mamarias de los ratones PR-A y la expresión y/o activación de las metaloproteasas, y si éstas estaban reguladas por las vías del PR, se realizaron zimogramas de gelatina. Extractos de tejidos de glándulas mamarias de animales transgénicos y controles revelaron la presencia de tres bandas correspondientes a la forma latente de gelatinasa B, y las formas activa y latente de gelatinasa A (Figura 28). Como se observa en la Figura 28 A, si bien en los extractos provenientes de animales PR-A hubo una tendencia a niveles más altos de gelatinasa A total (activa + latente), las diferencias con los animales control no fueron estadísticamente significativas; no se observaron diferencias en los niveles de gelatinasa B. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas cuando se analizó la gelatinasa A activa como porcentaje del total de gelatinasa A. El mismo análisis fue realizado con extractos provenientes de glándulas mamarias de ratones knock-out para PR (Figura 28 B). En este caso se observó una disminución estadísticamente significativa de aproximadamente un 30% en los niveles totales de gelatinasa A en tejidos de animales knock-out ( $P \leq 0.05$ ). Por otra parte, el porcentaje de gelatinasa A activa respecto del total no varió en comparación con los controles. Tampoco se observaron cambios significativos de



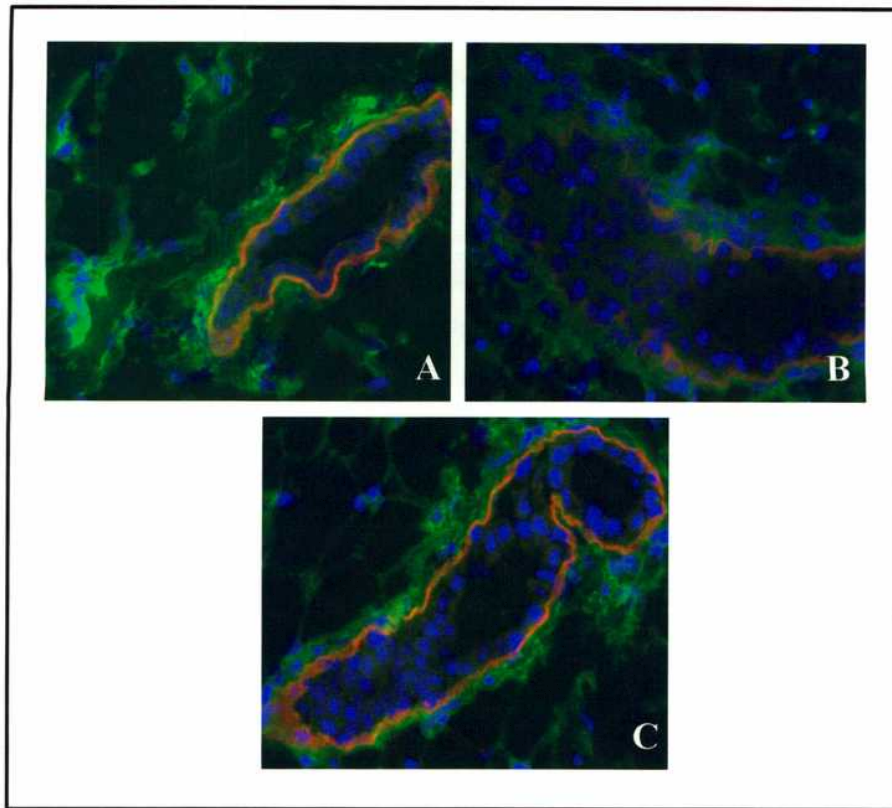


**Figura 28:** Niveles de gelatinasa A y B en ratones transgénicos PR-A, knock-out y controles.

Glándulas mamarias de ratones control, transgénicos PR-A y knock-out fueron extirpadas y homogeneizadas en buffer RIPA. Los extractos se analizaron por zimogramas de gelatina. (A) Zimograma representativo comparando los niveles de gelatinasa B latente (LGB) y gelatinasa A latente y activa (LGA, AGA respectivamente) entre ratones control y transgénicos PR-A. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles totales de gelatinasas A y B (gráfico superior) ni en el % de gelatinasa A activa respecto del total (gráfico inferior) entre los ratones control (n=5) y los transgénicos PR-A (n=5). Los gráficos muestran la media  $\pm$  DS de los 5 ratones control y los 5 transgénicos. (B) Zimograma representativo comparando los niveles de gelatinasa B latente y gelatinasa A latente y activa entre ratones control y knock-out para PR. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de gelatinasa A total de los ratones control (n=4) y los knock-out (n=5); (\*;  $P \leq 0.05$ ). No hubo diferencias en el % de gelatinasa A activa respecto del total. Los gráficos muestran, como en el panel (A) la media  $\pm$  DS de 4 ratones control y 5 knock-out.

actividad de gelatinasa B. Por lo tanto estos últimos resultados sugerirían que los niveles totales de gelatinasa A estarían afectados por los niveles de PR. El hecho de que las diferencias observadas entre los animales controles y los PR-A no son estadísticamente significativas se podría deber a que no todas las células epiteliales de las glándulas mamarias de los ratones PR-A expresan el transgen (Shyamala et al., 1998).

Para investigar cuál era el patrón de expresión de gelatinasa A en las glándulas mamarias de los ratones PR-A, y si había diferencias entre zonas de morfología normal y aberrante se realizó un estudio inmunohistoquímico. Para estos experimentos se utilizó un anticuerpo que reconoce una porción de la molécula de gelatinasa A que se libera al ser activada, por lo tanto sólo se reconoce la forma latente de la enzima y no la activa. Simultáneamente, realizamos una inmunohistoquímica contra laminina-5, que forma parte de la membrana basal y es degradada por la forma activa de la gelatinasa A (Figura 29). Se observó que en cortes de glándulas mamarias de ratones control la marcación para laminina-5 fue continua en la región de la membrana basal (como se demostró en la Figura 24) y estuvo acompañada por marcación para gelatinasa A en el estroma periepitelial; lo mismo ocurrió en zonas de morfología normal en las glándulas de los ratones PR-A. Sin embargo, en áreas donde la morfología era anormal se redujo la marcación para la forma inactiva de gelatinasa A, lo cual coincidió con pérdida de marcación para laminina-5. Estos resultados sugerirían que habría un incremento en la actividad de gelatinasa A (es decir de su forma activa) en las glándulas mamarias de los ratones transgénicos que no pudo ser observada en zimogramas: la degradación de la laminina-5 (un sustrato de gelatinasa A) coincidió con la pérdida de marca para la forma latente de la enzima.



**Figura 29:** En ratones transgénicos PR-A hay una pérdida de la marcación para la forma latente de gelatinasa A.

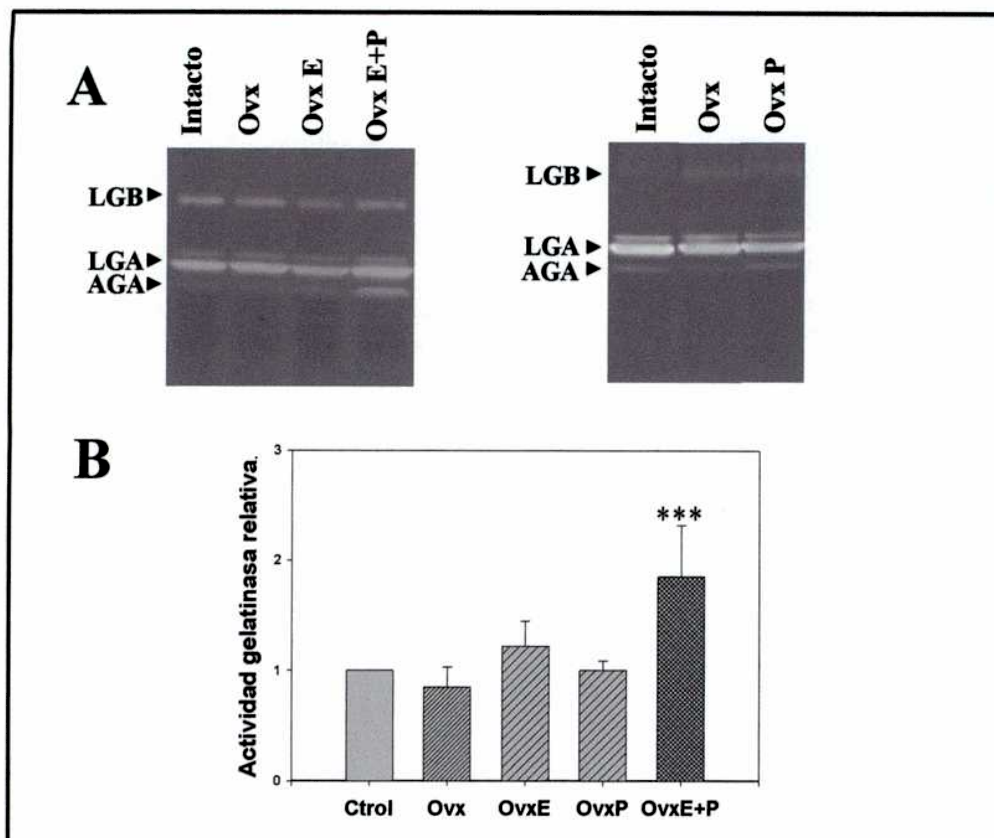
Se extirparon glándulas mamarias de ratones transgénicos PR-A y sus controles y se congelaron y procesaron para inmunofluorescencia. Los paneles (B) y (C) corresponden a glándulas de ratones transgénicos y el (A) a un ratón control. En el caso de (C) se muestra una zona con morfología normal del ratón transgénico, y la (B) una zona de morfología aberrante. La marcación para gelatinasa A (verde) fue continua en zonas de morfología normal en ratones transgénicos y en los controles. Lo mismo se observó para laminina-5 (rojo). En cambio, en zonas de morfología aberrante se observó pérdida de marcación tanto para gelatinasa A, como para laminina-5. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

### **Activación de gelatinasa A en glándulas mamarias de ratones tratados con estrógeno y progesterona.**

A continuación, para investigar si las vías del ER y/o PR afectaban los niveles de síntesis y/o activación de gelatinasa A, analizamos la actividad proteolítica en extractos obtenidos de tejidos de animales ovariectomizados y tratados con estrógeno y/o progesterona durante 5 días (Figura 30). Sólo en glándulas mamarias de ratones control tratados con estrógeno y progesterona se observó un incremento estadísticamente significativo en la forma activa de gelatinasa A. Este no fue el caso en los tratados con estrógeno o progesterona en forma individual. Estos resultados sugieren que en la glándula mamaria del ratón las hormonas estrógeno y progesterona regulan la activación de la gelatinasa A. Estamos en este momento analizando que es lo que sucede al realizar el mismo experimento con ratones transgénicos PR-A y knock-out para PR. Tal vez permitan entender porqué en los ratones PR-A, y no en los controles, el tratamiento con estrógeno + progesterona produce pérdida de la integridad de la membrana basal (Figura 26).

