

Tesis Doctoral

Rol de Tristetraprolina (TTP) en la diferenciación y funcionalidad del epitelio mamario

Goddio, María Victoria

2015-02-04

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

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

Cita tipo APA:

Goddio, María Victoria. (2015-02-04). Rol de Tristetraprolina (TTP) en la diferenciación y funcionalidad del epitelio mamario. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Goddio, María Victoria. "Rol de Tristetraprolina (TTP) en la diferenciación y funcionalidad del epitelio mamario". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-02-04.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Rol de Tristetraprolina (TTP) en la diferenciación y funcionalidad del epitelio mamario

Tesis presentada para optar por el Título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

María Victoria Goddio

Director de Tesis: **Dra. Edith Claudia Kordon**

Consejero de estudios: **Dra. Adali Pecci**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Expresión en Mama y Apoptosis. IFIBYNE –
CONICET. Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA.

Buenos Aires, 2014

ROL DE TRISTETRAPROLINA (TTP) EN LA DIFERENCIACIÓN Y FUNCIONALIDAD DEL EPITELIO MAMARIO

El desarrollo de la glándula mamaria es un proceso complejo de múltiples etapas. Del embarazo a la lactancia, el crecimiento lóbulo-alveolar es seguido por la diferenciación completa del epitelio mamario, responsable de la producción y secreción de leche. Al destete se produce un cambio rápido en la señalización de supervivencia a muerte celular que involucra la expresión y actividad de factores pro-inflamatorios.

El control de la vida media del ARNm juega un papel central en el desarrollo normal y la enfermedad: varias condiciones patológicas, como la inflamación y el cáncer, se encuentran fuertemente correlacionadas con la desregulación en la estabilidad del mRNA de genes pro-inflamatorios. Durante la inflamación, TTP (codificada por el gen *Zfp36*) actúa como regulador negativo de la inflamación, desestabilizando ARNm que codifica para citoquinas inflamatorias como TNF α e Interleuquina 6 (Il6). Además, a pesar de que el contexto en el cual la actividad de TTP ha sido más estudiada es en la respuesta inflamatoria, actualmente existen claras evidencias de que esta proteína previene la progresión tumoral inhibiendo la expresión de factores pro-angiogénicos y proteasas de matriz.

Los resultados mostrados en esta Tesis indican que TTP se expresa en la mama normal humana y murina, particularmente en el epitelio diferenciado. También observamos que, al menos en la glándula mamaria de ratón, durante la lactancia se induce la expresión de *Zfp36* a través de la activación de STAT5a. Para demostrar que TTP es relevante en el mantenimiento del amamantamiento utilizamos ratones doble-transgénicos en los cuales la expresión de la recombinasa Cre en la mama luego del parto resulta en la delección de *Zfp36*. Se analizaron muestras de tejidos tomados a diferentes tiempos de lactancia y luego del destete de las crías. El análisis de los mismos muestra en los animales experimentales alteraciones morfológicas de los alvéolos partir de los 10 días de amamantamiento, así como una mayor deposición de colágeno luego del retiro de la crías. Por inmuno-histoquímica, hallamos evidencias del adelantamiento de la involución por la presencia caspasa-3 clivada, así como un aumento en los niveles de STAT3 fosforilado. Finalmente, por *qRT-PCR* cuantitativa detectamos un aumento de expresión de las citoquinas inflamatorias LIF, Il6 y TNF α durante la lactancia. En conjunto, estas observaciones indican que la ausencia de TTP promueve el inicio de la involución mamaria. Por lo tanto la

presencia de esta proteína contribuye significativamente al mantenimiento de la lactancia, previniendo el desarrollo de eventos pro-inflamatorios que desencadenan la involución mamaria. Teniendo en cuenta que el escenario pro-inflamatorio que se genera luego del destete estaría asociada a una ventana de mayor riesgo de desarrollo de cáncer en los años posteriores al parto, la presencia de TTP en la en la glándula normal diferenciada estaría también asociada a su actividad supresora tumoral en este tejido.

Palabras claves: Tristetraprolina, glándula mamaria, lactancia, apoptosis, citoquinas inflamatorias

TRISTETRAPROLINA (TTP) ROLE IN MAMMARY GLAND EPITHELIUM DIFFERENTIATION AND FUNCTION

Mammary gland development is a complex, multistep process. From pregnancy to lactation, lobulo-alveolar growth is followed by the complete differentiation of mammary epithelium, which allows the production and secretion of milk proteins. At weaning, a rapid switch from survival to death signaling occurs, leading to involution, which involves extensive remodeling and an innate immune response in the tissue.

Messenger RNA (mRNA) decay is a critical mechanism to control the expression of many genes in normal development, inflammation and cancer. TTP (coded by the *Zfp36* gene) is a RNA-binding protein that destabilizes several pro-inflammatory cytokine mRNAs as TNF α and Interleukin 6 (Il6). Although the context in which the activity of TTP has been most studied is in the inflammatory response, there are now strong evidence that this protein also prevents tumor progression by inhibiting the expression of pro-angiogenic factors and matrix proteases.

The results presents in this Thesis indicate that TTP is expressed in the normal mammary gland from human and mouse. Particularly, TTP is highly expressed in the normal mammary epithelium during lactation. We also observed that, at least in the mouse gland, lactogenesis enhances TTP expression, probably through STAT5a activation. In addition, to determine whether TTP plays a relevant role during lactation, WAP-Cre recombinase transgenic mice, in which the enzyme is expressed uniquely in the lactating mammary tissue, were crossed with lox-P TTP transgenic animals. Then, we analyzed the mammary tissue at different times after parturition and after separating the pups from their mothers (forced involution). We found morphological alteration of the alveoli in lactating bi-transgenic animals, as well as increased collagen deposition after the retirement of offspring, suggesting that TTP is contributing to maintenance of lactation. In addition, immuno-histochemical analysis revealed initiation of early involution, detected by clived caspase-3 and increased levels of phosphorylated STAT3 one week before weaning. Then, we also found, by quantitative RT-PCR, higher expression of inflammatory cytokines, as LIF, Il6 and TNF α . These observations indicate that TTP significantly contributes to lactation maintenance in the normal mammary gland, preventing the development of pro-inflammatory events that trigger breast involution. Since the pro-inflammatory scenario in which mammary involution occurs has been associated to a window of

increased risk for breast cancer development, TTP expression during breastfeeding would also play a relevant role in breast cancer suppression.

Keywords: Tristetraprolin, mammary gland, lactation, apoptosis, inflammatory cytokines.

A mis padres,
hermanos
y a Leo

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años son muchas las personas que han participado de alguna manera u otra en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada.

A Edith. Muchas gracias por la libertad que me diste, por los infinitos aportes intelectuales, por enseñarme que una Tesis es producto de mucho más que el trabajo individual.

A nuestros colaboradores, en especial al Dr. Martín Abba, por su invaluable aporte bioinformático y su tímida calidez. Al Dr. Meiss, por enseñarnos tanto. A Albi (Dra Gatelli), por su generosidad a pesar de las distancias. A los Dr. Curino y Dra. Fracchinetti, por su ayuda desinteresada.

Quiero agradecer la generosidad de los laboratorios vecinos, por tantos equipos y reactivos prestados, por el apoyo y consejos recibidos durante estos años. Gracias al grupo de la Dra. Vasquez, a las Dras. Correa y Bermudez, al Dr. Coluccio, a la Dra Alejandra Castro. Gracias a Adri y sus *Adrianos* (Pao, Flor y Cris). Gracias a los chicos ex*Jares* (Jime, Lu, Ampí y Tincho). En especial muchas gracias a Omar y a sus chicos, por su buena predisposición y generosidad! Gracias Omar por tantas enseñanzas y tus particulares chistes.

A Mariela, Lirane y Alejandra Giacolo, muchísimas gracias! Muchas de las cosas salieron porque ustedes estuvieron a mi lado y me ayudaron! A José, las secretarias del IFIBYNE, los secretarios de QB (Ayelen y Martín), gracias por hacernos las cosas más fáciles!

A las chicas Kordon (K) (Carlita, Lourdes, Johi, Nadi, Caro y Naty y Marquitos), gracias por tanta generosidad, por tanta paciencia, por enseñarme y por reírse conmigo (o de mí?). Gracias a Eva Cerveza por tus valiosos aportes y filosas discusiones en las reuniones de laboratorio!

A los chicos de Pecci (P) (Diego P, Ajo, Flopy, Meli, Diego G, Martincito, Danielita, Virginita, S.A.T., Santi, Lautaro, Chocha ¿cuántos son?!). Por la convivencia día a día, gracias por las risas, las enseñanzas, las ironías. Y a Ada, obvio, por el caos, la buena predisposición, la ayuda desinteresada, gracias Sarah!

Al LEGMA (PK) por los almuerzos catárticos, los mates y cafes despaviladores, por los sabrosos viernes gordos, las discusiones interminables, los divertidos congresos, las obsesiones. Gracias por hacer que todo sea más fácil y difícil al mismo tiempo.

A la comisión de Tecitos. Gracias Marquitos, por los abrazos. A Virginita, por ser como sos, no cambies nunca, y también por tanto apoyo y empuje.

En lo personal quisiera agradecer a Johi, amiga, gracias por tantos momentos vividos, gracias por la ayuda, por ser tan obsesivamente incisiva (tenedor). A mis amigas Pao, Ani y Sol, por tantos

momentos lindos y por hacer las cosas mas fáciles. Gracias a Vivi y Naty Espondilus, son ejemplos de lucha, gracias por cuidarme. Gracias a aquellos que después de un duro día de trabajo estaban dispuestos a divertirse, o a ir a BB (CTGLN).

Muchas gracias a mi familia, por tener tanta confianza en mí. Por su incondicional e infinito apoyo, por dejarme volar.

Y finalmente gracias a Leo. Por tu brillantez, por acompañarme, aceptarme. Por enseñarme a enfrentar los obstáculos de otra manera, trato de aprender. Por nuestra historia.

Muchas gracias a todos.

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
<i>Desarrollo de la Glándula Mamaria</i>	5
<i>Lactancia</i>	6
<i>Involución</i>	8
<i>Tumores mamarios</i>	9
<i>Regulación post-transcripcional de genes</i>	10
<i>Elementos ricos en adenina y uracilo (AU-rich elements, AREs)</i>	11
<i>Tristetraprolina</i>	11
<i>Mecanismo general de degradación de transcritos</i>	14
<i>TTP e inflamación</i>	14
<i>TTP y cáncer</i>	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	21
<i>Reactivos utilizados</i>	23
<i>Cultivo de líneas celulares</i>	23
<i>Cultivo de la línea celular de mamas humanas y de ratón</i>	23
<i>Línea celular HC11</i>	24
<i>Trabajo con animales</i>	25
<i>Ratones C57BL/6</i>	25
<i>Ratones ^{Cre}/LoxP</i>	25
<i>Generación de ratones TTP-KO condicional en glándula mamaria</i>	26
<i>Extracción de tejido mamario</i>	28
<i>Cirugía – Transplante de Tejido Mamario</i>	29
<i>Ensayos bioquímicos y moleculares</i>	29
<i>Análisis de Proteínas</i>	29
<i>PCR cuantitativa</i>	31

<i>Preparación de plásmidos y transfecciones</i>	34
<i>Estudios morfológicos e histológicos</i>	37
<i>Montaje completo de glándula mamaria - Whole mount</i>	37
<i>Inmunohistoquímica (IHQ)</i>	37
<i>Análisis bioinformáticos</i>	38
RESULTADOS.....	39
<i>Análisis de la expresión de TTP en tejido mamario normal y muestras tumorales</i>	41
<i>Análisis de la expresión de TTP en tejido mamario humano</i>	41
<i>Análisis de la expresión de TTP en tejido mamario normal y tumoral de ratón</i>	46
<i>Regulación de la expresión de TTP en un modelo de diferenciación mamaria de ratón</i>	46
<i>Regulación de la expresión de TTP en células tumorales epiteliales humanas</i>	47
<i>Análisis de la función de ttp durante el desarrollo normal de la glándula mamaria murina.</i>	48
<i>Rol fisiológico de TTP en hembras vírgenes</i>	48
<i>Análisis de la función de TTP en glándula mamaria murina durante la lactancia e involución de la glándula.</i>	52
<i>Efecto de la ausencia de TTP en la involución de la glándula mamaria post-destete</i>	54
<i>Efecto de la ausencia de TTP en la glándula mamaria durante la lactancia....</i>	60
DISCUSIÓN	69
<i>Análisis de la expresión de TTP en tumores de mama</i>	71
<i>Análisis de la expresión de TTP en la glándula mamaria normal murina</i>	73
<i>Efecto de la delección de TTP durante el desarrollo puberal de la glándula mamaria (formación de red de conductos)</i>	73
<i>Regulación de la transcripción de TTP en la diferenciación mamaria</i>	75
<i>Efecto de la delección de TTP durante la lactancia. Ratones TTP-KO</i>	

<i>condicionales</i>	76
<i>Efecto de la delección de TTP durante la lactancia en la involución forzada de la glándula mamaria</i>	77
<i>Efecto de la delección de TTP en la glándula mamaria durante la lactancia</i>	80
<i>Relevancia de los resultados obtenidos en el ratón TTP-KO condicional para el desarrollo del cáncer de mama</i>	82
<i>CONCLUSIONES</i>	85
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	89

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ARE	<i>AU-rich elements</i> – Elementos ricos en adenosina y uracilo
ARNm-ARE	ARNm que contienen <i>AREs</i>
AUBPs	<i>AU-Rich elements binding proteins</i> – Proteínas de unión a secuencias AREs
AUF1	Proteína de unión a elementos ricos en AU 1
BSA	Albúmina sérica bovina
<i>cDNA</i>	ADN copia
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DAB	Diaminobencida
Dex:	Dexametasona
ER	Receptor de Estrógeno
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i> – Quinasa regulada por señales extracelulares
FISH	Hibridación Fluorescente <i>in situ</i>
GAS	<i>γ-interferon activation sites</i>
GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elementos respondedores a glucocorticoides
HDTs	Tumores hormono-dependientes
HER	Receptor de Estrógeno Humano
HITs	Tumores hormono-independientes
HRE	Elemento de respuesta a hormonas
HuR	Hu antígeno R
IL	Interleuquina
IHQ	Inmuno Histoquímica
<i>JAK2</i>	<i>Janus Kinase 2</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LIF	Factor inhibidor de leucemias
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> – Quinasa activada por mitógenos
MAPK1	Quinasa activada por mitógenos p38
MMTV	Virus tumoral mamario de ratón
NF-κB	<i>Tissue specific transcription factor</i>
NIH	<i>National Health Institute</i> - Institutos de Salud de los Estados Unidos
PABP	Proteína de unión a poli-A
pb	pares de bases
Poli-A	Poliadenosina
pSTAT	<i>phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription</i>

PR	Receptor de Progesterona
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina
RT- <i>q</i> PCR	PCR cuantitativa en tiempo real – <i>Real Time PCR</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TEBs	<i>Terminal end buds</i> – Brotes terminal de conductos
TN	Tumores Triple Negativo
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TTP	Tristetraprolina
UTR	<i>Untranslated region</i> – regiones no codificantes de ARNm
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WAP	<i>Whey acidic protein</i>
Zfp36:	gen de <i>Zinc finger protein 36</i> (TTP)

INTRODUCCIÓN

Desarrollo de la Glándula mamaria

La glándula mamaria es un órgano secretorio complejo cuyo desarrollo morfológico y funcional se produce principalmente luego del nacimiento y en estadios bien definidos. Durante la vida de las hembras de los mamíferos, el epitelio de la glándula atraviesa ciclos periódicos de crecimiento y desarrollo, diferenciación y apoptosis, los cuales corresponden a los estadios fisiológicos de embarazo, lactancia e involución (Hennighausen and Robinson, 1998). Este ciclo de proliferación, diferenciación y muerte se repite cíclicamente con cada preñez, y con mucha menor intensidad durante cada ciclo estral que atraviese la hembra (Masso-Welch et al., 2000; Richert et al., 2000). Los distintos estadios de la glándula requieren de la acción coordinada de hormonas sistémicas y factores de crecimiento y diferenciación locales que actúan tanto en los componentes del estroma como del parénquima epitelial de la glándula mamaria.

Al momento del nacimiento, los ratones poseen un sistema rudimentario de pequeños conductos que se ramifican desde el pezón hacia el interior de las almohadillas de grasa subcutánea (*fat pads*) (Hogg et al., 1983). En las hembras, estas estructuras permanecen quiescentes hasta la llegada de la pubertad, que ocurre aproximadamente a las 3 semanas de vida. A partir de ese momento, las hormonas ováricas circulantes inducen una intensa actividad mitótica que ocurre en la región de los brotes terminales de los conductos o TEBs (*terminal end buds*) (Bresciani, 1965). La división celular continúa hasta que los conductos alcanzan los límites de la almohadilla de grasa subcutánea, formando una estructura de tipo árbol ramificado. En ese momento, aproximadamente a las 12 semanas de vida, los conductos quedan en estado de quiescencia hasta que la hembra eventualmente es preñada (Faulkin and Deome, 1960) (Figura I1).

Durante la preñez, comienza un nuevo ciclo de rápida proliferación, esta vez seguido de diferenciación, estableciéndose las estructuras lóbulo-alveolares sobre la estructura ya establecida de conductos ramificados. Niveles elevados de estrógeno y progesterona, así como hormonas pituitarias, participan en este proceso (Silberstein and Daniel, 1987). Durante la etapa temprana de la preñez, las células epiteliales proliferan, los conductos se elongan, se ramifican y se establecen las estructuras lóbulo-alveolares. La diferenciación de los alvéolos ocurre mayormente durante la segunda mitad de la preñez. Éstos poseen dos capas de células: las luminales, secretoras, y las basales mioepiteliales, que forman los elementos contráctiles de los alvéolos para la expulsión de la leche. Al término de la preñez, que en el ratón dura aproximadamente 20 días, las estructuras alveolares han finalizado su crecimiento reemplazando por completo el tejido estromal de la mama. Estas estructuras persisten hasta el final de la lactancia y son las unidades funcionales para la producción y secreción de la leche.

Hacia el final de la preñez y luego del parto, se produce una caída abrupta de los niveles circulantes de estrógeno y progesterona sistémicos. A partir de este momento la arquitectura funcional de la glándula se mantiene principalmente gracias a la prolactina, liberada desde la glándula pituitaria en respuesta al estímulo de succión de las crías, y a la colaboración de los glucocorticoides (Reichardt et al., 2001; Topper and Freeman, 1980). El período de lactancia es el estadio de máxima diferenciación de la glándula mamaria y, en el ratón, perdura por 3 semanas, cuando se produce la involución por la falta prolongada de succión debido a que las crías ya ingieren alimento sólido (Masso-Welch et al., 2000) (Figura I 1).

La involución mamaria es un proceso coordinado de muerte celular programada y reestructuración de la glándula. Durante el mismo, el 90% del epitelio muere por apoptosis y el estroma reemplaza a este tejido. Este proceso es desencadenado rápidamente en respuesta a la remoción del estímulo de succión, generándose un estado morfológico similar al previo al embarazo. La involución mamaria puede dividirse en dos fases. La fase inicial está caracterizada por la muerte celular programada de las células epiteliales diferenciadas y la inducción de la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis (Li et al., 1997; Lund et al., 1996). Esta fase es seguida de una segunda etapa en la que a la muerte del epitelio se le agrega la expresión temporal de proteasas extracelulares que participan en el remodelado tisular (Lund et al., 1996).

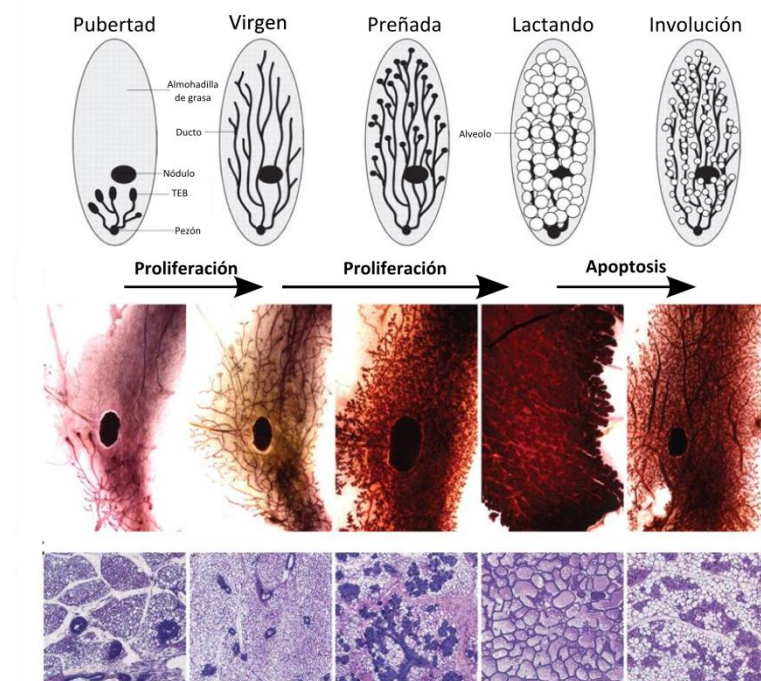


Figura I 1: Adaptado de (Andrechek et al., 2008). Ilustración esquemática del desarrollo de la glándula mamaria de ratón. Cada estadio del esquema está acompañado de preparaciones de glándula mamaria total y cortes histológicos.

Lactancia

La señalización por prolactina (PRL) es esencial para la proliferación y la diferenciación de las estructuras lóbulo-alveolares de la glándula mamaria durante la preñez (Topper and Freeman, 1980). Dicha hormona es sintetizada predominantemente en células de la glándula pituitaria de vertebrados. La interacción de este ligando con su receptor (PRLR) lleva a la dimerización del mismo y a la activación de Janus *kinase* 2 (JAK2), Fyn y *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Darnell et al., 1994). Particularmente en la glándula mamaria, la PRL opera mayormente a través de la vía de transducción de señales mediada por JAK- *Signal Transducer and Activator of Transcription* 5 (STAT5) (Liu et al., 1997). Esta vía consiste en el reclutamiento de la quinasa hacia el PRLR, y a través de los dominios SH2 expuestos del complejo, se reclutan los factores STAT5 que se encuentran libres en el citoplasma. JAK2 fosforila predominantemente a las 2 isoformas de STAT5 (5a y 5b) en la tirosina 694 (Ihle and Kerr, 1995). Los factores STAT5 así activados, translocan en forma de dímeros hacia el núcleo donde se unen a sitios γ -*interferon activation sites* (GAS) de promotores de distintos genes, por ejemplo, β -caseína, *whey acidic protein* (WAP) y β -lactoglobulinas, induciendo la transcripción de los mismos.

En mamas de hembras vírgenes o durante la etapa temprana de la preñez, los niveles de activación de STAT5a y STAT5b se encuentran muy bajos. Existe un pico de activación de dichos factores durante la lactancia, observándose altos niveles de las formas fosforiladas, las cuales se hacen prácticamente indetectables al comenzar la involución mamaria (Liu et al., 1997). Estas moléculas pueden formar homo o heterodímeros, siendo necesaria la heterodimerización para alcanzar un estado de completa diferenciación que permite una lactancia normal (Liu et al., 1997).