### **Análisis de MT1-MMP en la glándula mamaria del ratón y su relación a PR.**

Usando células en cultivo, se demostró previamente que la gelatinasa A es activada por MT1-MMP (Koshikawa et al., 2000). Habiendo encontrado que el tratamiento con estrógeno + progesterona tiene un impacto sobre la activación de esta enzima, se investigó el rol de MT1-MMP. Dado que no se han publicado hasta la fecha trabajos que analicen la



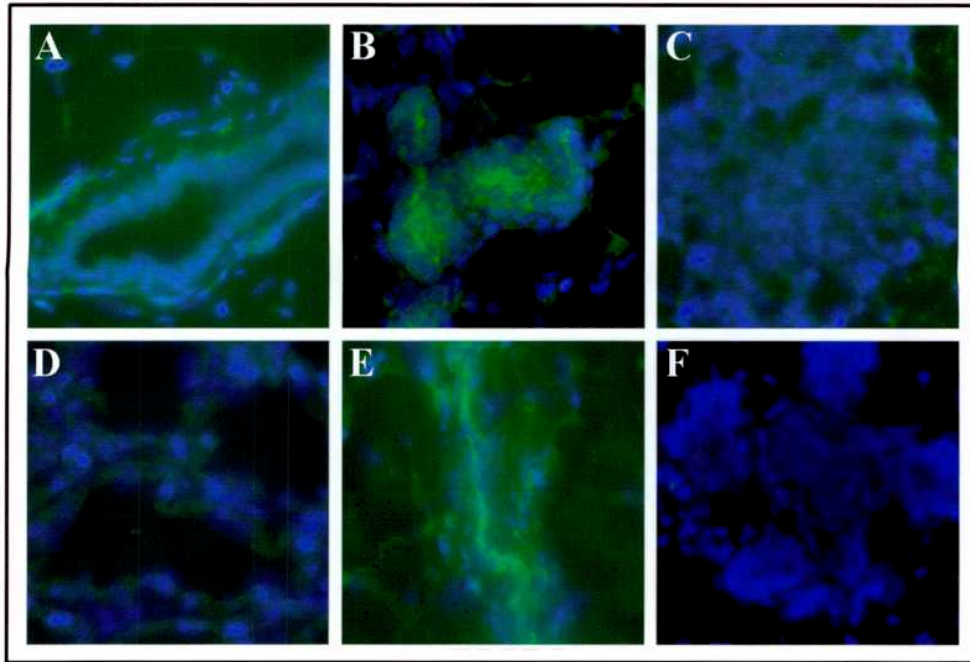
**Figura 30:** Activación de gelatinasa A por tratamiento con estrógeno y progesterona.

Ratones de la cepa FVB fueron ovariectomizados y tratados durante 5 días con vehículo (ovx), estrógeno (ovxE), progesterona (ovxP) o ambos (ovxE+P). Las glándulas mamarias fueron extirpadas, homogeneizadas, y los extractos analizados por zimogramas de gelatina. El panel A muestra geles representativos. En el panel B se muestra la media  $\pm$  DS calculadas de la cuantificación de la banda correspondiente a la forma activa de gelatinasa A (AGA) de cinco experimentos independientes donde se analizaron en total 5 animales control, 6 ovariectomizados, 4 ovariectomizados y tratados con estrógeno, 3 ovariectomizados y tratados con progesterona y 3 ovariectomizados y tratados con estrógeno y progesterona. Las diferencias entre el grupo ovx y el ovxE+P fueron estadísticamente significativas (\*\*\*) ( $P \leq 0.001$ ); ovxE vs ovxE+P (\*) ( $P \leq 0.05$ ) y ovxP vs ovxE+P (\*\*) ( $P \leq 0.01$ ); Anova con post test de Tukey.

expresión de MT1-MMP durante el desarrollo de la glándula mamaria, examinamos por inmunohistoquímica la expresión de MT1-MMP en glándulas mamarias de ratones hembras vírgenes, preñadas, durante la lactancia y finalmente durante la involución (Figura 31). Como se explica en la sección de materiales y métodos, estos resultados son preliminares. Observamos expresión de MT1-MMP tanto en el estroma como en el epitelio mamario. Se detectaron niveles bajos en las glándulas de hembras vírgenes; estos niveles fueron superiores en la preñez y bajaron con la preñez avanzada. Prácticamente no se detectó MT1-MMP durante la lactancia; tras comenzar la involución nuevamente los niveles aumentaron. Este patrón de expresión coincidió con los previamente publicados para PR (Silberstein et al., 1996; Shyamala et al., 2002).

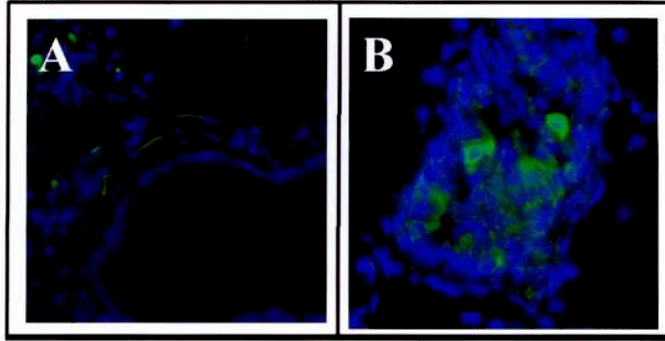
A continuación analizamos los niveles de expresión de MT1-MMP en las glándulas mamarias de los ratones PR-A y PR knock-out. En las muestras de ratones PR-A encontramos que en las estructuras epiteliales aberrantes había altos niveles de expresión de MT1-MMP en comparación con las estructuras normales adyacentes (Figura 32). Por otra parte en los animales knock-out los niveles de MT1-MMP fueron inferiores a los de los controles (Figura 33). Nuestros resultados, aunque preliminares, sugieren una relación entre la vía del PR y los niveles de expresión de MT1-MMP en el epitelio mamario.





**Figura 31:** Expresión de MT1-MMP durante los estadios de desarrollo de la glándula mamaria del ratón.

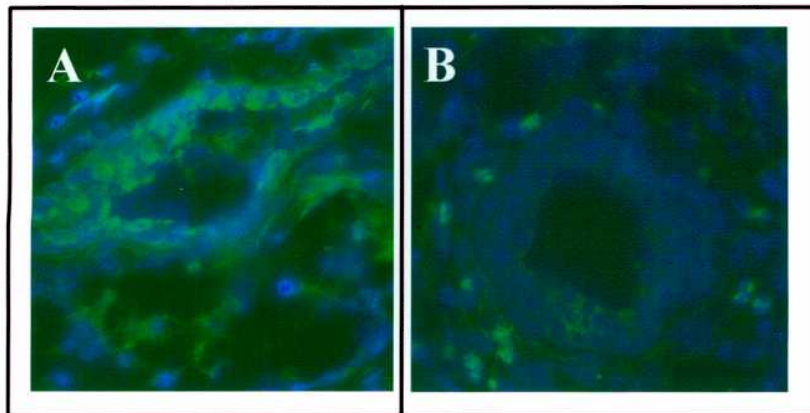
Se extirparon glándulas mamarias de ratones de la cepa FVB se congelaron y procesaron para inmunofluorescencia. Se utilizaron muestras de los siguientes estadios de desarrollo: virgen (A); preñez temprana (B); preñez tardía (C); lactancia (D); involución (E). El panel (F) muestra un control sin anticuerpo primario. En todos los casos MT1-MMP está marcada con verde. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). Se observó una pérdida de la marca con el avance de la preñez. Prácticamente no se detectó proteína durante la lactancia. Las células fueron nuevamente positivas para MT1-MMP durante la involución.



**Figura 32:** Incremento en la expresión de MT1-MMP en zonas de morfología aberrante en glándulas mamarias de ratones PR-A.

Glándulas mamarias de ratones transgénicos PR-A fueron extirpadas y analizadas por inmunofluorescencia para MT1-MMP. El panel (A) muestra una zona de morfología normal y el (B) uno de morfología aberrante. En verde se ve la marca para MT1-MMP y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Se encontró que en estructuras aberrantes de glándulas mamarias de ratones PR-A (B) había un aumento en la marca para MT1-MMP respecto de zonas adyacentes de morfología normal (A).





**Figura 33:** Disminución de la expresión de MT1-MMP en glándulas mamarias de ratones knock-out para PR.

Glándulas mamarias de ratones knock-out para PR y sus respectivos controles de la cepa 129sw/C57 fueron extirpadas y analizadas por inmunofluorescencia para MT1-MMP. El panel (A) corresponde a la glándula de un ratón control y el (B) a un knock-out. En verde se ve la marca para MT1-MMP y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Se encontró que en las glándulas mamarias de los ratones knock-out había una disminución en la marca para MT1-MMP respecto de los controles.

# *Discusión*

## Discusión

El objetivo del presente trabajo fue estudiar cómo factores que están involucrados en la morfogénesis de la glándula mamaria interactúan para regular este complejo proceso que implica la formación de un órgano funcional. Para ello utilizamos dos modelos; uno *in vitro* y otro *in vivo*. En el primero quisimos definir cuán protagónico era el rol de las MMPs en este proceso morfogénético, y a su vez establecer qué relación había entre la actividad proteolítica, los factores de crecimiento polipeptídicos y la epimorfina, un agente morfogénético. Estos estudios fueron abordados utilizando como modelo organoides primarios de glándula mamaria de ratón y células SCp2; en ambos casos se realizaron cultivos tridimensionales en geles de colágeno tipo I. Nuestros resultados demuestran que la actividad MMP es indispensable para la morfogénesis inducida tanto por factores de crecimiento polipeptídicos como por epimorfina, que la Str-1 es suficiente para inducir la formación de ramificaciones en organoides primarios, y que la plasmina, vía activación de MMPs, también es un regulador positivo de la morfogénesis.

Por otra parte, habiendo obtenido previamente fenotipos muy similares en las glándulas mamarias de animales transgénicos para Str-1 y en los transgénicos para la isoforma A del PR, quisimos investigar, en la segunda parte del trabajo, si la vía del PR estaba involucrada en la regulación de la actividad proteolítica en la glándula mamaria del ratón. Para ello utilizamos como modelos experimentales ratones transgénicos para la isoforma A de PR, ratones knock-out para PR y controles no modificados genéticamente.