Las proteínas STAT5a y STAT5b poseen un 96% de similitud de secuencia y exhiben patrones de expresión solapados durante el desarrollo de la glándula mamaria (Liu et al., 1997). El fenotipo más llamativo del *knock out* (KO) de STAT5a es su incapacidad de amamantar, debido a la falla en el desarrollo de la glándula durante la preñez. En estos ratones también se observan niveles proteicos reducidos de STAT5b y una bajada en su fosforilación, indicando que para que dicha modificación post-traducciona sea eficiente es necesaria la presencia de STAT5a (Liu et al., 1997). El KO de STAT5b exhibe un fenotipo diferente, afectando la expresión de genes en el hígado, la tasa de crecimiento corporal y la fertilidad (Udy et al., 1997). Sin embargo, aquellos ratones que mantienen la preñez, son capaces de amamantar a sus crías. Esto demuestra que aunque las características bioquímicas de STAT5a y STAT5b son prácticamente indistinguibles, las dos proteínas tienen distintas funciones *in vivo*.

Involución

Al producirse el destete, se inicia el proceso de involución mamaria que, como se mencionó previamente, comprende la muerte del epitelio secretorio y el remodelado de la glándula. La muerte del epitelio secretorio se da a través de un tipo de muerte celular programada conocido como apoptosis, que se caracteriza por no producir respuesta inflamatoria (Earnshaw, 1999).

Al iniciarse la involución, se produce un cambio en la activación de cascadas de señales específicas y la regulación de la expresión de genes que inducen la apoptosis del epitelio secretorio. Este tipo de muerte celular, involucra la activación de una cascada de proteasas específicas, denominadas caspasas, que pertenecen a una familia altamente conservada de cisteína-proteasas. Las primeras caspasas que se activan se conocen como caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10), y aquellas que llevan a cabo el proceso apoptótico se denominan caspasas efectoras (3, 6 y 7). Una vez activadas las caspasas efectoras, el proceso de muerte se vuelve irreversible. A su vez, estas cascadas de caspasas pueden activarse, al menos, a través de dos vías: la vía intrínseca, o vía mitocondrial, o a través de la vía extrínseca, o de receptores de muerte (Gewies, 2003).

En particular, la muerte apoptótica del epitelio secretorio durante la involución, se produce, principalmente por la vía mitocondrial (Marti et al., 2001) aunque, durante las primeras 12 horas de involución, también se produce la activación de la vía extrínseca como consecuencia del significativo aumento de los ligandos de receptores de muerte TNF α , TWEAK, FasL y TRAIL durante este período (Clarkson et al., 2004).

La vía JAK/STAT es el mecanismo principal de señalización que utilizan diversas citoquinas y factores de crecimiento en la regulación de la proliferación, el estado de diferenciación, la migración celular y la muerte en múltiples procesos como la hematopoyesis, el desarrollo del sistema inmune y la adipogénesis (Rawlings et al., 2004). En particular, en el epitelio mamario, es una de las vías críticas en determinar el estado de diferenciación, la supervivencia y la muerte por apoptosis. El inicio de la involución mamaria se caracteriza por un cambio en el patrón de fosforilación de miembros específicos de la familia STAT: una disminución en los niveles de pSTAT5a, pSTAT5b y sus formas sin fosforilar, y un marcado aumento de pSTAT3 (Li et al., 1997; Liu et al., 1997).

STAT3 – El mediador esencial de la involución mamaria

Inicialmente, el marcado aumento de los niveles de fosforilación de STAT3 en la involución mamaria reveló su potencial rol durante este estadio. Debido a que la inactivación de STAT3 es letal para el embrión (Takeda et al., 1997), fue en estudios de delección condicional de

STAT3, a través de la expresión específica de la recombinasa Cre en el epitelio mamario durante la lactancia (Selbert et al., 1998), que se demostró que STAT3 es esencial para el inicio de la apoptosis y el remodelado de la mama durante la involución (Chapman et al., 1999). Estos resultados fueron posteriormente confirmados por otro grupo de trabajo independiente, en ratones *KO* para STAT3 (STAT3-*KO*) (Humphreys et al., 2002). En ambos estudios, la ausencia de STAT3 retrasó la fase de la involución por varios días, demostrando la importancia de la activación de este factor de transcripción en la inducción de la involución mamaria. Con el objetivo de identificar qué factores eran relevantes en la activación de la vía JAK/STAT3 durante la involución mamaria, Hennighausen y su grupo analizaron el desarrollo de las glándulas mamarias de ratones *KO* para Il6. Esta última pertenece a la familia de citoquinas de Il6 junto a LIF, OSM, Il11, CT-1 y CNTF-1. Il6 se une a su receptor Il6R α (gp80), recluta e induce la homodimerización de dos subunidades transductoras de la señal (gp130) promoviendo la activación de la vía JAK/STAT3. Hennighausen y sus colaboradores, habían encontrado que tanto Il6 como su receptor aumentaban su expresión durante la involución mamaria en los ratones *wild type*. Al momento de analizar las mamas de los ratones Il6-*KO*, observaron un retraso limitado en la involución mamaria, que se caracterizaba por un pequeño retardo en la aparición de células apoptóticas en comparación con las mamas *wild type*. Llamativamente, los niveles de pSTAT3 resultaron similares a los de los ratones control (Zhao et al., 2002) indicando que Il6 no tendría un rol principal en la activación de la vía JAK/STAT3 durante la involución mamaria.

LIF es el activador de STAT3 en el epitelio mamario

El LIF es una glicoproteína de secreción de 38 a 67 kDa que pertenece a la familia de citoquinas de la familia de Il6 y su nombre deriva del efecto que se observó que tiene en la diferenciación de células leucémicas mieloides a macrófagos (Gearing et al., 1987).

Es interesante que, más allá de la redundancia funcional que existe entre los integrantes de la familia de Il6 en varios tejidos, trabajos de nuestro grupo del equipo así como también de Christine Watson identificaron al LIF como responsable fisiológico de la activación de la vía JAK/STAT3 en el epitelio mamario al inicio de la involución mamaria post-lactancia (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003). En el primero de los trabajos, demostramos que LIF y su receptor (LIFR) se expresan durante los diferentes estadios del desarrollo mamario. Encontramos que los niveles de expresión de LIF son altos durante el desarrollo temprano y la preñez, disminuyen hasta niveles indetectables durante la lactancia y aumentan significativamente al inicio de la involución mamaria, alcanzando un pico a las 48 horas luego del destete, sin observar modulación de los niveles de la subunidad específica de su receptor (gp190) Además, reportamos la capacidad de LIF para activar STAT3 en un estudio donde se observó que el implante de pellets de LIF indujo la fosforilación de STAT3 y la apoptosis del epitelio en mamas

lactantes (Schere-Levy et al., 2003). Este trabajo aportó más evidencias de que la muerte del epitelio secretorio no depende de los niveles de hormonas lactogénicas circulantes. En paralelo, el grupo de C. Watson observó que en las glándulas mamarias de ratones LIF-KO, la involución sufría un retraso importante, con niveles de fosforilación de STAT3 indetectables y la muerte por apoptosis marcadamente disminuida (Kritikou et al., 2003).

Tumores mamarios

En el mundo entero, el cáncer de mama es diagnosticado en más de un millón de mujeres cada año (Jemal et al., 2009). Aunque las mayores incidencias fueron halladas en América del Norte y Europa, tanto la Argentina como Uruguay muestran índices de mortalidad muy altos, similares a esas regiones del hemisferio norte (Parkin, 2004).

Entre los años 2002 y 2007, el incremento del número de casos nuevos de cáncer de mama en los países en desarrollo fue dos veces mayor que el observado en los países desarrollados. En Argentina se encuentran 75 casos cada 100.000 mujeres, una incidencia similar a la que tiene Uruguay y a las observadas en los Estados Unidos de América y Canadá (Lozano-Ascencio et al., 2009). A pesar de que la mortalidad por cáncer de mama en nuestro país ha tendido a disminuir levemente entre 1979 y el 2005, es la primera causa de muerte por cáncer dentro de la población femenina argentina y la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares en la población general (Lozano-Ascencio et al., 2009). Si consideramos a las mujeres entre 35 y 54 años este tipo de cáncer es la primera causa de muerte de esta población (Matos et al., 1994).

El cáncer de mama comprende tumores heterogéneos con diferentes características clínicas, desarrollo de la enfermedad y respuestas a tratamientos específicos. Características intrínsecas de los tumores, como las obtenidas por histología clásica y las clasificaciones inmunopatológicas, así como también subtipos moleculares más recientemente descritos, han permitido la clasificación y separación de los tumores de mama en varios grupos. Las características extrínsecas del tumor, como el microambiente tumoral, también tienen importancia pronóstica y amplían aún más la lista de variables relevantes.

El tipo más común de cáncer de mama observado, y reportado, es el carcinoma ductal invasivo no especificado (aproximadamente el 75% de los casos), mientras que el carcinoma lobular invasivo representa el siguiente tipo histológico más frecuente (aproximadamente 10% de los casos) (Li et al., 2005). En conjunto, estas dos categorías y combinaciones de los mismos constituyen la gran mayoría (alrededor del 90%) de los cánceres de mama, mientras que el resto se clasifican como medular, neuroendocrino, tubular, apocrino, metaplásico, mucinoso (A y B), inflamatorio, comedones, adenoides quístico, y los tipos micropapilares (Li et al., 2005; Weigelt et al., 2010).

La presencia de marcadores específicos en cáncer de mama ha sido ampliamente utilizada tanto para definir subtipos con pronóstico global diferencial como para identificar tumores susceptibles a tratamientos dirigidos. Los principales marcadores que se evalúan en la actualidad son: el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR), y el receptor epidérmico humano 2 (HER2). La detección de los dos primeros marcadores se realiza casi exclusivamente por inmunohistoquímica (IHQ), mientras que la detección de HER2 se realiza por IHQ e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Las combinaciones de estos marcadores permiten la asignación de casos individuales a categorías específicas, a saber, ER⁺ (ER⁺/HER2⁻), HER2⁺ (ER⁻/HER2⁺), triple negativo (TN; ER⁻/PR⁻/HER2⁻), y triple positivo (ER⁺/PR⁺/HER2⁺). Desde un punto de vista pronóstico, los tumores ER⁺ exhiben el mejor resultado global. Tras el advenimiento de nuevas terapias, los tumores HER2⁺, que previamente eran asociados con un mal pronóstico, ahora exhiben un resultado global mejorado (Slamon et al., 2001; Smith et al., 2007). Tumores TN, por otro lado, están vinculados al peor pronóstico entre los subtipos (Nishimura and Arima, 2008), mientras que en los casos de triple positivos el pronóstico depende del grado histológico del tumor (Parise et al., 2010; Parise and Caggiano, 2014).

Regulación post-transcripcional de genes

En las células eucariotas, la expresión de genes se encuentra estrechamente regulada a través de múltiples mecanismos de control. Estos sistemas de regulación son fundamentales para garantizar que los productos codificados por el genoma, ARN y proteínas, se encuentren dentro de los niveles apropiados para el crecimiento, el mantenimiento, la función y la muerte celular. Un determinante importante que rige las tasas de síntesis de proteínas es la concentración citoplasmática de sus ARNm correspondientes, que depende tanto de su tasa de síntesis como de degradación. La cinética de los procesos de transcripción, procesamiento y transporte del núcleo al citoplasma del pre-ARNm es acumulativamente responsable de las tasas de síntesis del ARNm, estando sujetos, cada uno de ellos, a una regulación independiente. La tasa de degradación citoplasmática de cada ARNm también es estrechamente regulada, permitiendo a la célula controlar rápidamente los niveles de estas moléculas y, potencialmente, la traducción. La cinética de decaimiento del ARNm requiere de una regulación estricta, permitiendo disminuir el tiempo de respuesta de la célula entre un estímulo determinado y sus consecuencias fenotípicas, evitando la necesidad de involucrar la transcripción y la modulación de la actividad transcripcional total (Guhaniyogi and Brewer, 2001; Hargrove and Schmidt, 1989).

Elementos ricos en adenina y uracilo (AU-rich elements, AREs)

Los elementos denominados AREs, son secuencias con un alto contenido de adenina y uracilo y se encuentran en algunos ARNm. Estas secuencias son elementos *in cis* que influyen en la estabilidad del ARNm a través de interacciones con proteínas que, dependiendo del contexto

celular, promueven la estabilización o degradación de los transcriptos (Chen and Shyu, 1995; Wilson and Brewer, 1999). La actividad de desestabilización del ARNm por parte de los *AREs* es esencial para limitar la producción celular de muchos productos génicos clínicamente importantes, incluyendo muchos oncogenes, citoquinas y factores inflamatorios.

En mamíferos, los *AREs* constituyen una familia de diversas secuencias de ARN localizados en las regiones 3' no traducibles (3'*UTRs*) del 8-10% de todos los ARNm. Dependiendo del contexto celular, poseen la capacidad de desencadenar la degradación de los transcriptos donde se encuentran por un mecanismo dependiente de la deadenilación (acortamiento de la cola de poli-A) de los mensajeros (Chen and Shyu, 1995; Wilson and Brewer, 1999). La fase de deadenilación parece ser la etapa limitante en este proceso, y la presencia de secuencias *AREs* acelera la velocidad de degradación de los ARNm al incrementar la tasa de deadenilación (Brewer, 1998; Chen and Shyu, 1995).

Las secuencias *AREs* de un determinado ARNm se encuentra frecuentemente conservado; sin embargo, hay una amplia diversidad de secuencias *AREs* entre distintos transcriptos. En general, un *ARE* consta de una región de 40 a 150 de nucleótidos ricos en uracilo y adenina que contiene una o más repeticiones del pentámero AUUUA. Es importante aclarar que no fue definida aún una secuencia consenso para las secuencias *AREs*, aunque, es interesante destacar que la mayoría de los transcriptos que codifican para mediadores inflamatorios y citoquinas, tales como IL-3 y TNF α , mayormente comparten las secuencias *AREs* entre sí (Barreau et al., 2005; Stoecklin et al., 1994; Xu et al., 1997).

Un número de proteínas de distintas familias, llamadas colectivamente proteínas de unión a elementos ricos en AU (*AUBPs*) han sido identificadas, pero se han establecido roles funcionales para sólo algunas de ellas (Brennan and Steitz, 2001). Algunas de estas proteínas incrementan la estabilidad de los transcriptos, como el antígeno (Hu) R (HuR); otras se relacionan con desestabilización, como la tristetraprolina (TTP), y algunas otras parecen tener funciones opuestas según el entorno celular, como el factor 1 de unión a elementos ricos en AU (AUF1). La mayoría de las *AUBPs* se expresan de forma ubicua, pero algunas tienen un patrón de expresión tejido-específico (Lu and Schneider, 2004). De hecho, existen reportes que indican que la expresión de algunas *AUBPs* y su localización subcelular están reguladas por las hormonas esteroideas y lactogénicas (Arao et al., 2002; Arao et al., 2004; Cuadrado et al., 2003).

Tristetraprolina

La Tristetraprolina (TTP), también conocida como Nup475, G0S24 y TIS11, es codificada por el gen Zfp36 y pertenece a una familia de proteínas con dedos de zinc que reconoce y se une a elementos *ARE* de la región 3'-*UTR* de algunos ARNs mensajeros y

promueve la degradación de los mismos (Deleault et al., 2008; Lai et al., 2003). TTP es el miembro prototípico de esta familia; su secuencia de aminoácidos es abundante en residuos de prolina (16%) y serina (17,5%), y contiene tres motivos ricos en prolina, cada uno representado como PPPP (Halees et al., 2008). Otra característica de esta proteína es la presencia de dos dominios de dedos de zinc en tándem de la secuencia conservada CX8CX5CX3H (Bakheet et al., 2006; Taylor et al., 1991; Worthington et al., 2002).

Ensayos de geles de retardo y precipitación de ARNm revelaron que TTP se une con alta afinidad a las secuencias *ARE* presentes en el 3'-UTR del transcripto de TNF α , mediando su desestabilización. Por otro lado, la importante actividad inhibitoria de TTP sobre la expresión de esta citoquina se hizo evidente en el ratón *KO* de TTP, el cual mostró acumulación de TNF α en médula ósea y a nivel sistémico debido a la prolongada vida media del transcripto (Carballo et al., 1997; Carballo et al., 1998; Taylor et al., 1996). Posteriormente, se han realizado mutaciones específicas en la secuencia codificante de TTP que impiden la unión de esta proteína a los *AREs*, inhibiéndola degradación de sus transcriptos blanco (Lai and Blackshear, 2001; Lai et al., 2002). Este tipo de abordaje experimental permitió demostrar que se requiere la unión de dos moléculas de TTP para lograr una tasa máxima de deadenilación y degradación de ciertos blancos, como el GM-CSF (*monocyte-colony stimulating factor*). Por otro lado, se observó que son necesarios dos dominios de dedos de zinc de TTP para que éste pueda desencadenar el acortamiento de la cola poly -A en los ARNm blancos (Lai et al., 1999; Lai et al., 2003).

Mecanismo general de degradación de transcriptos

Los ARNm pueden ser degradados de varias maneras por diferentes nucleasas. La mayoría de los mecanismos responsables de la degradación de los mensajeros fueron descubiertos en levaduras; sin embargo, procesos y enzimas similares se han identificado en células de mamíferos (van Hoof and Parker, 2002). Los ARNm se encuentran normalmente protegidos de las exonucleasas en el extremo 5' por una estructura de *cap*, la cual consiste de un nucleótido de guanina metilado en la posición N-7 (m7G) unido covalentemente al nucleótido terminal del ARN (Shatkin, 1976). En el extremo 3', el transcripto se encuentra protegido por las interacciones entre la cola poli(A) y la proteína de unión a poli(A) (PABP), la cual limita el acceso a las nucleasas (Bernstein and Ross, 1989). La remoción del *cap* y el acortamiento de la cola de poli(A) generalmente constituyen un paso crucial en el inicio del proceso de degradación (Beelman and Parker, 1995; Mitchell and Tollervey, 2001; van Hoof and Parker, 2002).

La degradación puede continuar a través de dos caminos posibles (van Hoof and Parker, 2002). En el primero, el transcripto es degradado por el exosoma desde 3' hacia 5'. En el segundo, se remueve el *cap* del transcripto, el cual es degradado desde 5' hacia 3' por medio de nucleasas. Ambos mecanismos se encuentran presentes en levaduras (Anderson and Parker,

1998; Muhlrad et al., 1994) y en células de mamífero (Chen et al., 2001; Gao et al., 2001; Mukherjee et al., 2002). Se ha demostrado que en células de mamíferos el mecanismo principal para el decaimiento de los ARNm mediado por *AREs* involucra la degradación desde 3' hacia 5' por medio del exosoma (Chen et al., 2001; Mukherjee et al., 2002).

A pesar de que muchas preguntas se mantienen sin respuesta acerca de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el proceso de decaimiento de los ARNm mediados por *AREs*, se puede proponer un modelo de pasos:

Paso 1: Activación de las AUBPs a través de cambios en transcripción, splicing, modificaciones post-transcripcionales o localización

En este paso, ocurre un incremento en la producción de *AUBPs* o en la activación de *AUBPs* expresadas constitutivamente. La transcripción *de novo* y la traducción regulan los niveles de ciertas *AUBPs* como TTP (Lai et al., 1990), mientras que cambios en el procesamiento que lleva a variantes de *splicing* ocurren sobre otras, como AUF1 (Wagner et al., 1998). También ocurre sobre estas proteínas y sobre HuR la modulación de su actividad mediada por la fosforilación de las mismas (Subbaramaiah et al., 2003). Tanto el proceso de ubiquitinación como la distribución núcleo-citoplasma de estas proteínas podrían también ser factores importantes para su activación (Jarrousse et al., 1999; Laroia et al., 1999).

El rol de la fosforilación sobre la actividad de TTP es controversial. Algunos estudios han proporcionado evidencias de que la misma no afecta su capacidad para unirse a secuencias *ARE* ni a promover el decaimiento de los ARNm que las contienen (Cao et al., 2006; Cao et al., 2003; Chrestensen et al., 2004; Stoecklin et al., 2004). Por el contrario, estudios *in vitro* han indicado que TTP no fosforilado muestra mayor afinidad por secuencias de ARNm y favorece su decaimiento rápido, lo que sugiere que la fosforilación inhibe la actividad de esta *AUBP* (Cao, 2004; Carballo et al., 2001; Hitti et al., 2006).

La degradación del ARNm es un proceso de múltiples etapas que involucran muchos factores. Por lo tanto, es plausible que la fosforilación de TTP pueda modular su interacción con otras proteínas, incluyendo componentes de la maquinaria de degradación del ARN. Además, se ha reportado que la fosforilación de TTP, a través de la activación de la MAPKp38, bloquea la vía de reclutamiento del complejo de deadenilación, inhibiendo esta actividad en los ARNm blancos de TTP (Marchese et al., 2010). Curiosamente, la fosforilación de TTP por la quinasa MK2 no tiene efecto sobre la actividad de unión de TTP a las secuencias *ARE*, lo que sugiere que esta modificación afecta su interacción con las proteínas del complejo de deadenilación. (Marchese et al., 2010). Basado en estas observaciones, se puede deducir que durante la fase inicial de una respuesta inflamatoria se producen estímulos que llevan a la inducción de la expresión de TTP, seguido por su fosforilación y acumulación en una forma inactiva que

controla su capacidad para promover la degradación de ARNm de factores pro-inflamatorios, mediada por *AREs* (Hitti et al., 2006). Cuando el estímulo desaparece, la represión de TTP dependiente de su fosforilación se libera, lo que lleva a la degradación selectiva de mensajeros que contengan elementos *ARE* y que se hayan expresado durante el estímulo.

Paso 2: cambios en la unión de las AUBPs sobre los transcritos con ARE

A pesar de que no está claro si un *ARE* puede unirse simultáneamente a diferentes AUBPs o si se pueden formar complejos multiproteicos, es probable que, cuando es favorable el decaimiento, los niveles relativos de factores estabilizantes (HuR) bajen y los niveles de factores desestabilizantes (TTP) se incrementen. Alternativamente, la estabilización puede ser favorecida por la asociación de los *AREs* con factores estabilizantes como HuR, lo cual previene la progresión de los subsecuentes pasos de decaimiento de ARNm específicos.

Paso 3: remoción de cola poly-A

Una vez que las *AUBPs* que favorecen el decaimiento se asocian con el ARNm, el transcripto es rápidamente deadenilado (Lai et al., 2003). La simple remoción de la cola poly-A resulta en una significativa reducción de la traducción del ARNm; por lo tanto provee un paso para la terminación de la producción de la proteína, incluso antes de la degradación del transcripto (Jacobson and Peltz, 1996; Munroe and Jacobson, 1990). De hecho, la remoción de la cola poly-A puede ser estimulada por las *AUBPs* debido a su interferencia con los factores del inicio de la traducción, permitiendo el acceso a la cola de poly-A de la enzima de deadenilación PARN (Mitchell and Tollervey, 2000; van Hoof and Parker, 2002). Esta hipótesis está basada en la observación de que AUF1 interactúa con factores unidos tanto a la cola poly-A (PABP) como al 5' *cap* (eIF4G) (Laroia et al., 1999) y puede explicar la asociación entre la traducción y la estabilidad del ARNm que se observa en algunos sistemas.