Nuestros resultados revelaron que las alteraciones previamente observadas en la membrana basal de los animales transgénicos no sólo ocurren a nivel de laminina-1, ya que inmunomarcación a laminina-5 y colágeno IV revelaron alteraciones del mismo tipo. Es más, la marcación para colágeno III también estuvo reducida en áreas de morfología anormal en las glándulas mamarias de los ratones transgénicos PR-A. Por otra parte se observó un aumento de células positivas para PCNA en estas mismas áreas. Sólo en extractos de ratones knock-out para PR encontramos por zimografía una correlación entre los niveles de gelatinasa A y los de PR. Además, obtuvimos resultados que sugieren que en zonas de las glándulas mamarias de ratones PR-A que están asociadas con una pérdida de membrana basal, también habría un incremento en los niveles de gelatinasa A activa y de MT1-MMP. Finalmente pudimos dilucidar que la administración de estrógeno + progesterona regula la activación de gelatinasa A en la glándula mamaria del ratón. Nuestros resultados demuestran que no sólo factores locales como la epimorfina son capaces de regular la actividad proteolítica de la glándula mamaria; las hormonas sistémicas estrógeno y progesterona juegan un rol protagónico también.

Los factores de crecimiento polipeptídicos son expresados en altos niveles durante la elongación ductal en la glándula mamaria. En nuestros ensayos el EGF, bFGF, KGF y HGF incrementaron el porcentaje de organoides con ramificaciones. Sin embargo en ningún caso estos tratamientos afectaron la activación de la gelatinasa A, gelatinasa B, la Str-1 o el uPA. A pesar de que observamos un incremento en los niveles de las proteasas en presencia de los factores de crecimiento, éste coincidió con un incremento simultáneo en el número celular. Esto podría sugerir que los mecanismos involucrados en la morfogénesis varían entre

distintos órganos. En un modelo de desarrollo de pulmones embrionarios, el EGF y el TGF $\alpha$  incrementaron los niveles de gelatinasa A y gelatinasa B; sin embargo en este caso la adición de los factores de crecimiento estimuló la proliferación celular pero inhibió la formación de ramificaciones (Ganser et al., 1991). En células MDCK cultivadas en tres dimensiones, HGF incrementó los niveles de uPA y del receptor de uPA (uPAR) y también estimuló la morfogénesis (Pepper et al., 1992). El FGF-10 ha sido identificado como un factor derivado del mesénquima que tendría un rol en los eventos tempranos de la morfogénesis del pulmón y las extremidades (Min et al., 1998). Este factor de crecimiento se expresa en la glándula mamaria del ratón y estimula la formación de ramificaciones *in vitro* (Z. Werb, comunicación personal); cabe preguntar si el mismo tiene algún rol en la regulación de la actividad proteolítica en la glándula mamaria. Por lo tanto, los factores de crecimiento polipeptídicos afectan la morfogénesis y la expresión de proteasas en forma célula y tejido específica en distintos sistemas. Estos resultados sugieren que hay que ser cauteloso al extrapolar las conclusiones alcanzadas en un tejido a otro.

Mientras que inhibidores de serina, cisteína y aspartil proteasas no afectaron la morfogénesis inducida por los factores de crecimiento en los organoides primarios, los inhibidores de MMPs GM6001, TIMP-1 y TIMP-2 afectaron drásticamente la formación de ramificaciones inducida por factores de crecimiento. Estos resultados sugieren que las MMPs son importantes moduladores del proceso morfogénético en la glándula mamaria. De acuerdo con esto, la Str-1 fue capaz de estimular la morfogénesis de los organoides primarios. Estos resultados, junto con observaciones previas de nuestro laboratorio y otros, en los cuales se caracterizó el fenotipo de animales transgénicos que sobreexpresan la Str-1 en el epitelio

mamario (Simpson et al., 1994; Witty et al., 1995), demuestran que la Str-1 tiene un rol específico en la morfogénesis de la glándula mamaria, tanto in vivo como en cultivo. Esta conclusión está respaldada por el hecho de que la Str-1 es producida en altos niveles durante el desarrollo de la glándula mamaria, en comparación con los niveles encontrados en la glándula en reposo (Talhok et al., 1991), y que los niveles más altos son detectados alrededor de los brotes terminales y cerca de los extremos de las ramificaciones (Witty et al., 1995). Más aún, animales knock-out para Str-1 y, por otra parte, transgénicos para TIMP-1 tuvieron una reducción en el grado de ramificación de sus glándulas mamarias (M. Sternlicht, B. Weisman, M. Simian, M. J. Bissell y Z. Werb, resultados no publicados). Por último, animales tratados con pellets de TIMP-1 mostraron una reducción en el desarrollo ductal (Fata et al., 1999), lo que estaría de acuerdo con lo sugerido por nuestros resultados respecto de la necesidad de actividad MMP para que se lleve a cabo el proceso de morfogénesis.

El mecanismo por el cual la Str-1 estimula la morfogénesis no ha sido aún dilucidado. Nosotros observamos activación de la gelatinasa B por la Str-1 en el medio condicionado de los organoides. Sin embargo la gelatinasa B no tuvo efecto sobre la morfogénesis al ser agregada al medio de cultivo, lo cual sugeriría que ésta no mediaría directamente el efecto observado con la Str-1. La gelatinasa A tampoco tuvo efectos morfogenéticos en nuestros cultivos. Sin embargo análisis preliminares de las glándulas mamarias de ratones knock-out para gelatinasa A indicarían que la misma es necesaria para la elongación ductal pero no para el desarrollo de las ramificaciones laterales (M. Sternlicht, B. Weisman, M. Simian, M. J. Bissell y Z. Werb, resultados no publicados). Por otra parte la correcta ubicación espacial y/o activación de estas enzimas proteolíticas podría ser un factor importante para que tengan

efecto morfogenético, lo cual no es siempre posible de controlar en sistemas de cultivo. Esto podría explicar nuestros resultados negativos con las gelatinasas A y B.

Las MMPs pueden afectar la morfogénesis por proteólisis de componentes de la matriz extracelular liberando de esta manera restricciones mecánicas. El clivaje de la matriz podría resultar también en la liberación de factores de crecimiento u otras moléculas con actividad morforegulatoria. Los productos de la degradación de la laminina-1, por ejemplo, aumentan la capacidad invasiva de células tumorales (Bresalier et al., 1995), y el clivaje de la laminina-5 por la gelatinasa A estimula la locomoción de células epiteliales de glándula mamaria en reposo (Giannelli et al., 1997). Por otra parte las MMPs pueden clivar moléculas de la superficie celular como selectinas y moléculas involucradas en la adhesión célula-célula como la E-cadherina (Lochter et al., 1997a). Este proceso podría promover los rearrreglos celulares y la morfogénesis al hacer más débiles las uniones entre células o disparando la activación de determinadas vías de transducción de señales.

Como sucede con la Str-1, los niveles de uPA están regulados durante el desarrollo de la glándula mamaria del ratón (Talhouk et al., 1992). Tanto la proteína como el mRNA son altos en las glándulas de hembras vírgenes, preñadas y en involución, mientras que los niveles son bajos durante la preñez avanzada y la lactancia (Busso et al., 1989). Sin embargo cuando el uPA fue sobreexpresado en la glándula mamaria de ratones transgénicos, no se detectaron alteraciones en la morfogénesis de la glándula mamaria, a pesar de que la proteína estaba presente en la leche de los ratones transgénicos (Pittius et al., 1988; Hennighausen et al., 1991). De la misma manera, en el presente trabajo el uPA no afectó la morfogénesis de

los organoides, y por otra parte la estimulación de la formación de ramificaciones inducida por factores de crecimiento polipeptídicos no se vió afectada por inhibidores de serina proteasas. Sin embargo encontramos que la plasmina indujo la morfogénesis, activó MMPs en los cultivos tridimensionales de organoides y además su efecto morfogenético fue inhibido por inhibidores de serina y MMPs. Estos resultados apuntan a un modelo en el cual la morfogénesis es un proceso MMP-dependiente, donde la activación de la Str-1 está río abajo de la plasmina.

Estudios previos utilizando la línea celular de glándula mamaria NMuMG describieron un aumento de la actividad de uPA cuando las células fueron inducidas a desarrollar ramificaciones con medio condicionado de fibroblastos; en este caso el efecto morfogenético fue inhibido por un inhibidor de serina proteasas (Delannoy-Courdent et al., 1996; Delannoy-Courdent et al., 1998). Resultados similares fueron obtenidos utilizando la línea celular MDCK, de riñón de perro (Pepper et al., 1992). Otros investigadores han mostrado que la invasión de matrices de colágeno tipo I por las células MDCK es estimulada por MT-MMPs (Hotary et al., 2000). En nuestro modelo la morfogénesis inducida por plasmina fue inhibida por un inhibidor de MMPs. Todos estos resultados sugerirían que la activación de MMPs por serina proteasas podría ser un mecanismo que sucede en distintos tipos celulares y procesos biológicos.

Los organoides primarios son heterogéneos, estando compuestos por células epiteliales lumbales, mioepiteliales y fibroblastos. En consecuencia contienen epimorfina y componentes de la matriz extracelular como la laminina, la entactina y el colágeno de tipo IV



(Hirai et al., 1998). A pesar de ser un sistema fisiológicamente relevante, es difícil a veces determinar qué factor está actuando sobre qué tipo celular. Para definir cuáles son los requerimientos mínimos para que se lleve a cabo la morfogénesis en células epiteliales, utilizamos una línea celular luminal. Hemos demostrado previamente que la morfogénesis de las células SCp2 en geles de colágeno de tipo I requiere de epimorfina (Hirai et al., 1998). Mostramos ahora que la morfogénesis inducida por epimorfina es inhibida por GM6001, un inhibidor de MMPs, pero no por inhibidores de serina, cisteína o aspartil proteasas. Fue muy interesante encontrar que la epimorfina ejerce una regulación positiva sobre la síntesis de gelatinasa A, B y Str-1 en células SCp2. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con los organoides primarios, el agregado de Str-1 recombinante a las células SCp2 no indujo morfogénesis, y tampoco aumentó el efecto morfogenético de la epimorfina. Esto sugeriría que las MMPs, aunque son indispensables para la formación de ramificaciones, no son por sí solas capaces de inducir la totalidad del programa morfogenético en células epiteliales lumbinales, y que se necesitaría de otros factores que serían aportados por células mioepiteliales o fibroblastos. La epimorfina es un candidato ideal, ya que su agregado a las células SCp2 fue suficiente para inducir la morfogénesis en ausencia de otros tipos celulares. Por lo tanto la epimorfina y la actividad MMP juntas constituyen el requerimiento mínimo para que se lleve a cabo la morfogénesis de células epiteliales de mama. El efecto morfogenético de la epimorfina es aumentado en forma dramática con el agregado exógeno de factores de crecimiento polipeptídicos (Hirai et al., 1998). Ni la epimorfina ni las MMPs afectan la proliferación celular de células epiteliales de mama, y por lo tanto pueden ser considerados factores morfogenéticos. Los factores de crecimiento, por otra parte, proveen el motor proliferativo necesario para que se dé de manifiesto la morfogénesis. El hecho de que

hallamos que la actividad MMP era requerida para la proliferación de los organoides primarios y no para los cúmulos de células SCp2 sugiere que en los organoides el efecto podría ser secundario. Por ejemplo, las células mioepiteliales o la membrana basal podrían necesitar ser remodeladas para permitir la liberación de algún factor requerido para la proliferación de las células epiteliales dentro del organoide. Sin embargo, también es posible que la proliferación dentro del organoide necesite de la degradación de la membrana basal y que esto no ocurra en ausencia de actividad de MMP.

Mientras que la epimorfina es expresada en forma abundante alrededor del parénquima de la glándula mamaria durante todos los estadios de desarrollo (Hirai et al., 1998), la expresión de MMPs y factores de crecimiento correlacionan con los períodos de remodelación tisular en la mama (Yang et al., 1995). Por lo tanto la epimorfina podría ser considerada como la señal primaria para la morfogénesis (Hirai et al., 1998), pero la regulación precisa del fenómeno estaría bajo la regulación de las MMPs y los factores de crecimiento. Los factores de crecimiento, que deben estar precisamente regulados, permitirían la proliferación celular que es esencial para el desarrollo de nuevas estructuras, pero no tendrían un rol morforegulatorio per se, como se discutió previamente (Hirai et al., 1998). El hallazgo en este trabajo de que la epimorfina regula la actividad MMP crea el espacio para preguntar cómo y cuándo la célula epitelial percibe la presencia de la epimorfina durante el desarrollo de la glándula mamaria. La identificación del receptor de epimorfina ayudará a entender en mayor detalle su rol en la morfogénesis de la glándula mamaria.

Otras moléculas que podrían regular a las MMPs localmente durante la morfogénesis son los componentes de la matriz extracelular, muchos de los cuales afectan la expresión de MMPs y son finamente regulados durante el desarrollo de la glándula mamaria. Hemos demostrado previamente que una membrana basal reconstituida (Matrigel) puede regular la expresión de Str-1 en líneas celulares de glándula mamaria (Lochter et al., 1997a). Se desconoce aún cual es la relación entre las moléculas de la matriz extracelular, sus receptores y las MMPs. Es interesante mencionar que la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , que es necesaria para la morfogénesis de la glándula mamaria (Berdichevsky et al., 1994), también media la invasión de células de carcinoma de mama a través de filtros cubiertos con Matrigel mediante la regulación de los niveles de Str-1 (Lochter et al., 1999). La observación previa por parte de nuestro laboratorio de que la Str-1 puede inducir una conversión epitelio-mesenquimal de células de mama (Lochter et al., 1997a) nos lleva a postular la posibilidad de que en el extremo de la ramificación epitelial que invade el estroma podría ocurrir transientemente esta trans-diferenciación, otorgándole a la célula epitelial un fenotipo más invasor.

Nuestros resultados establecen que la actividad MMP es un requerimiento indispensable para el desarrollo de ramificaciones, y que la epimorfina es un regulador local de la actividad MMP. Por otra parte confirmamos la observación realizada por nuestro laboratorio en cuanto al rol de la Str-1 en la morfogénesis de la glándula mamaria (Simpson et al., 1994). Sin embargo, como fue mencionado en la introducción, los estrógenos y la progesterona son también importantes reguladores del desarrollo de la mama. Animales transgénicos para la isoforma A del PR presentaron un fenotipo que se caracterizó por el incremento del número de ramificaciones laterales, la hiperplasia, la desorganización de la

membrana basal y la pérdida de adhesión celular (Shyamala et al., 1998). Este fenotipo fue muy similar al observado en los transgénicos para Str-1 (Sympson et al., 1994; Thomasset et al., 1998). Por lo tanto el objetivo que abordamos en la segunda parte de este trabajo fue establecer si la vía del PR tiene un rol en la regulación de la actividad MMP y si las mismas están involucradas en el fenotipo encontrado en los animales PR-A.

La integridad de la membrana basal está dictada por la presencia de MMPs, el estado de activación de las mismas y la concentración de sus inhibidores (Duffy et al., 2000). Nosotros encontramos en los ratones transgénicos PR-A una pérdida de componentes de la membrana basal como laminina-5 y colágeno IV. También encontramos alteraciones en la inmunomarcación del colágeno estromal III. Tanto la marcación para laminina-1 (mostrado en este trabajo), como la de laminin-5 y colágeno IV (Shyamala y colaboradores, resultados no publicados) fueron recuperadas en los animales transgénicos ovariectomizados. Estos resultados implicarían que la pérdida de componentes de la membrana basal observada en las glándulas mamarias de animales transgénicos es resultado de la acción hormonal. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que estos mismos componentes se pierden nuevamente al tratar a los animales transgénicos ovariectomizados con estrógeno + progesterona. En la glándula mamaria la gelatinasa A parece jugar un rol fundamental en la degradación de laminina-5 (Giannelli et al., 1999). Estos autores encontraron una correlación entre la presencia de fragmentos de degradación de la laminina-5 (evaluada por western blot) y los períodos de remodelación tisular de la glándula mamaria de ratas. Tras la administración de estrógeno y progesterona a ratas sexualmente inmaduras, observaron un aumento en los niveles de gelatinasa A por inmunohistoquímica y degradación de laminina-

5, todo esto acompañado por un incremento en la proliferación del epitelio mamario. Sin embargo no analizaron la continuidad de la laminina-5 en las glándulas mamarias de las ratas tratadas con estrógeno + progesterona. En nuestro sistema no observamos pérdida de la membrana basal en los animales control tratados con hormonas; esto no implica que no haya remodelación y por lo tanto producción de fragmentos de laminina-5. Esta idea está respaldada por la observación realizada en el trabajo de Keely y colaboradores (Keely et al., 1995) donde un estudio de hibridización *in situ* demuestra que la síntesis de laminina aumenta durante la preñez en la glándula mamaria del ratón. Todos estos resultados integrados apuntarían a un modelo donde el aumento de los niveles hormonales que se da durante la preñez llevaría por un lado a la degradación de componentes de la membrana basal para permitir la proliferación y diferenciación celular, junto con un aumento de su deposición para evitar justamente una pérdida de integridad de la membrana basal. En nuestro caso en los animales transgénicos observamos pérdida de la integridad de la membrana basal; este fenómeno podría por lo tanto explicarse de dos maneras: por el incremento de la actividad proteolítica o por una disminución en la capacidad de producción de componentes de la membrana basal por parte de los fibroblastos que rodean las zonas de morfología anormal en las glándulas mamarias de los ratones PR-A. Nuestra hipótesis de trabajo es la primera; sin embargo el análisis de los fibroblastos que rodean a las regiones aberrantes en los ratones PR-A probablemente nos permita entender mejor el fenotipo de estos animales.

El análisis del porcentaje de células positivas para PCNA reveló que en las zonas de morfología anormal en las glándulas mamarias de los ratones PR-A hay un incremento en el número de células positivas para este marcador de proliferación celular. Sin embargo en este

trabajo no se determinó si este incremento es consecuencia directa de la pérdida de componentes de la membrana basal (o viceversa). Una manera de evaluar la primera posibilidad sería tratando a los animales con inhibidores de metaloproteasas y analizando si este tratamiento revierte el fenotipo encontrado en los animales transgénicos. En este caso un resultado positivo daría una explicación e implicaría que la degradación de la membrana basal sería consecuencia de un aumento de actividad proteolítica y llevaría a un aumento de la proliferación celular. Sin embargo, un resultado negativo habría nuevas incógnitas, ya que podrían estar afectadas otras proteasas como las serina proteasas, u otros factores no relacionados con la actividad proteolítica que no hemos analizado hasta el momento.

La correlación encontrada entre los niveles de PR y el fenotipo de animales transgénicos y knock-out para este receptor sugieren que esta vía regula los niveles de proteasas en la glándula mamaria. Análisis de la actividad de gelatinasas en extractos de glándulas mamarias de ratones transgénicos PR-A no revelaron un incremento significativo en los niveles de gelatinasa A; encambio, en extractos de glándulas mamarias de ratones knock-out hubo una reducción significativa de los niveles totales de gelatinasa A. No se observaron cambios en los niveles de gelatinasa B. Es interesante señalar que en los ovarios de los ratones knock-out para PR se encontró una disminución en los niveles de ADAMTS-1 y catepsina L a nivel de mRNA; sin embargo no se detectaron cambios en la actividad de gelatinasa A y B por zimografía (Robker et al., 2000). Nuestros resultados sugieren que los niveles de PR regulan la actividad de gelatinasa A en la glándula mamaria del ratón. El hecho de que sólo encontramos una tendencia y no diferencias significativas entre los transgénicos PR-A y los controles es probablemente atribuible al hecho de que en estos ratones la

expresión del transgen no se da en todas las células epiteliales luminales, con lo cual al realizar un extracto total de glándula mamaria se diluye la diferencia. Estos resultados sugieren lo inapropiado que es realizar zimogramas en este tipo de tejidos si no van acompañados de estudios inmunohistoquímicos. Mas aún, nuestra suposición es respaldada por el hecho de que detectamos niveles inferiores de la forma latente de gelatinasa A en el estroma peri epitelial en estructuras aberrantes en los ratones transgénicos. En los sitios de pérdida de laminina-5 se observó una disminución en los niveles de marcación de gelatinasa A latente, sugiriendo que la misma había sido activada, dado que justamente la laminina-5 es un sustrato de la gelatinasa A.

En el trabajo de Giannelli y colaboradores se observó un aumento de la marca de gelatinasa A por inmunohistoquímica tras el tratamiento con estrógeno y progesterona (Giannelli et al., 1999). Se utilizó en este estudio un anticuerpo que detecta tanto la forma latente como la activa de la MMP. Por otra parte se vió un aumento en el producto de degradación de la laminina-5. Sin embargo los autores no demostraron en este trabajo si realmente había un aumento en la activación de la gelatinasa A, ni si esto era resultado de la acción del estrógeno, la progesterona o ambas hormonas juntas. Nosotros ahora demostramos que efectivamente hay un incremento en la forma activa de la gelatinasa A al tratar a ratones hembra vírgenes ovariectomizados con estrógeno + progesterona. Por otra parte observamos en experimentos preliminares que el tratamiento de ratones transgénicos PR-A con progesterona sola induce la activación de la gelatinasa A, lo cual no sucede en animales control como se muestra en este trabajo. De confirmarse este resultado el mismo indicaría que sería la vía del PR y no la del ER en parte la responsable de la activación de la gelatinasa

A. Cabe destacar, sin embargo, que creemos que habría otras vías, independientes a la de PR, que también jugarían un rol en la activación de la gelatinasa A. Esta hipótesis surge de la observación de que en los ratones knock-out se detectó gelatinasa A activa; de ser la vía del PR la única responsable de la activación de la gelatinasa A, entonces la misma no debería haber sido detectada en los extractos de ratones knock-out.