Con respecto a TTP, diferentes estudios *in vitro* han identificado una asociación directa entre los complejos de deadenilación Caf1 y esta *AUBP* (Lai and Blackshear, 2001; Sawaoka et al., 2003). Otros estudios también han demostrado que TTP puede promover la deadenilación dependiente de PARN. Sin embargo, no se ha podido determinar una asociación física directa entre PARN y TTP, lo que indica una posible interacción indirecta a través de otras proteínas (Lai and Blackshear, 2001; Suswam et al., 2008).

Paso 4: degradación 3'-5' del ARNm

Luego de la remoción de la cola poly-A, el siguiente paso en el camino de decaimiento de los ARNm mediado por *AREs* es la degradación de los mismos de 3' a 5' por medio del

exosoma. Se cree que el exosoma es reclutado al ARNm a través de interacciones entre las *AUBPs* y diversos componentes del mismo (Chen et al., 2001; Mukherjee et al., 2002). Aún no se ha determinado el destino de las proteínas unidas a los ARNm, una vez que ha ocurrido su decaimiento. Sin embargo, la ubiquitinación de algunas *AUBPs* sugiere que la destrucción vía proteosoma podría ser un mecanismo por el cual se eliminen estas proteínas (Laroia et al., 1999).

En la degradación por exosoma, TTP juega un papel clave ya que puede reclutar al mismo a los ARNm con secuencias *ARE* y tiene la capacidad de interactuar con algunas proteínas que lo componen (Chen et al., 2001). También se ha sugerido la interacción de TTP con componentes de *P-bodies*, permitiendo su ensamblado y transporte de ARNm para promover su degradación (Franks and Lykke-Andersen, 2007). Otros estudios han proporcionado pruebas de que TTP se puede encontrar asociado a estructuras discretas en el citoplasma que se ensamblan en respuesta al estrés celular y que comprenden subconjuntos de ARN y proteínas detenidos durante el proceso de traducción (gránulos de estrés) (Anderson and Kedersha, 2008; Murata et al., 2005; Stoecklin et al., 2004). Esta capacidad de TTP para interactuar con los *P-bodies* y los gránulos de estrés ejemplifica un mecanismo potencial por el que TTP puede mediar el tráfico dinámico de los ARNm celulares entre estos dos centros del metabolismo de ARN (Anderson and Kedersha, 2006; Kedersha et al., 2005).

El decaimiento mediado por *AREs* es más que un mecanismo celular para asignar vidas medias cortas a ARNm específicos que codifican para proteínas regulatorias. Este proceso puede acoplarse específicamente a las demandas celulares para los cambios rápidos y significativos en la expresión génica, que ocurren transitoriamente en respuesta a señales extracelulares. Consecuentemente, la regulación de la estabilidad de los ARNm constituye un componente crítico en el control de la expresión génica.

TTP e inflamación

Como se ha mencionado anteriormente, el rol fisiológico de TTP fue estudiado por primera vez por Taylor y colaboradores, en ratones *KO* para el gen *Zfp36* (Taylor et al., 1996). Los ratones con deficiencia de TTP parecían normales al nacer pero luego, entre las semanas 1 y 8, desarrollaban un síndrome inflamatorio autoinmune sistémico caracterizado por la caquexia (estado de extrema desnutrición, atrofia muscular, fatiga, debilidad y anorexia), conjuntivitis, dermatitis, artritis poliarticular erosiva, y alopecia irregular. Curiosamente, este fenotipo dependía de la pérdida completa de TTP, ya que ratones heterocigotas para el gen no presentaron estos trastornos.

Debido a la semejanza de este fenotipo con enfermedades inflamatorias sistémicas, donde el exceso de expresión de $TNF\alpha$ es un factor determinante, el fenotipo hiper-inflamatorio de ratones *TTP*^{-/-} fue atribuido al aumento en los niveles circulantes de esta citoquina. El

tratamiento de los ratones con anticuerpos anti-TNF α a una edad temprana evitó todos los aspectos del fenotipo inflamatorio, lo que sugirió un posible rol de TTP en la regulación de la producción de TNF α *in vivo* (Douni et al., 1995; Keffer et al., 1991). Estudios posteriores demostraron que TTP participa en la degradación del mensajero de TNF α . Con el correr del tiempo, se amplió la lista de ARNm-ARE blancos de TTP la cual incluye, entre las citoquinas más destacadas, a GM-CSF (Carballo et al., 2000), COX-2 (Boutaud et al., 2003), interleukina-3 (IL-3) (Stoecklin et al., 2001) e interleukina-6 (Il6) (Grivennikov and Karin, 2011).

Como se evidenció a partir del modelo de ratón *knock out*, TTP es un regulador fisiológico crítico de varias citoquinas pro-inflamatorias, y su expresión alterada puede influir en la aparición y la gravedad de síndromes inflamatorios en seres humanos, tales como la artritis reumatoide (AR), lupus sistémico eritematoso sistémico (LES), y la colitis ulcerosa (CU) (Carrick et al., 2006; Suzuki et al., 2008; Tsutsumi et al., 2004).

TTP y cáncer

La iniciación y progresión de cualquier tipo tumoral se produce por la falta de regulación en la expresión de proteínas que controlan diversas funciones celulares y tisulares que incluyen diferenciación, ciclo celular, apoptosis, angiogénesis e invasividad (Hanahan and Weinberg, 2000). Tanto en células normales como tumorales, la síntesis de estas proteínas está fuertemente influenciada por las concentraciones citoplasmáticas de sus respectivos ARNm, que, a su vez, dependen de la cinética tanto de su síntesis como de su degradación. Ambos procesos son finamente controlados por cascadas de señalización que normalmente son disparadas por estímulos extracelulares. Sin embargo, en células tumorales esas vías pueden estar constitutivamente activas o específicamente apagadas. Los mecanismos de regulación transcripcional de la expresión génica son y han sido extensamente estudiados. Sin embargo, los mecanismos que determinan la regulación de la estabilidad de esos transcriptos y que, por lo tanto, también determinan la cantidad de proteínas generadas en la célula han recibido atención sólo recientemente. Además de la clara importancia que tienen los microARNs en este nivel de regulación, se ha demostrado que la estabilidad de ARNm de oncoproteínas es controlada por elementos *AREs* (Guhaniyogi and Brewer, 2001).

A pesar de que el contexto en el cual la actividad de TTP ha sido más estudiada es en la respuesta inflamatoria, actualmente existen claras evidencias de que esta proteína previene la progresión tumoral. Se ha demostrado que la expresión de TTP está significativamente disminuida en muchos tipos de cáncer, incluyendo el de mama, y que su inducción suprime características invasivas en líneas celulares tumorales (Brennan et al., 2009). Se ha observado que la sobre-expresión de TTP, en una línea celular de cáncer mamario que normalmente no la expresa esta proteína (MDA-MB-231), causó la inhibición de la expresión de ARNm que

codifican para proteínas relevantes en la capacidad invasiva de las mismas, como MMP-1, uPA y uPA-R (Al-Souhibani et al., 2010). Este mismo equipo de investigación, dirigido por el Dr Khalid SA Khabar, poco tiempo después demostró que el balance de expresión entre TTP y HuR, en líneas celulares de cáncer de mama, correlaciona con el incremento de la expresión de ARNm con secuencias **ARE** en su 3' **UTR** que codifican para genes relacionados a la invasión tumoral. El responsable de este cambio en la proporción de expresión entre TTP y HuR es el microARN MiR29a que reconoce y suprime el ARNm de TTP, llevando a la estabilización HuR (Al-Ahmadi et al., 2013). Estudios recientes, llevados a cabo en líneas celulares, han relacionado la disminución de la expresión de TTP con el potencial metastásico de células de cáncer de mama al describir cómo TTP promueve la degradación del mensajero de CXCR4, un receptor de quemoquinas involucradas en la migración de células metastásicas (Al-Souhibani et al., 2014).

OBJETIVOS

Objetivo General

En base a los antecedentes mostrados, nos propusimos comprender y caracterizar la función de Tristetraprolina (TTP) en el desarrollo y función de la glándula mamaria.

Objetivos específicos:

- Caracterizar el patrón de expresión de TTP en tumores mamarios humanos y murinos.
- Analizar la regulación hormonal de la expresión de TTP en células epiteliales mamarias murinas.
- Determinar la importancia de la expresión de TTP en el epitelio mamario durante el desarrollo en ratones hembras vírgenes y preñadas
- Analizar la relevancia biológica de la expresión de TTP en el epitelio mamario durante la lactancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos utilizados

La Dexametasona (Dex), Prolactina (PRL) ovina, Insulina, Fenol y Proteínasa K utilizados fueron producidos por la empresa Sigma (St. Louis, USA). El ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) y el *cocktail* inhibidor de proteasas son de Calbiochem (San Diego, CA, USA). Los medios de cultivo DMEM y RPMI 1640, la tripsina, y la penicilina/estreptomicina, fueron comprados a Invitrogen Argentina SA (*Life Technologies*). El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido a la empresa Internegocios (Mercedes, Buenos Aires, Argentina). El Alcohol Isoamílico, Alcohol Iso-propílico, Cloroformo y Etanol Absoluto son de Cicarelli (San Lorenzo, Santa Fe, Argentina). Las sales inorgánicas así como los detergentes SDS, Tween 20 y Tritón X100 fueron comprados a Biopack (Zárate, Buenos Aires, Argentina), y los reactivos para biología molecular, como la Glicina, β -mercaptoetanol, Agarosa, Acrilamida/Bisacrilamida, TEMED, *luciferase Reporter System* utilizados son de Promega (Madison, WI, USA). El marcador de peso molecular de proteínas fue *Rainbow Marker* y el revelador fue *ECL+Plus System*, ambos de GE Health Care, UK. Todos los reactivos utilizados para la transcripción reversa y la PCR – soluciones, enzimas, MgCl_2 , nucleótidos y oligonucleótidos - fueron comprados a Invitrogen Argentina SA, excepto el *SYBR Green* (Roche). Los anestésicos utilizados fueron Ketafine de Brower y Xilazina de Afford. El resto de los insumos para biología molecular, como Trizol y BSA fueron de Invitrogen, mientras que las enzimas de restricción fueron de Promega. Para las transfecciones se utilizó polietilamina lineal/PEI (Polysciences).

Cultivo de líneas celulares

Cultivo de las líneas celulares mamarias humanas y de ratón

La línea celular de cáncer de mama humano T47D fue cultivada en medio DMEM, suplementado con 10% de SFB y 100 UI/ml penicilina G, y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina. Las células se cultivaron en placas de plástico de 100 mm (Nunc) en una estufa a 37°C y 5% de CO_2 . Esta línea fue mantenida en medio libre de suero 18 horas previas al tratamiento con PRL (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, ZR75 y MDAMB231 fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, 10 U/ml penicilina G, y 10 mg/ml de estreptomicina. Las células se cultivaron en placas de plástico de 100 mm en una estufa a 37°C y 5% de CO_2 , hasta alcanzar 70% de confluencia, momento en el cual fueron cosechadas.