En células epiteliales de carcinoma de colon se demostró que es la MT1-MMP la responsable de la activación de la gelatinasa A y que ambas enzimas co-localizan con fragmentos de degradación de laminina-5 (Koshikawa et al., 2000). Habiendo observado que el tratamiento con estrógeno + progesterona induce la activación de la gelatinasa A en la glándula mamaria, analizamos, hasta ahora en forma preliminar, cuál era el patrón de expresión de MT1-MMP durante el desarrollo de la misma. Encontramos que MT1-MMP es expresada tanto por células epiteliales como por el estroma de la glándula mamaria. Por otra parte el patrón de expresión coincidió con el de PR (Shyamala et al., 1990; Shyamala et al., 2002), es decir, que MT1-MMP fue detectada en la glándula de animales vírgenes y durante los estadios tempranos de la preñez. Al final de la preñez y durante la lactancia prácticamente no se detectó la proteasa; los niveles incrementaron con la involución. Nuestros resultados respecto del tipo celular que expresa MT1-MMP no coinciden con los reportados por Ha y colaboradores (Ha et al., 2001). Estos autores mencionan la presencia de MT1-MMP sólo en el estroma durante todos los períodos de desarrollo de la glándula mamaria. Sin embargo experimentos recientes de hibridización *in situ* del laboratorio de la Dra Zena Werb confirman nuestros resultados (Z. Werb, comunicación personal).



Dado que el perfil de expresión de MT1-MMP coincidió con el de PR, y que, por otra parte, observamos una pérdida de laminina-5 en la membrana basal en zonas de desorganización en las glándulas mamarias de los ratones transgénicos PR-A, investigamos si MT1-MMP estaba sobreexpresada en estas regiones. Esto fue efectivamente lo que encontramos en nuestros experimentos preliminares. Por lo tanto, la sobreexpresión de MT1-MMP, la pérdida de laminina-5 y la proliferación celular están todas asociadas con la pérdida de adhesión celular y la desorganización del tejido en las glándulas mamarias de los ratones PR-A.

En un trabajo anterior se describió la pérdida de E-cadherina en las células epiteliales de glándula mamaria de los ratones transgénicos PR-A (Shyamala et al., 1998). Por otra parte se ha descrito que en células de carcinoma escamoso la E-cadherina regula en forma negativa la expresión de MT1-MMP (Ara et al., 2000). Creemos, por lo tanto, que esta pérdida de adhesión célula-célula podría afectar la expresión de MT1-MMP, y en consecuencia afectar la integridad de la laminina-5. La laminina-5 tiene funciones duales ya que puede inducir adhesión celular a través de hemidesmosomas (Baker et al., 1996), o la motilidad celular cuando es degradada (Giannelli et al., 1997). Por lo tanto es posible que en presencia de E-cadherina, con una disminución en los niveles de MT1-MMP, la laminina-5 actúe como una molécula de adhesión celular y mantenga la integridad de la membrana basal y de los conductos mamarios. En consecuencia, es válido suponer que en las glándulas mamarias de los ratones PR-A, la expresión elevada de MT1-MMP en zonas de morfología aberrante lleve a la degradación de la laminina-5, a una disminución de su forma nativa, a una pérdida de la adhesión celular, y un aumento en la motilidad. Esto coincidiría

conceptualmente con la observación de que en la línea celular de mama HC11, los niveles de MT1-MMP disminuyen cuando las células alcanzan confluencia y establecen contactos célula-célula (Tanaka et al., 1997). Dado que la E-cadherina puede ser degradada por la Str-1 y por la matrilisina (Noe et al., 2001), sería interesante investigar si las mismas están sobreexpresadas en las glándulas mamarias de los ratones transgénicos PR-A, y evaluar entonces si en nuestro sistema hay alguna relación directa entre pérdida de E-cadherina, MT1-MMP y laminina-5.

El impacto de PR sobre la integridad de la membrana basal parecería estar diferencialmente modulado por sus dos isoformas. Esta conclusión surge de la observación de que en animales transgénicos para la isoforma B del PR no se observan las pérdidas de componentes de la membrana basal y estroma periepitelial que se describen en este trabajo para los animales transgénicos PR-A (Shyamala y colaboradores, comunicación personal). Es más, los animales que sobreexpresan la isoforma B de PR se caracterizan por un arresto en su capacidad de desarrollo ductal, sin estar alterada su desarrollo lóbulo-alveolar (Shyamala et al., 2000). Esto demostraría que los efectos del PR sobre la glándula mamaria son complejos, y dependen de un balance adecuado de sus dos isoformas.

Habiendo obtenido resultados que sugieren que la vía del PR regula la actividad proteolítica de la glándula mamaria, cabe preguntarse si el efecto sobre la síntesis de las proteasas es directo, es decir si el PR actúa directamente sobre el promotor de las proteasas, si lo hace indirectamente afectando la actividad de sitios tipo AP-1, o si es indirecto, vía factores intermediarios locales o sistémicos. Una manera de contestar en parte esta pregunta

sería diseñando experimentos *in vitro* con células epiteliales de mama, positivas para PR, transfectadas con un promotor de la proteasa a analizar río arriba de un gen reporter, como la luciferasa. Nosotros hemos realizado experimentos preliminares utilizando el promotor de la colagenasa 1, y obtuvimos resultados que sugerirían que el PR, a través de su acción indirecta sobre sitios AP-1, estimularía la síntesis de esta proteasa. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estudios de hibridización *in situ* sugieren que en el caso de la glándula mamaria el estroma sería responsable de la síntesis de MMPs solubles como la gelatinasa A. Sería más válido realizar el mismo experimento con el promotor de una MMP expresada por el epitelio, como MT1-MMP. Por otra parte, sería interesante analizar si el epitelio mamario expresa EMMPRIN (“extracellular matrix MMP inducer”), y si su expresión está regulada hormonalmente. Esta proteína es un candidato ideal como mediadora de señales entre el epitelio y el estroma en lo que se refiere a actividad proteolítica. Por último no hay hasta el momento disponible en la literatura un trabajo que haya analizado en forma ordenada la presencia de sitios respondedores a estrógenos o progesterona en los promotores de las proteasas. Este análisis permitiría entender mejor cuál es el rol de las hormonas en la regulación de la proteólisis durante la morfogénesis de la glándula mamaria, y cuál es su mecanismo de acción.

Dado que nuestro laboratorio ya ha demostrado que la sobreexpresión de una metaloproteasa como la Str-1 en la glándula mamaria del ratón lleva a la pérdida de la membrana basal y al desarrollo de tumores mamarios (Simpson et al., 1994), creemos que dada la pérdida de los componentes de la matriz extracelular que encontramos en los ratones

transgénicos PR-A, la aparición de tumores de mama en estos animales es un evento probable.

El rol de las proteasas en la morfogénesis ha sido postulado hace ya muchos años (Bernfield et al., 1984). En este trabajo analizamos cuán protagónico es este rol y qué factores locales y sistémicos regulan su actividad. El entendimiento de los mecanismos que regulan la invasión y la estructura del tejido en un contexto fisiológico nos permitirán entender su papel en el surgimiento del cáncer.

# *Conclusiones*

## Conclusiones

De la primera parte de este trabajo se puede concluir que:

Los experimentos realizados en geles de colágeno de tipo I son una herramienta adecuada para estudiar en mayor detalle el rol de la actividad proteolítica en la morfogénesis de la glándula mamaria ya que permitieron confirmar el resultado previo obtenido a través de la generación de animales transgénicos.

- En el sistema de organoides primarios como en el de las células SCp2 la actividad MMP es un requerimiento indispensable para que se lleve a cabo la morfogénesis.
- En organoides primarios la actividad proteolítica es capaz de tener un efecto morfogenético por sí misma: en particular se comprobó actividad morfogenética de la Str-1 y de la plasmina.
- El efecto morfogenético de la epimorfina también estaría mediado por actividad de MMPs ya que: 1) es un requerimiento indispensable para que se lleve a cabo la morfogénesis de células SCp2 y 2) estimula la síntesis de MMPs por parte de células epiteliales de mama .
- De los resultados obtenidos con células SCp2 se desprendería que la actividad MMP no es un requerimiento indispensable para la proliferación celular, pero sí para la morfogénesis.

De la segunda parte de este trabajo se puede concluir que:

La membrana basal de las glándulas mamarias de los ratones transgénicos PR-A está ampliamente alterada; además de la laminina-1, encontramos que la laminina-5 y el

colágeno IV están disminuidos en las zonas aberrantes. También se vió alterada la distribución del colágeno III.

El fenotipo encontrado en los animales PR-A es consecuencia de la acción hormonal: esto se comprobó mediante la ovariectomía y tratamiento con estrógeno + progesterona donde se observó que el fenotipo es reversible.

Los niveles de gelatinasa A estarían en parte regulados por los niveles de PR: esto se desprende de los resultados obtenidos con los ratones knock-out para PR. En los transgénicos PR-A no observamos por zimografía una correlación entre los niveles de PR y la actividad proteolítica.

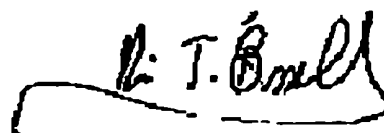
Las hormonas estrógeno y progesterona estarían involucradas en la activación de la gelatinasa A en la glándula mamaria del ratón.

Estudios preliminares apuntarían hacia una regulación por parte de la vía del PR de los niveles de MT1-MMP.

En síntesis este trabajo permitió establecer que la regulación de la actividad proteolítica en la glándula mamaria del ratón ocurre tanto a nivel local como sistémico, y que juega un papel fundamental en la morfogénesis de la misma.



Marina Simian



Dra Mina J. Bissell

# *Bibliografía*



## Bibliografia

1. Alford, D., D.Baekstrom, M.Geyp, P.Pitha, and J.Taylor-Papadimitriou. 1998. Integrin-matrix interactions affect the form of the structures developing from human mammary epithelial cells in collagen or fibrin gels. *J Cell Sci.* 111 ( Pt 4):521-532.
2. Andres, A.C. and R.Strange. 1999. Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 4:221-228.
3. Ara, T., Y.Deyama, Y.Yoshimura, F.Higashino, M.Shindoh, A.Matsumoto, and H.Fukuda. 2000. Membrane type 1-matrix metalloproteinase expression is regulated by E-cadherin through the suppression of mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Lett.* 157:115-121.
4. Baker, S.E., S.B.Hopkinson, M.Fitchmun, G.L.Andreason, F.Frasier, G.Plopper, V.Quaranta, and J.C.Jones. 1996. Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J. Cell Sci.* 109 ( Pt 10):2509-2520.
5. Bauer, E.A., G.P.Stricklin, J.J.Jeffrey, and A.Z.Eisen. 1975. Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64:232-240.

6. Bennett, M.K., N.Calakos, and R.H.Scheller. 1992. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257:255-259.
7. Berdichevsky, F., D.Alford, D.S.B, and J.Taylor-Papadimitriou. 1994. Branching morphogenesis of human mammary epithelial cells in collagen gels. *J Cell Sci* 107:3557-68.
8. Berdichevsky, F., C.Gilbert, M.Shearer, and J.Taylor-Papadimitriou. 1992. Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells: the role of the alpha 2 beta 1 integrin. *J Cell Sci* 102:437-46.
9. Bernfield, M., S.D.Banerjee, J.E.Koda, and A.C.Rapraeger. 1984. Remodelling of the basement membrane: morphogenesis and maturation. *Ciba Found Symp* 108:179-96.
10. Bian, J. and Y.Sun. 1997. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol. Cell. Biol.* 17:6330-6338.
11. Bissell, M.J. and T.G.Ram. 1989. Regulation of functional cytodifferentiation and histogenesis in mammary epithelial cells: role of the extracellular matrix. *Environ Health Perspect* 80:61-70.

12. Bocchinfuso, W.P. and K.S.Korach. 1997. Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2:323-334.
13. Borradori, L. and A.Sonnenberg. 1996. Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:647-656.
14. Boudreau, N. and M.J.Bissell. 1998. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr. Opin. Cell Biol* 10:640-646.
15. Boudreau, N., C.J.Sympson, Z.Werb, and M.J.Bissell. 1995. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267:891-3.
16. Bresalier, R.S., B.Schwartz, Y.S.Kim, Q.Y.Duh, H.K.Kleinman, and P.M.Sullam. 1995. The laminin alpha 1 chain Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV)-containing peptide promotes liver colonization by human colon cancer cells. *Cancer Res* 55:2476-80.
17. Busso, N., J.Huarte, J.D.Vassalli, A.P.Sappino, and D.Belin. 1989. Plasminogen activators in the mouse mammary gland. Decreased expression during lactation. *J Biol Chem* 264:7455-7.
18. Clark, E.A. and J.S.Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-239.

19. Coleman, S., G.B.Silberstein, and C.W.Daniel. 1988. Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland: evidence supporting a role for epidermal growth factor. *Dev Biol* 127:304-15.
20. Coleman-Krnacik, S. and J.M.Rosen. 1994. Differential temporal and spatial gene expression of fibroblast growth factor family members during mouse mammary gland development. *Mol Endocrinol* 8:218-29.
21. Colognato, H., M.MacCarrick, J.J.O'Rear, and P.D.Yurchenco. 1997. The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *J. Biol. Chem.* 272:29330-29336.
22. Cooper, A. 1845. *The Anatomy and Diseases of the Breast*. Lea and Blanchard, Philadelphia.
23. Crawford, H.C., B.M.Fingleton, L.A.Rudolph-Owen, K.J.Goss, B.Rubinfeld, and et al. 1999. The metalloproteinase matrilysin is a target of  $\beta$ -catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 18:2883-2891.
24. Cunha, G.R. 1994. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer* 74:1030-44.

25. d'Ortho, M.P., H.Stanton, M.Butler, S.J.Atkinson, G.Murphy, and R.M.Hembry. 1998. MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films [In Process Citation]. *FEBS Lett* 421:159-64.
26. Daniel, C.W., G.B.Silberstein, K.Van Horn, P.Strickland, and S.Robinson. 1989. TGF-beta 1-induced inhibition of mouse mammary ductal growth: developmental specificity and characterization. *Dev Biol* 135:20-30.
27. Delannoy-Courdent, A., W.Fauquette, X.F.Dong-Le Bourhis, B.Boilly, B.Vandenbunder, and X.Desbiens. 1996. Expression of c-ets-1 and uPA genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol* 40:1097-108.
28. Delannoy-Courdent, A., V.Mattot, V.Fafeur, W.Fauquette, I.Pollet, T.Calmels, C.Vercamer, B.Boilly, B.Vandenbunder, and X.Desbiens. 1998. The expression of an Ets1 transcription factor lacking its activation domain decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering in mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 111:1521-34.
29. Delany, A.M., J.J.Jeffrey, S.Rydziel, and E.Canalis. 1995. Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270:26607-26612.

30. Delcommenne, M. and C.H.Streuli. 1999. Production of rat monoclonal antibodies specific for mouse integrins. *Methods Mol. Biol.* 129:19-34.
31. Deryugina, E.I., B.Ratnikov, E.Monosov, T.I.Postnova, R.DiScipio, and et al. 2001. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin  $\alpha v\beta 3$  promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 263:209-223.
32. Desprez, P.Y., C.Roskelley, J.Campisi, and M.J.Bissell. 1993. Isolation of functional cell lines from a mouse mammary epithelial cell strain: the importance of basement membrane and cell-cell interaction. *Mol. Cell Differ* 1:99-110.
33. Deugnier, M.A., E.P.Moiseyeva, J.P.Thiery, and M.Glukhova. 1995. Myoepithelial cell differentiation in the developing mammary gland: progressive acquisition of smooth muscle phenotype. *Dev. Dyn.* 204:107-117.
34. Duffy, M.J., T.M.Maguire, A.Hill, E.McDermott, and N.O'Higgins. 2000. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2:252-257.
35. Eble, J.A., R.Golbik, K.Mann, and K.Kuhn. 1993. The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [alpha 1(IV)]<sub>2</sub> alpha 2(IV). *EMBO J.* 12:4795-4802.

36. Edwards, D.R. 2001. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). In *Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy*, ed. NJ Clendeninn, K Appelt., Totowa, NJ: Humana. 67-84.
37. Egeblad, M. and Z.Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev. Cancer* 2:161-174.
38. English, W.R., X.S.Puente, J.M.Freije, V.Knauper, A.Amour, and et al. 2000. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor- $\alpha$  convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J. Biol. Chem.* 275:14046-14055.
39. Faraldo, M.M., M.A.Deugnier, M.Lukashev, J.P.Thiery, and M.A.Glukhova. 1998. Perturbation of beta1-integrin function alters the development of murine mammary gland. *Embo J* 17:2139-47.
40. Fata, J.E., K.J.Leco, R.A.Moorehead, D.C.Martin, and R.Khokha. 1999. Timp-1 is important for epithelial proliferation and branching morphogenesis during mouse mammary development. *Dev. Biol.* 211:238-254.
41. Fata, J.E., K.J.Leco, E.B.Voura, H.Y.Yu, P.Waterhouse, G.Murphy, R.A.Moorehead, and R.Khokha. 2001. Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland. *J. Clin. Invest* 108:831-841.

42. Fendrick, J.L., A.M.Raafat, and S.Z.Haslam. 1998. Mammary gland growth and development from the postnatal period to postmenopause: ovarian steroid receptor ontogeny and regulation in the mouse. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 3:7-22.
43. Ferguson, J.E., A.M.Schor, A.Howell, and M.W.Ferguson. 1992. Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle. *Cell Tissue Res.* 268:167-177.
44. Finch, P.W., J.S.Rubin, T.Miki, D.Ron, and S.A.Aaronson. 1989. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 245:752-755.
45. Fini, M.E., J.R.Cook, R.Mohan, and C.E.Brinckerhoff. 1998. Regulation of matrix metallopro-teinase gene expression. In *Matrix Metallo-proteinases*,ed. New York: Academic, 299-356.
46. Fukuda, Y., Y.Masuda, J.Kishi, Y.Hashimoto, T.Hayakawa, H.Nogawa, and Y.Nakanishi. 1988. The role of interstitial collagens in cleft formation of mouse embryonic submandibular gland during initial branching. *Development* 103:259-267.
47. Ganser, G.L., G.P.Stricklin, and L.M.Matrisian. 1991. EGF and TGF alpha influence in vitro lung development by the induction of matrix-degrading metalloproteinases. *Int J Dev Biol* 35:453-61.



48. Giannelli, G., J.Falk-Marzillier, O.Schiraldi, W.G.Stetler-Stevenson, and V.Quaranta. 1997. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277:225-8.
49. Giannelli, G., A.Pozzi, W.G.Stetler-Stevenson, H.A.Gardner, and V.Quaranta. 1999. Expression of matrix metalloprotease-2-cleaved laminin-5 in breast remodeling stimulated by sex steroids. *Am J Pathol* 154:1193-201.
50. Gijbels, K., R.E.Galardy, and L.Steinman. 1994. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest* 94:2177-82.
51. Gomez, D.E., D.F.Alonso, H.Yoshiji, and U.P.Thorgeirsson. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 74:111-122.
52. Grobelny, D., L.Poncz, and R.E.Galardy. 1992. Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids. *Biochemistry* 31:7152-4.
53. Gross, J. and C.M.Lapiere. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:1014-1022.

54. Guelstein, V.I., T.A.Tchypysheva, V.D.Ermilova, and A.V.Ljubimov. 1993. Myoepithelial and basement membrane antigens in benign and malignant human breast tumors. *Int. J. Cancer* 53:269-277.
55. Gumbiner, B.M. 1992. Epithelial morphogenesis [comment]. *Cell* 69:385-7.
56. Gururajan, R., J.Grenet, J.M.Lahti, and V.J.Kidd. 1998. Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the CdC2L locus on human chromosome 1p36.3. *Genomics* 52:101-106.
57. Gutman, A. and B.Wasylyk. 1990. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* 9:2241-2246.
58. Ha, H.Y., H.B.Moon, M.S.Nam, J.W.Lee, Z.Y.Ryoo, T.H.Lee, K.K.Lee, B.J.So, H.Sato, M.Seiki, and D.Y.Yu. 2001. Overexpression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 gene induces mammary gland abnormalities and adenocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res.* 61:984-990.
59. Hansen, R.K. and M.J.Bissell. 2000. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr. Relat Cancer* 7:95-113.
60. Harper E, Bloch KJ, and Gross J. 1971. The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry* 10:3035-3041.

61. Hasty, K.A., T.F.Pourmotabbed, G.I.Goldberg, J.P.Thompson, D.G.Spinella, and et al. 1990. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 265:11421-11424.
62. Hennighausen, L., C.Westphal, L.Sankaran, and C.W.Pittius. 1991. Regulation of expression of genes for milk proteins. *Biotechnology* 16:65-74.
63. Hirai, Y., A.Lochter, S.Galosy, S.Koshida, S.Niwa, and M.J.Bissell. 1998. Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 140:159-69.
64. Hirai, Y., D.Radisky, R.Boudreau, M.Simian, M.E.Stevens, Y.Oka, K.Takebe, S.Niwa, and M.J.Bissell. 2001. Epimorphin mediates mammary luminal morphogenesis through control of C/EBPbeta. *J. Cell Biol.* 153:785-794.
65. Hirai, Y., K.Takebe, M.Takashina, S.Kobayashi, and M.Takeichi. 1992. Epimorphin: a mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. *Cell* 69:471-481.
66. Hirose, M., S.Watanabe, H.Oide, T.Kitamura, A.Miyazaki, and N.Sato. 1996. A new function of Ito cells in liver morphogenesis: evidence using a novel morphogenic protein, epimorphin, in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:155-160.
67. Hocevar, B.A. and P.H.Howe. 2000. Analysis of TGF-beta-mediated synthesis of extracellular matrix components. *Methods Mol. Biol.* 142:55-65.