Línea celular HC11

La línea celular HC11 es una línea de células epiteliales no-neoplásicas de mama. La misma fue originada a partir de tejido de la glándula mamaria de una hembra preñada de la cepa de ratones BALB/c (Ball et al., 1988) y ha sido considerada como un excelente modelo de estudio de los estadios de diferenciación de las células epiteliales mamarias. Estas células mantienen características de las células epiteliales mamarias normales, siendo la más importante su capacidad de sintetizar proteínas de la leche luego del tratamiento con hormonas lactogénicas (Ball et al., 1988; Danielson et al., 1984). La expresión de β -caseína es usada como marcador de diferenciación, siendo su regulación, en esta línea celular, reflejo de su regulación *in vivo* durante la preñez (Ball et al., 1988; Petersen and Haldosen, 1998). La producción de β -caseína en cultivo celular es dependiente de múltiples factores; algunos ejemplos de estos factores son la presencia de agentes mitogénicos durante la proliferación de las células, los contactos célula-célula, la deposición de matriz extracelular y la subsecuente activación de los factores STAT5a y STAT5b dependiente de PRL (Taverna et al., 1991).

Estudios realizados en HC11 demostraron que durante la proliferación y confluencia (previamente a la aparición de marcadores de diferenciación), las proteínas STAT5a y STAT5b exhiben niveles de expresión similares, siendo predominante la isoforma b (Petersen and Haldosen, 1998). En cambio, en la glándula mamaria *in vivo*, la isoforma predominante, aún en hembras vírgenes, es la a (STAT5a) (Liu et al., 1996). Por las razones que se mencionaron más arriba, es posible que este predominio se deba al microambiente que rodea a la célula epitelial en la glándula mamaria. Probablemente también sea esta expresión diferencial de STAT5a la que le permita a las células mamarias de hembras vírgenes, responder a los estímulos hormonales del ciclo estral, con la expresión de proteínas de la leche, como β -caseína y WAP (Kordon et al., 1995). Sin embargo, esta divergencia entre las células HC11 y el epitelio mamario *in vivo* desaparece una vez que las células en cultivo alcanzan la “competencia”. Llegado a este nivel, seguramente gracias a la deposición de la matriz extracelular, en las células de esta línea se verifica la típica predominancia de la isoforma STAT5a sobre la b, que se asocia a la capacidad de responder a los estímulos lactogénicos (Petersen and Haldosen, 1998).

Las células HC11 (Ball et al., 1988) se cultivaron en medio RPMI-1640, con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10 U/ml penicilina G, y 10 mg/ml de estreptomycin y 5 μ g/ml de insulina. Las células se crecieron en placas de plástico de 100 mm (Nunc) en una estufa a 37°C y 5% de CO₂. Se mantuvieron durante 3 días al 100% de confluencia, en medio con 2% de SFB, hasta alcanzar el estado de competencia. Se indujo el proceso de diferenciación celular, por tratamiento con hormonas lactogénicas, 10⁻⁷ nM de Dex y 5 μ g/ μ l de PRL ovina durante 3 días en medio con 2% de SFB como ha sido previamente descripto (Figura M y M 1).

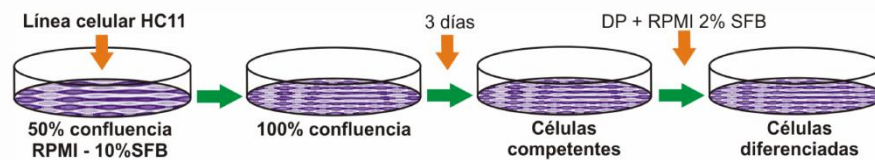


Figura MyM 1:

Protocolo de obtención de HC11 diferenciadas. DP: Dexa y PRL.

Trabajo con animales

Ratones C57BL/6

Los ratones de las cepas transgénicas y salvajes C57BL/6 fueron mantenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Los apareos fueron realizados con animales de 15 a 16 semanas de vida, siguiendo las reglas de dicha institución y de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*NIH Publication*, 1986). Los ratones se mantuvieron en jaulas en cuartos acondicionados a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un esquema automático controlado de 12h luz/12h oscuridad, con comida y agua *ad libitum*.

Ratones Cre/loxP

El sistema Cre/LoxP es una técnica utilizada para delecionar genes en tejidos específicos. El método estándar requiere dos líneas de ratones transgénicos diferentes. Una de las cepas de ratones contiene un gen blanco flanqueado por dos sitios LoxP ("gen *floxed*") en una orientación directa. La segunda cepa es una línea de ratón transgénico que expresa la enzima recombinasa Cre bajo el control de un promotor que es específico para un tipo de tejido particular. Cuando el ratón LoxP y el ratón Cre se cruzan, algunos descendientes heredarán el gen flox y el transgen Cre. En el tejido donde se exprese la recombinasa Cre, el segmento de ADN flanqueado por los sitios LoxP será escindido y, por lo tanto, el gen será inactivado. El gen blanco flanqueado por sitios LoxP permanecerá activo sólo en aquellos tejidos que no expresen la enzima Cre (Orban et al., 1992).

En la mayoría de los casos la creación de ambas cepas, LoxP y Cre-tejido-específico, se desarrollan de forma independiente y luego se cruzan para generar el gen *knockout* (KO) específico de tejido. En esta tesis se utilizó la cepa TTP-LoxP, que posee el gen de TTP rodeado de secuencias Lox, descrito por Qiu et al., en el 2012. En ese trabajo, TTP se silenció en la línea mieloide y se demostró el papel crítico que juega dicho gen en la prevención del shock séptico inducido por lipopolisacáridos (LPS), principalmente al inducir la degradación del mensajero de $\text{TNF}\alpha$ (Qiu et al., 2012). La cepa TPP-loxP fue cruzada con la línea de ratones WAP-Cre, donde la enzima Cre-recombinasa se encuentra río abajo del promotor del gen WAP. La proteína WAP (*Whey acidic protein*) es uno de los componentes principales de la leche del ratón; su expresión es

específica para células pertenecientes al linaje epitelial de la glándula mamaria y su promotor se encuentra transcripcionalmente activo durante la ventana temporal que comprende la lactancia. La cepa WAP-Cre fue descrita por Wagner et al.; en 1997. En ese trabajo se demostró que la acción de la enzima Cre estaba restringida a los alvéolos de la glándula mamaria, y que presentaba mayor eficiencia que otros sistemas utilizados para el silenciamiento de genes en la glándula mamaria (Wagner et al., 1997).

Generación de ratones TTP-KO condicional en glándula mamaria

Ratones de la cepa C57BL/6 con sitios LoxP que flanquean al gen TTP ($TTP^{LoxP/LoxP}$), gentilmente cedidos por el Dr. Blackshear (Qiu et al., 2012), fueron cruzados con ratones C57BL/6 que expresan la enzima Cre recombinasa bajo el control del promotor murino del gen WAP ($WAP-Cre^{+/-}$), provenientes del *National Cancer Institute – U.S National Institute of Health* (Wagner et al., 1997). En nuestro modelo, durante la lactancia, cuando se exprese la proteína WAP, también se estaría expresando la enzima Cre-recombinasa que escindiría el gen TTP al reconocer los sitios LoxP que lo rodean (Figura MyM 22 A)

Se realizaron cruzamientos específicos para obtener machos doble transgénicos $WAP-Cre^{+/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ y hembras $WAP-Cre^{-/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ (Figura MyM 22 B, Filiación 2). Para la obtención de hembras experimentales, los machos $WAP-Cre^{+/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ fueron apareados con hembras $WAP-Cre^{-/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ para generar ratones $WAP-Cre^{+/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ y $WAP-Cre^{-/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ de los cuales sólo conservamos las hembras (Figura MyM 22 B, Filiación 3). Las hembras $WAP-Cre^{+/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ fueron consideradas como “experimentales” ya que no expresan TTP durante la lactancia, mientras que sus hermanas $WAP-Cre^{-/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ fueron consideradas “controles”, ya que la expresión de TTP durante el desarrollo de la glándula no se ve afectado.

Para confirmar que TTP había sido escindido en la glándula mamaria, se realizaron ensayos de PCR con cebadores específicos para observar la delección, y se utilizó ADN genómico purificado a partir de la glándula mamaria. Este procedimiento fue realizado para todas las muestras (Figura MyM 2 C). Las hembras $WAP-Cre^{+/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ y $WAP-Cre^{-/-}/TTP^{LoxP/LoxP}$ fueron apareadas con machos salvajes (*wild type*) y se tomaron muestras de la glándula mamaria a diferentes tiempos luego del parto (10, 15 y 21 días de lactancia) y durante la involución: luego de una semana de lactancia se separaron las crías de la madre y se tomaron muestras a las 24h, 48h y 72h posteriores.

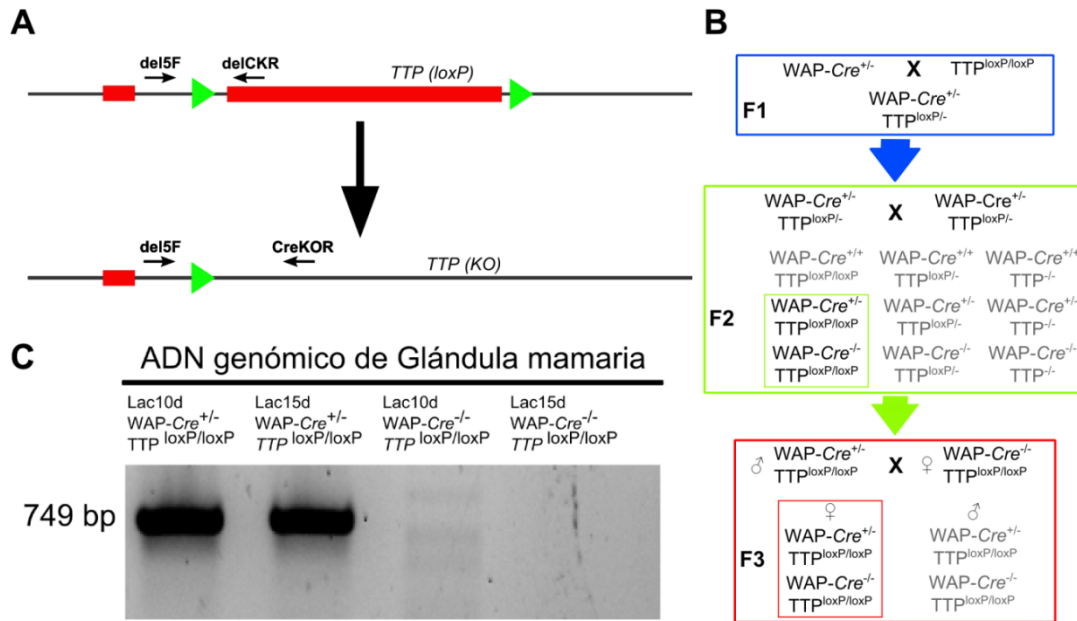


Figura MyM 2

(A) Esquema representativo que muestra la posición de los sitios loxP en el gen de TTP (triángulos verdes) y los sitios de pegado de los cebadores. (B) Diagrama de los apareos realizados. Se muestran los genotipos de los animales parentales y de sus crías (F1, F2 y F3). (C) Gel de agarosa que muestra los productos de PCR y la recombinación mediada por Cre de los sitios loxP adyacentes al gen de TTP, en la glándula mamaria y consecuente delección del gen de TTP.

Ratones KO total para TTP

Ratones machos de la cepa C57BL/6 con el gen de TTP delecionado y genotipo heterocigoto (TTP^{+/-}), fueron cruzados con hembras de igual genotipo para la obtención de crías homocigotas para la delección del gen (TTP^{-/-}). Estos animales también fueron gentilmente cedidos por el Dr. Blackshear, NIH, USA.

Genotipeado

De manera rutinaria, para el genotipo de los ratones tanto KO-condicional como KO-Total, se realizó una purificación de ADN genómico a partir de oreja de los ratones, seguida de reacciones de PCR con cebadores específicos (Tabla 1) y, por último, separación de los fragmentos de amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa (1%).