68. Hoegy, S.E., H.R.Oh, M.L.Corcoran, and W.G.Stetler-Stevenson. 2001. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J. Biol. Chem.* 276:3203-3214.
69. Hogan, B.L. 1999. Morphogenesis. *Cell* 96:225-233.
70. Horster, M.F., G.S.Braun, and S.M.Huber. 1999. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev.* 79:1157-1191.
71. Hotary, K., E.Allen, A.Punturieri, I.Yana, and S.J.Weiss. 2000. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J. Cell Biol.* 149:1309-1323.
72. Imai, Y., W.H.Jr.Busby, C.E.Smith, J.B.Clarke, A.J.Garmong, and et al. 1997. Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells in culture. *J. Clin. Invest.* 100:2596-2605.
73. Infeld, M.D. 1997. Cell-matrix interactions in gland development in the lung. *Exp. Lung Res.* 23:161-169.
74. Itoh, Y., M.Kajita, H.Kinoh, H.Mori, A.Okada, and M.Seiki. 1999. Membrane type 4 matrix met-alloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J. Biol. Chem.* 274:34260-34266.

75. Jackson, D., J.Bresnick, I.Rosewell, T.Crafton, R.Poulsom, G.Stamp, and C.Dickson. 1997. Fibroblast growth factor receptor signalling has a role in lobuloalveolar development of the mammary gland. *J Cell Sci* 110:1261-8.
76. Jhappan, C., A.G.Geiser, E.C.Kordon, D.Bagheri, L.Hennighausen, A.B.Roberts, G.H.Smith, and G.Merlino. 1993. Targeting expression of a transforming growth factor beta 1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *EMBO J.* 12:1835-1845.
77. Jimenez, M.J., M.Balbin, J.M.Lopez, J.Alvarez, T.Komori, and C.Lopez-Otin. 1999. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol. Cell Biol.* 19:4431-4442.
78. Kanwar, Y.S., K.Ota, Q.Yang, J.Wada, N.Kashihara, Y.Tian, and E.I.Wallner. 1999. Role of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT-1-MMP), MMP-2, and its inhibitor in nephrogenesis. *Am. J Physiol* 277:F934-F947.
79. Keely, P.J., J.E.Wu, and S.A.Santoro. 1995. The spatial and temporal expression of the alpha 2 beta 1 integrin and its ligands, collagen I, collagen IV, and laminin, suggest important roles in mouse mammary morphogenesis. *Differentiation* 59:1-13.
80. Kheradmand, F., K.Rishi, and Z.Werb. 2002. Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *J Cell Sci.* 115:839-848.

81. Kheradmand, F., E.Werner, P.Tremble, M.Symons, and Z.Werb. 1998. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280:898-202.
82. Kitsberg, D.I. and P.Leder. 1996. Keratinocyte growth factor induces mammary and prostatic hyperplasia and mammary adenocarcinoma in transgenic mice. *Oncogene* 13:2507-15.
83. Klinowska, T.C., J.V.Soriano, G.M.Edwards, J.M.Oliver, A.J.Valentijn, R.Montesano, and C.H.Streuli. 1999. Laminin and beta1 integrins are crucial for normal mammary gland development in the mouse. *Dev. Biol.* 215:13-32.
84. Knauper, V., A.J.Docherty, B.Smith, J.TschescheH, and G.Murphy. 1997. Analysis of the contribution of the hinge region of human neu-trophil collagenase (HNC, MMP-8) to stability and collagenolytic activity by alanine scanning mutagenesis. *FEBS Lett.* 405:60-64.
85. Kojima, S., Y.Itoh, S.Matsumoto, Y.Masuho, and M.Seiki. 2000. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Lett.* 480:142-146.
86. Koshida, S. and Y.Hirai. 1997. Identification of cellular recognition sequence of epimorphin and critical role of cell/epimorphin interaction in lung branching morphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234:522-525.

87. Koshikawa, N., G.Giannelli, V.Cirulli, K.Miyazaki, and V.Quaranta. 2000. Role of Cell Surface Metalloprotease MT1-MMP in Epithelial Cell Migration over Laminin-5. *J Cell Biol* 148:615-624.
88. Lekstrom-Himes, J. and K.G.Xanthopoulos. 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273:28545-28548.
89. Levi, E., R.Fridman, H.Q.Miao, Y.S.Ma, A.Yayon, and I.Vlodavsky. 1996. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7069-74.
90. Lochter, A., S.Galosy, J.Muschler, N.Freedman, Z.Werb, and M.J.Bissell. 1997a. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* 139:1861-1872.
91. Lochter, A., M.Navre, Z.Werb, and M.J.Bissell. 1999. alpha1 and alpha2 integrins mediate invasive activity of mouse mammary carcinoma cells through regulation of stromelysin-1 expression. *Mol Biol Cell* 10:271-82.
92. Lochter, A., A.Srebrow, C.J.Sympson, N.Terracio, Z.Werb, and M.J.Bissell. 1997b. Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells

- accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties. *J Biol Chem* 272:5007-15.
93. Lohi J, Lehti K, Valtanen H, Parks WC, and Keski-Oja J. 2000. Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1(MT1-MMP) gene. *Gene* 242:75-86.
94. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, and Parks WC. 2001. Epilysin: a novel human matrix met-alloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J. Biol. Chem.* 276:10134-10144.
95. Ludwig, M.G., P.Basset, and P.Anglard. 2000. Multiple regulatory elements in the murine stromelysin-3 promoter. Evidence for direct control by CCAAT/enhancer-binding protein b and thyroid and retinoid receptors. *J. Biol. Chem.* 275:39981-39990.
96. Lukashev, M.E. and Z.Werb. 1998. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 8:437-441.
97. Lund, L.R., J.Romer, N.Thomasset, H.Solberg, C.Pyke, M.J.Bissell, K.Dano, and Z.Werb. 1996. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122:181-93.



98. Lydon, J.P., F.J.DeMayo, C.R.Funk, S.K.Mani, A.R.Hughes, C.A.Montgomery, Jr., G.Shyamala, O.M.Conneely, and B.W.O'Malley. 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266-78.
99. Maquoi, E., F.Frankenne, A.Noel, H.W.Krell, F.Grams, and J.M.Foidart. 2000. Type IV collagen induces matrix metalloproteinase 2 activation in HT1080 fibrosarcoma cells. *Exp. Cell Res.* 261:348-359.
100. Mercurio, A.M., R.E.Bachelder, J.Chung, K.L.O'Connor, I.Rabinovitz, L.M.Shaw, and T.Tani. 2001. Integrin laminin receptors and breast carcinoma progression. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 6:299-309.
101. Min, H., D.M.Danilenko, S.A.Scully, B.Bolon, B.D.Ring, J.E.Tarpley, M.DeRose, and W.S.Simonet. 1998. Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev.* 12:3156-3161.
102. Miyamori, H., T.Takino, M.eiki, and H.ato. 2000. Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:796-800.
103. Mohan, R., W.B.Rinehart, P.Bargagna-Mohan, and M.E.Fini. 1998. Gelatinase B/lacZ transgenic mice, a model for mapping gelatinase B expression during developmental and injury-related tissue remodeling. *J. Biol. Chem.* 273:25903-25914.

104. Montesano, R., K.Matsumoto, T.Nakamura, and L.Orci. 1991. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67:901-8.
105. Munaut, C., T.Salonurmi, S.Kontusaari, P.Reponen, T.Morita, and et al. 1999. Murine matrix metalloproteinase 9 gene. 5' -upstream region contains *cis*-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 274:5588-5596.
106. Murphy, G., Q.Nguyen, M.I.Cockett, S.J.Atkinson, J.A.Allan, and et al. 1994. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelati-nase A by analysis of a deletion mutant. *J. Biol. Chem.* 269:6632-6636.
107. Murphy, G. and F.Willenbrock. 1995. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol.* 248:496-510.
108. Nagase, H., J.J.Engchild, K.Suzuki, and G.Salvesen. 1990. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4- aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry* 29:5783-9.
109. Nagase, H. and J.F.Jr.Woessner. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274:21491-21494.
110. Nandi, S. 1958. Endocrine control of mammary gland development and function in C3H/Crgl mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 21:1039-1063.

111. Narbaitz, R., W.E.Stumpf, and M.Sar. 1980. Estrogen receptors in mammary gland primordia of fetal mouse. *Anat. Embryol. (Berl)* 158:161-166.
112. Nelson, A.R., B.Fingleton, M.L.Rothenberg, and L.M.Matrisian. 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.* 18:1135-1149.
113. Nievers, M.G., R.Q.Schaapveld, and A.Sonnenberg. 1999. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol.* 18:5-17.
114. Noe, V., B.Fingleton, K.Jacobs, H.C.Crawford, S.Vermeulen, and et al. 2001. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J. Cell Sci.* 114:111-118.
115. Oka, Y. and Y.Hirai. 1996. Inductive influences of epimorphin on endothelial cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 222:189-198.
116. Orian-Rousseau, V., D.Aberdam, P.Rousselle, A.Messent, J.Gavrilovic, G.Meneguzzi, M.Kedinger, and P.Simon-Assmann. 1998. Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin alpha2beta1. *J. Cell Sci.* 111 ( Pt 14):1993-2004.

117. Overall, C.M., J.L.Wrana, and J.Sodek. 1991. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor- $\beta$  1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J. Biol. Chem.* 266:14064-14071.
118. Park, H.I., J.Ni, F.E.Gerkema, D.Liu, V.E.Belozerov, and Q.X.Sang. 2000. Identification and characterization of human endometase (matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *J. Biol. Chem.* 275:20540-20544.
119. Pedchenko, V.K. and W.Imagawa. 2000. Pattern of expression of the KGF receptor and its ligands KGF and FGF-10 during postnatal mouse mammary gland development. *Mol. Reprod. Dev.* 56:441-447.
120. Pei, D. and S.J.Weiss. 1995. Furin-dependent intra-cellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375:244-247.
121. Pendas, A.M., M.Balbin, E.Llano, M.G.Jimenez, and C.Lopez-Otin. 1997. Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics* 40:222-233.
122. Pepper, M.S., K.Matsumoto, T.Nakamura, L.Orci, and R.Montesano. 1992. Hepatocyte growth factor increases urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and u-PA receptor expression in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 267:20493-6.

123. Petitclerc, E., S.Stromblad, T.L.von Schalscha, F.Mitjans, J.Piulats, and et al. 1999. Integrin  $\alpha\beta3$  promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* 59:2724-2730.
124. Pierce, D.F., Jr., M.D.Johnson, Y.Matsui, S.D.Robinson, L.I.Gold, A.F.Purchio, C.W.Daniel, B.L.Hogan, and H.L.Moses. 1993. Inhibition of mammary duct development but not alveolar outgrowth during pregnancy in transgenic mice expressing active TGF-beta 1. *Genes Dev* 7:2308-17.
125. Pittius, C.W., L.Sankaran, Y.J.Topper, and L.Hennighausen. 1988. Comparison of the regulation of the whey acidic protein gene with that of a hybrid gene containing the whey acidic protein gene promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 2:1027-32.
126. Pollard, J.W. 2001. Tumour-stromal interactions. Transforming growth factor-beta isoforms and hepatocyte growth factor/scatter factor in mammary gland ductal morphogenesis. *Breast Cancer Res.* 3:230-237.
127. Raza, S.L., L.C.Nehring, S.D.Shapiro, and L.A.Cornelius. 2000. Proteinase-activated receptor-1regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases. *J. Biol. Chem.* 275:41243-41250.
128. Robinson, S.D., G.B.Silberstein, A.B.Roberts, K.C.Flanders, and C.W.Daniel. 1991. Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor-beta isoforms in mouse mammary gland development. *Development* 113:867-78.

129. Robker, R.L., D.L.Russell, L.L.Espey, J.P.Lydon, B.W.O'Malley, and J.S.Richards. 2000. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:4689-4694.
130. Rudolph-Owen, L.A., P.Cannon, and L.M.Matrisian. 1998. Overexpression of the matrix metalloproteinase matrilysin results in premature mammary gland differentiation and male infertility. *Mol. Biol Cell* 9:421-435.
131. Saji, S., E.V.Jensen, S.Nilsson, T.Rylander, M.Warner, and J.A.Gustafsson. 2000. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:337-342.
132. Schroeder, J.A. and D.C.Lee. 1998. Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland. *Cell Growth Differ.* 9:451-464.
133. Seagroves, T.N., S.Krnacik, B.Raught, J.Gay, B.Burgess-Beusse, G.J.Darlington, and J.M.Rosen. 1998. C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev.* 12:1917-1928.
134. Seagroves, T.N., J.P.Lydon, R.C.Hovey, B.K.Vonderhaar, and J.M.Rosen. 2000. C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. *Mol. Endocrinol.* 14:359-368.

135. Sekhri, K.K., D.R.Pitelka, and K.B.DeOme. 1967. Studies of mouse mammary glands. I. Cytomorphology of the normal mammary gland. *J. Natl. Cancer Inst.* 39:459-490.
136. Shipley JM, Doyle GA, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, and et al. 1996. The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. *J. Biol. Chem.* 271:4335-4341.
137. Shrivastava, A., C.Radziejewski, E.Campbell, L.Kovac, M.McGlynn, and et al. 1997. An or-phan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen re-ceptors. *Mol. Cell* 1:25-34.
138. Shyamala, G. 1999. Progesterone signaling and mammary gland morphogenesis. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 4:89-104.
139. Shyamala, G., M.H.Barcellos-Hoff, D.Toft, and X.Yang. 1997. In situ localization of progesterone receptors in normal mouse mammary glands: absence of receptors in the connective and adipose stroma and a heterogeneous distribution in the epithelium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63:251-9.
140. Shyamala, G., Y.C.Chou, S.G.Louie, R.C.Guzman, G.H.Smith, and S.Nandi. 2002. Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: regulation by hormones, development and aging. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80:137-148.

141. Shyamala, G. and M.C.Guiot. 1992. Activation of kappa B-specific proteins by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:10628-10632.
142. Shyamala, G., W.Schneider, and D.Schott. 1990. Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology* 126:2882-2889.
143. Shyamala, G., X.Yang, R.D.Cardiff, and E.Dale. 2000. Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3044-9.
144. Shyamala, G., X.Yang, G.Silberstein, M.H.Barcellos-Hoff, and E.Dale. 1998. Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:696-701.
145. Silberstein, G.B. and C.W.Daniel. 1982. Glycosaminoglycans in the basal lamina and extracellular matrix of the developing mouse mammary duct. *Dev Biol* 90:215-22.
146. Silberstein, G.B., P.Strickland, S.Coleman, and C.W.Daniel. 1990. Epithelium-dependent extracellular matrix synthesis in transforming growth factor-beta 1-growth-inhibited mouse mammary gland. *J Cell Biol* 110:2209-19.



147. Silberstein, G.B., K. Van Horn, G. Shyamala, and C.W. Daniel. 1996. Progesterone receptors in the mouse mammary duct: distribution and developmental regulation. *Cell Growth Differ* 7:945-52.
148. Sottrup-Jensen, L. and H. Birkedal-Hansen. 1989. Human fibroblast collagenase- $\alpha$ -macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian  $\alpha$ -macroglobulins. *J. Biol. Chem.* 264:393-401.
149. Stahl, S., S. Weitzman, and J. Jones. 1997. The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J Cell Sci* 110:55-63.
150. Sternlicht, M.D. and G. Bergers. 2000. Matrix metalloproteinases as emerging targets in anti-cancer therapy: status and prospects. *Emerging Ther. Targets* 4:609-633.
151. Sternlicht, M.D. and Z. Werb. 1999. ECM proteinases. In *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins*, ed. R. Vale and T. Kreis, editors. Oxford Univ. Press, Oxford, UK. 503-562.
152. Sternlicht, M.D. and Z. Werb. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:463-516.
153. Stocker, W., F. Grams, U. Baumann, F.X. Gomis-Ruth, and et al. 1995. The metzincins topological and sequential relations between the astacins, adamalysins,

serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases.

*Protein Sci.* 4:823-840.

154. Streuli, C. 1999. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:634-640.
155. Strongin, A.Y., I.Collier, G.Bannikov, B.L.Marmer, G.A.Grant, and G.I.Goldberg. 1995. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 270:5331-5338.
156. Sympson, C.J., R.S.Talhok, C.M.Alexander, J.R.Chin, S.M.Clift, M.J.Bissell, and Z.Werb. 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 [published erratum appears in *J Cell Biol* 1996 Feb;132(4):following 752]. *J Cell Biol* 125:681-93.
157. Talhok, R.S., M.J.Bissell, and Z.Werb. 1992. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* 118:1271-82.

158. Talhouk, R.S., J.R.Chin, E.N.Unemori, Z.Werb, and M.J.Bissell. 1991. Proteinases of the mammary gland: developmental regulation in vivo and vectorial secretion in culture. *Development* 112:439-49.
159. Tanaka, S.S., Y.Mariko, H.Mori, J.Ishijima, S.Tachi, H.Sato, M.Seiki, K.Yamanouchi, H.Tojo, and C.Tachi. 1997. Cell-cell contact down-regulates expression of membrane type metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in a mouse mammary gland epithelial cell line. *Zoolog Sci* 14:95-9.
160. Thomasset, N., A.Lochter, C.J.Sympson, L.R.Lund, D.R.Williams, O.Behrendtsen, Z.Werb, and M.J.Bissell. 1998. Expression of autoactivated stromelysin-1 in mammary glands of transgenic mice leads to a reactive stroma during early development. *Am J Pathol* 153:457-67.
161. Unemori, E.N. and Z.Werb. 1986. Reorganization of polymerized actin: a possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels. *J Cell Biol* 103:1021-31.
162. Uria, J.A., M.G.Jimenez, M.Balbin, J.M.P.Freije, and C.Lopez-Otin. 1998. Differential effects of transforming growth factor- $\beta$  on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 273:9769-9777.

163. Van Wart, H.E. and H.Birkedal-Hansen. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Care Med.* 150:S165-70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:5578-5582.
164. Vegeto, E., M.M.Shahbaz, D.X.Wen, M.E.Goldman, B.W.O'Malley, and D.P.McDonnell. 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7:1244-1255.
165. Vincenti, M.P. 2001. The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. *In In Matrix Met-alloproteinase Protocols*, ed. IM Clark, editor. 121-148.
166. Vogel, W., GD.Gish, F.Alves, and T.Pawson. 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell* 1:13-26.
167. Watanabe, S., M.Hirose, X.E.Wang, K.Ikejima, H.Oide, T.Kitamura, Y.Takei, A.Miyazaki, and N.Sato. 1998. A novel hepatic stellate (Ito) cell-derived protein, epimorphin, plays a key role in the late stages of liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:486-490.
168. Weaver, V.M., O.W.Petersen, F.Wang, C.A.Larabell, P.Briand, C.Damsky, and M.J.Bissell. 1997. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in

- three- dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 137:231-45.
169. Wen, D.X., Y.F.Xu, D.E.Mais, M.E.Goldman, and D.P.McDonnell. 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell Biol.* 14:8356-8364.
170. Werb, Z., J.Ashkenas, A.MacAuley, and J.F.Wiesen. 1996. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res* 29:1087-97.
171. Wiesen, J.F., P.Young, Z.Werb, and G.R.Cunha. 1999. Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development* 126:335-44.
172. Willenbrock, F. and G.Murphy. 1994. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:S165-170.
173. Windsor, L.J., H.Grenett, B.Birkedal-Hansen, M.K.Bodden, J.A.Engler, and H.Birkedal-Hansen. 1993. Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human ker-atinocytes in response to cytokines and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 268:17341-17347.

174. Witty, J.P., J.H.Wright, and L.M.Matrisian. 1995. Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development. *Mol Biol Cell* 6:1287-303.
175. Woessner, J.F. and H.Nagase. 2000. *Matrix Metallo-proteinases and TIMPs*. New York: Oxford Univ. Press.
176. Xu, Y., S.Gurusiddappa, R.L.Rich, R.T.Owens, D.R.Keene, R.Mayne, A.Hook, and M.Hook. 2000. Multiple binding sites in collagen type I for the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. *J. Biol. Chem.* 275:38981-38989.
177. Yamamoto, H., M.L.Flannery, S.Kupriyanov, J.Pearce, S.R.McKercher, and et al. 1998. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev.* 12:1315-1326.
178. Yang, Y., E.Spitzer, D.Meyer, M.Sachs, C.Niemann, G.Hartmann, K.M.Weidner, C.Birchmeier, and W.Birchmeier. 1995. Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol* 131:215-26.
179. Yant, J., L.Buluwela, B.Niranjan, B.Gusterson, and T.Kamalati. 1998. In vivo effects of hepatocyte growth factor/scatter factor on mouse mammary gland development. *Exp Cell Res* 241:476-81.

180. Yu, Q. and I.Stamenkovic. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14:163-176.
181. Zucker, S., M.Drews, C.Conner, H.D.Foda, Y.A.DeClerck, and et al. 1998. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1(MT1-MMP). *J. Biol. Chem.* 273:1216-1222.