Purificación de ADN genómico

Para preparar ADN genómico se partió de porciones de oreja (aproximadamente 1 mm²). La lisis del tejido se realizó en 200 µl de Buffer de Lisis (TrisHCl 40mM, EDTA 1mM, NaCl 150 mM, pH a 7,6) suplementado con 200 µg/µl de Proteinasa K por 18 horas en estufa a 56 °C. La

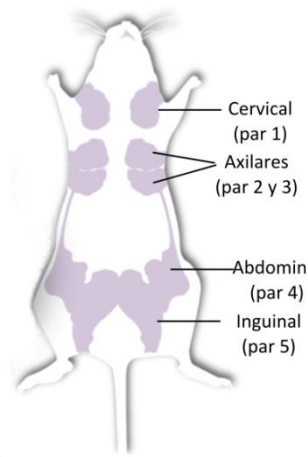
extracción del ADN se llevó a cabo utilizando primero 1 volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1) y luego 1 volumen de Cloroformo. El ADN se precipitó con 1/10 volumen de Acetato de sodio 3M + 2 volúmenes de etanol 100% frío y se lavó con etanol 70 % y se disolvió en agua libre de DNAsas.

Tabla 1: Listado de cebadores utilizados para el genotipado por *PCR* de los ratones transgénicos.

Gen	Cebadores	Longitud (pb)
Cre	(CO31Fw) Sentido: 5'-TAGAGCTGTGCCAGCCTCTTC-3' (WOO3Rv) Antisentido: 5'-CATCACTCGTTGCATCGACC-3'	Wt: 0 pb Cre: 210 pb
pLox	(del5Fw) Sentido: 5'-GAACCTCTCTCGATCGGGGATAC-3' (delCKR) Antisentido: 5'-GGATGGAGTCCGAGTTTATGTTCCAA-3'	Wt: 327 pb loxP: 514 pb
Cre/pLox	(del5Fw) Sentido: 5'-GAACCTCTCTCGATCGGGGATAC-3' (CreKORv) Antisentido: 5'-CATAAAGGGTGAGAGGGCTCAGC-3'	TTP deletado: 749 pb
KO Total	(f5832-5856) Sentido: 5'-CGAATCCCTCGGAGGACTTTGGAAC-3' (r6267-6247) Antisentido: 5'-CTGGCCAGGGAGAGCTAGGTC-3'	TTP endógeno: 435 TTP KO: 1575
KO Total	(f5832-5856) Sentido: 5'-CGAATCCCTCGGAGGACTTTGGAAC-3' (r1328-1307) Antisentido: 5'-GATATTCGGCAAGCAGGCATCG-3'	TTP KO: 1013

Extracción de Tejido mamario

Luego de sacrificar a las hembras por dislocación cervical se obtuvo el tejido mamario en todos los casos por remoción del par de mamas N°4 (abdominales) para la purificación de proteínas, ADN o ARN. Se utilizó el par de mamas N° 2 y 3 (axilares) para su análisis histológico (Figura MyM 3). Ambas glándulas fueron extraídas en su totalidad y cortadas en fragmentos de no más de 0.5 cm de diámetro, para la purificación de ARN o proteínas, y de 1 cm de diámetro para los análisis histológicos. Se procedió a la rápida fijación en formalina al 10%, tamponada con *buffer* fosfato a pH 7.0, de todos los fragmentos obtenidos de las glándulas axilares o, en el caso de las glándulas inguinales, al congelado rápido por nitrógeno líquido y posterior almacenamiento a -80 °C.

**Figura MyM 3**

Disposición de los 5 pares de glándula mamaria en ratón.

Cirugía – Trasplante de Tejido Mamario

Ratonas *salvajes* C57BL/6 provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales (UBA), de 18 días de vida, fueron implantadas con tejido mamario proveniente de ratonas TTP-KO adultas o salvaje para el caso de los controles. Se sacrificó a las hembras donantes y se les retiró las glándulas mamarias N° 4 (inguinales) de manera completa y con previa remoción del nódulo linfático; el tejido fue cortado en pequeñas piezas y mantenido de manera momentánea en medio RPMI suplementado con SFB 10% a temperatura ambiente en condiciones de asepsia. Las hembras receptoras fueron anestesiadas con ketamina y xilazina (Ketamina 1cc + Xilazina 0,25cc; se administró de manera intraperitoneal 0,025 cc de la mezcla anterior cada 10 g de animal.) y se procedió con la intervención quirúrgica de la mama N° 4 inguinal (derecha e izquierda). Primero se produjo la remoción del nódulo linfático y el tejido comprendido entre éste y el pezón. Luego, se procedió al implante de una porción de glándula, proveniente de las hembras donantes, en la almohadilla grasa remanente en la hembra receptora. Por último, se suturó la herida.

Ensayos Bioquímicos y Moleculares

Análisis de Proteínas

Purificación de Proteínas

Para extraer proteínas tanto de células como de tejido, se utilizó *buffer* de lisis RIPA (Tris HCl 20 mM, pH=7,4; EDTA 2 mM; NaCl 137 mM; Glicerol 10%; SDS 0,1%; Deoxicolato de Sodio 0,5%; Tritón X100 1%) suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail* set I, Calbiochem, San Diego, CA, USA) y fosfatasa (1mM de NaF, 40 mM de glicerofosfato de sodio y 1 mM de Na₃VO₄). Para ambos tipos de muestras, se realizaron ciclos de congelamiento y descongelamiento en hielo. Posteriormente, se los centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos microtubos y

guardados a -80°C para su posterior uso. En el caso de la extracción a partir de tejido, el paso de centrifugación se repitió al menos 2 veces. La concentración de proteínas presente en el sobrenadante se determinó mediante el método Bradford (Bradford, 1976) (Coomasie Blue G250 4%; Etanol 5%; ácido Fosfórico 8,5%), y la curva de calibración se realizó con concentraciones crecientes (1-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de albúmina sérica bovina (BSA).

Ensayo de *Western Blot*

50 μg de proteínas fueron llevadas a un mismo volumen con H_2O destilada. Se agregó *buffer* de siembra (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 2%; Glicerol 10%; Azul de Bromofenol 0,006%; β -Mercaptoetanol 2%) y se las calentó 10 minutos a 100°C para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente, las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida/SDS de porcentaje 10%. Las muestras se corrieron a voltaje constante (30 minutos a 80 V y 2 horas a 150 V) en el *buffer* correspondiente (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; Glicina 192 mM; SDS 0.1%), y luego se electro-transferieron en frío a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 300 mA durante 1,5 horas en *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; Glicina 192 mM; Metanol 20%).

Finalizada la electrotransferencia, se realizó una tinción de las proteínas en la membrana durante 5 minutos con una solución de rojo Ponceau-S (Rojo Ponceau 0,1%; Ácido Acético 5%) para verificar la eficiencia de la transferencia. Luego, se lavó y se bloqueó la membrana a temperatura ambiente durante 1 hora con una solución al 5% de leche descremada (Purísima) en PBS-T (PBS con 0,1% de Tween) en agitación constante. Posteriormente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con anticuerpo primario anti-TTP (Sigma, Anti-TTP *N-terminal* T5327, 1:500) o anti- β Tubulina (sc-9104, Santa Cruz Biotechnologies, 1:3000) en PBS-T conteniendo 2% de leche descremada. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS-T y luego se incubó la membrana durante 1,5 horas a temperatura ambiente con el respectivo anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2004, Santa Cruz Biotechnologies, 1:5000), preparados en 2% leche en PBS-T. A continuación, se repitió el protocolo de lavado y finalmente el *western blot* fue revelado por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL-Plus según indicaciones del fabricante.

La señal de quimioluminiscencia fue capturada utilizando el analizador de imágenes FUJIFILM LAS1000. El peso molecular de las bandas detectadas se comparó con un marcador de peso molecular sembrado en el mismo gel. La intensidad de las bandas presentes en las imágenes fueron cuantificadas por densitometría utilizando el programa ImageJ 1.34s *software* (Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los valores de intensidad obtenidos para cada banda fueron normalizados, con respecto a la cuantificación de las señales de β Tubulina, al control correspondiente. Para los casos en donde se analizaron los

niveles de fosforilación de proteínas, la cuantificación obtenida para los niveles de la proteína fosforilada fueron normalizados contra los valores obtenidos para la proteína total y nuevamente fue referido al control respectivo.

PCR cuantitativa

Purificación de ARNm

Para preparar ARN total, a partir de tejido mamario normal, se homogeneizaron los fragmentos congelados con un homogeneizador (*Tissue Tearor*, modelo 985370) con 1 ml del reactivo Trizol. En el caso de líneas celulares, se utilizó 0,5 ml de este reactivo. En ambos casos, se siguió el protocolo indicado por el fabricante que incluye, una extracción con cloroformo y la precipitación del ARN con isopropanol, el lavado del pellet de ARN con etanol 75% y finalmente su re-suspensión en agua libre de ribonucleasas. En todos los casos, las preparaciones de ARN fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (*Nanodrop*) a partir de la medición de la absorbancia a 260 nanómetros. En nuestros estudios, sólo se utilizaron los ARNs que mostraron una relación 260/280 nm > 1,8. Para comprobar la integridad del ARN, se evaluó la presencia de las dos bandas correspondientes al ARN ribosomal por electroforesis en geles de agarosa y luego las preparaciones así obtenidas fueron conservadas a -80°C.

Transcripción reversa y PCR en tiempo real

Para realizar la transcripción reversa (RT), se utilizaron 5 µg de ARN total para muestras provenientes de tejido mamario o 1 µg de ARN total si éste provenía de células en cultivo. Por reacción, se agregó 0,25 ng/ml de Oligo-dT, 0,25 ng/ml de oligonucleótidos con secuencias al azar, 1mM de dNTPs, 20U de inhibidor de ribonucleasas (RNAsin), 200U de la enzima transcriptasa reversa MMLV en su *buffer* de transcripción MMLV 1X, en un volumen final de reacción de 20 µl, y a continuación se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, se colocó junto al ARN los Oligo-dT y cebadores de secuencia al azar, se lo llevó a 10 µl con agua destilada libre de ribonucleasas, y se desnaturalizó por calentamiento a 70 °C durante 5 minutos en termociclador. Luego, para evitar la renaturalización, la muestra fue colocada inmediatamente en hielo. Finalmente se agregaron 10 µl de la solución conteniendo el resto de los reactivos mencionados anteriormente y se llevó a cabo la reacción durante 60 minutos a 37 °C, seguidos de 5 minutos a 95 °C con el fin de inactivar a la enzima.

Todas las *PCRs* en tiempo real (*qPCR*) en este trabajo se realizaron en 25 µl de volumen final con 1 a 4 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs, 1,25 U Taq polimerasa, y 2 ng/ml de cada oligonucleótido específico para la secuencia a amplificar. En la tabla 2 se describen todas las secuencias cebadoras empleadas a lo largo de la Tesis para las *RT-qPCRs*.

Las *qPCRs* se llevaron a cabo mediante el agregado de *SYBR Green* en una dilución 1:30.000, y se realizaron en el ciclador *DNA Engine Opticon* (MJ Research) utilizando 5 μ l de una dilución 1/20 de cada ADNcopia (ADNc) obtenido.

El programa que se utilizó en todos los casos fue el siguiente: 3 minutos a 93 °C, 40 ciclos de 30 segundos cada uno a 93 °C, 20 segundos a la correspondiente temperatura de hibridación de los cebadores y 20 segundos a 72 °C, efectuándose una lectura de la fluorescencia producida al finalizar cada paso a 72 °C. Para cada uno de los ADNc analizados, se realizaron curvas de temperatura de hibridación y de concentraciones de magnesio para seleccionar las condiciones óptimas de cada reacción. Se analizó la obtención de un solo producto de amplificación mediante la observación de la curva de *melting* y de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó en cada reacción una curva de calibración para calcular la eficiencia de promedio de la reacción, donde cada par de oligonucleótidos debió cumplir el requisito de tener una eficiencia de amplificación cercana a 2.

Tabla 2: Listado de cebadores utilizados para PCR en tiempo real.

Gen	Especie	Cebadores	Temp Annealing	Long (pb)	Referencias
ARN18s	ratón / humano	Sentido: 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3' Antisentido: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	60°C	151	(Nakasato et al., 2006; Schmittgen and Zakrajsek, 2000)
β Actina	humano	Sentido: 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3' Antisentido: 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCAC-3'	60°C	245	Diseñados
β csn	ratón	Sentido: 5'-GATGCCCTCCTTAACTCTGAA-3' Antisentido: 5'-TTAGCAAGACTGGCAAGGCTG-3'	61°C	75	(Nakasato et al., 2006)
GAPDH	ratón	Sentido: 5'-AGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC-3' Antisentido: 5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG-3'	60°C	111	Diseñados
Cox2	ratón	Sentido: 5'-ATGAGTACCGCAAACGCTTC-3' Antisentido: 5'-CCCCAAAGATAGCATCTGGA-3'	62°C	168	diseñados
Il6m2	ratón	Sentido: 5'-TCTATACCACTCACAAGTCGGA-3' Antisentido: 5'-GAATTGCCATTGCACAACCTCTT-3'	66°C	88	(Grenon et al., 2013)
LIFm	ratón	Sentido: 5'-GGCAACCTCATGAACCAGATCA-3' Antisentido: 5'-GCAAAGCACATTGCTGAGGAGG-3'	60°C	336	(Schere-Levy et al., 2003)
MMP2m	ratón	Sentido: 5'-GCCTCATACACAGCGTCAATCTT-3' Antisentido: 5'-CGGTTATTGGCGACAGT-3'	66°C	107	(Lee et al., 2005)
MMP3m	ratón	Sentido: 5'-ACATGGAGACTTTGTCCCTTTTG-3' Antisentido: 5'-TTGGCTGAGTGGTAGAGTCCC-3'	60°C	192	PrimerBank
MMP9m2	ratón	Sentido: 5'-GTTTTGATGCTATTGCTGAGATCCA-3' Antisentido: 5'-CCCACATTTGACGTCCAGAGAAGAA-3'	60°C	136	(Gueders et al., 2005)
MMP12m2	ratón	Sentido: 5'-CTGCTCCCATGAATGACAGTG-3' Antisentido: 5'-AGTTGCTTCTAGCCCAAAGAAC-3'	66°C	158	(Abad et al., 2013)
OSMm4	ratón	Sentido: 5'-TCCGCCTCCAAAACCTGAACAC-3' Antisentido: 5'-ATGGTATCCCCAGAGAAAGC-3'	60°C	142	(Nakamura et al., 2004)
TNF α	ratón	Sentido: 5'-AGCCGATTTGCTATCTCATACC-3' Antisentido: 5'-AGTACTTGGGCAGATTGACCTC-3'	64°C	184	(Schere-Levy et al., 2003)
TTPh	humano	Sentido: 5'-CATGGCCAACCGTTACACC-3' Antisentido: 5'-ACTCAGTCCCTCCATGGTCG-3'	58°C	101	diseñados
TTPm4	ratón	Sentido: 5'-TGCCATCTACGAGAGCCTCCAG-3' Antisentido: 5'-AGTCAGGCGAGAGGTGACCCCA-3'	64°C	130	diseñados
WAP	ratón	Sentido: 5'-CCAGCGACCGTGAGTGTC-3' Antisentido: 5'-GGAGTGAAGGGTCTTGCTGTATAG-3'	60°C	166	diseñados

Método de cuantificación con Curva de estándares: se realizó en cada reacción una curva de calibración con diluciones al medio seriadas, partiendo de una mezcla de los ADNc en estudio. Una vez calculada la masa inicial relativa en cada réplica, cada punto de análisis fue ensayado por triplicado y posteriormente promediado, los valores obtenidos se normalizaron para el gen β Actina, GAPDH o ARNr18s. Los valores correspondientes a $2^{-\Delta Ct}$ fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Prism, San Diego, California, EE.UU) mediante la prueba de ANOVA.

Método de cuantificación $\Delta\Delta Ct$: con los datos de Ct obtenidos, se realizaron los cálculos aplicando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct$ (Gen de interés) - Ct promedio (Gen de Referencia). Donde el gen de referencia elegido fue el ARNr 18S. Cada punto de análisis fue ensayado por triplicado y posteriormente promediado. Los valores correspondientes a $2^{-\Delta Ct}$ fueron analizados con el programa estadístico SPSS Statistics versión 17.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EE.UU) mediante la prueba de ANOVA.

Preparación de plásmidos y transfecciones

Bacterias

Preparación de bacterias competentes

Se cultivaron bacterias de la especie *Escherichia coli*, cepa DH5 α , en medio LB (10 g/l de peptona; 5 g/l extracto de levadura; 5 g/l NaCl) a 37 °C, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,3. Luego se crecieron 5 ml de ese cultivo en 100 ml de LB hasta una DO de 0,5. Luego, se incubó el cultivo por 10 minutos a 0 °C y se lo centrifugó por 10 minutos a 3000 g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 40 ml de TFB I (30 mM Acetato de potasio; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15 % Glicerol; pH 5,2). Tras incubar la resuspensión de bacterias en hielo por 5 minutos, se la centrifugó por 10 minutos a 3000 g a 4 °C. El pellet se resuspendió en 4 ml de TFB II (10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15 % Glicerol; pH 6,5). Finalmente, se dejaron reposar las células en hielo durante 15 minutos para luego guardarlas a -80 °C en alícuotas de 200 μ l.

Transformación de bacterias competentes

Se transformaron bacterias competentes *E. coli* (cepa DH5 α) con 1 μ l de cada plásmido a amplificar por shock térmico a 42 °C durante 90 segundos. Luego, se incubaron las células en medio LB líquido, sin antibiótico, a 37 °C durante 30 minutos en agitación constante. A continuación, se sembraron las bacterias en placas de Petri con LB-agar (LB + 15 g/L de agar) conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina (Bagó), y se dejaron en estufa a 37 °C por 16 horas. Finalmente se tomaron algunas colonias y se realizaron mini-cultivos en LB-Ampicilina a 37 °C durante 16 horas, en agitación constante.

Maxi-Preparación de plásmidos

Inicialmente, los mini-cultivos obtenidos anteriormente fueron incubados durante 24 horas en 400 ml de medio TB (13,33 g/l de Peptona; 26,8 g/l de extracto de levadura; 0,4 % Glicerol; 2,6 g/l de KH_2PO_4 ; 13,9 g/l de K_2HPO_4) con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ampicilina. Luego, las bacterias fueron centrifugadas durante 15 minutos a 4000 rpm, descartándose el sobrenadante, y resuspendidas en 10 ml de Solución I (25 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8). Se agitó la mezcla fuertemente durante 5 minutos y se agregaron 20 ml de Solución II (0,2 N NaOH; 1 % SDS). La mezcla se agitó por inversión y se dejó a 0 °C por 20 minutos. Luego, se agregaron 15 ml de solución III (3 M Acetato de potasio en 11,5 % de ácido acético glacial), se mezcló por inversión por 5 minutos a 0 °C y se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm a 4 °C. El ADN plasmídico fue precipitado por el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol al sobrenadante obtenido, por 20 min de incubación a -20 °C y luego por centrifugación durante 1 h a 5000 rpm a 4 °C. El ADN obtenido se resuspendió en 3 ml de solución TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA), se le agregó igual volumen de LiCl 5 M frío, se mezcló y centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos en frío. Al sobrenadante obtenido se le agregó igual volumen de isopropanol, se mezcló y centrifugó 5 min a 10000 rpm a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 0,5 ml de TE y se lo incubó con 20 mg/ml de Ribonucleasa A durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó igual volumen de 13 % de polietilenglicol en 1,6M NaCl, se mezcló y se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 400 ml de TE. Se realizaron extracciones con 1 volumen de fenol saturado en TE (una vez), 1 volumen de fenol saturado en TE:cloroformo (1:1) (2 veces), y 1 volumen de cloroformo (una vez). Se agregó 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100 %, y se dejó 20 min a -20°C. Para finalizar, se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm, se lavó con 70 % etanol y se resuspendió el pellet en 250 μl de TE. La concentración de ADN obtenida se calculó como μg de ADN/ μl de solución = $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Fdil}/1000$.

Constructos utilizados

A lo largo de este trabajo se utilizaron los siguientes plásmidos:

pTTPh: Vector que contiene 600pb del promotor de TTP humano. Éste fue clonado a partir de ADN genómico purificado de la línea celular T47D. El fragmento clonado contiene 600 bases del promotor de TTP más 35 bases del 5'-UTR amplificado con cebadores específicos, en cuya secuencia se encontraban sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción XhoI y HindIII. El fragmento, luego de ser digerido con estas enzimas, fue ligado al plásmido pGL3-*basic* (Promega Inc), también digerido con las mismas enzimas. El promotor humano de TTP se encuentra río arriba del gen de luciferasa. El plásmido resultante fue denominado pTTPh.

Cebadores utilizados:

sentido: 5'-GCATctcgagTCTGAATCTGTCTCTGGGAC-3'

antisentido: 5'-CGATAagcttGAGGGGTGTCGGCCGAGAGT-3'

pTTPm: Vector que contiene 1592pb del promotor de TTP de ratón. El promotor murino de TTP fue subclonado del plásmido pTTP-Gene-Flawed1. Éste es un plásmido pcDNA3.1 con 1619bp río arriba del sitio de inicio de la transcripción de TTP hasta la última base anterior al codón de *stop* del gen. Un fragmento que contiene 1561 bases del promotor de TTP más 31 bases del 5'-UTR fue escindido, utilizando las enzimas BglII y NcoI, y ligados al plásmido pGL3-*basic* (Promega Inc) que previamente había sido digerido con las mismas enzimas. El promotor de TTP de ratón se encuentra río arriba del gen de luciferasa. El plásmido resultante fue denominado pTTPm.

Cebadores utilizados:

sentido: 5'-ATCacgcgtGAGACTGGAGGATCGCAAGTTC-3'

antisentido:

5'AGTTgatatcCTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACTCAGAGACAGAG
ATACGATTG-3'

pStat5A-WT: vector que sobre-expresa el factor de transcripción Stat5A salvaje, descrito previamente (Beuvink et al., 2000), y gentilmente cedido por la Dra. Nancy Hynes del *Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research*, Basel, Suiza.

pStat5A-DN: vector que sobre-expresa el factor de transcripción Stat5A en su versión dominante negativa (DN), descrito previamente (Moriggl et al., 1996), y gentilmente cedido por la Dra. Nancy Hynes.

pCMVLacZ: vector conteniendo el gen de la β -galactosidasa bajo el promotor del citomegalovirus.

Transfección de líneas celulares

Transfección transitoria

Las células HC11 y T47D fueron sembradas en medio completo para permitirles llegar al 70-80% de confluencia. Luego, las células fueron transfectadas utilizando polietilamina lineal/PEI (Polysciences) con un protocolo ajustado para cada línea celular: incubamos 2, 4 o 10 ug de ADN total, para placas de 6 celdas, 6 cm y 10 cm respectivamente, en presencia de PEI (1ug/ul pH 7,2) en una relación 3:1 (PEI:ADN) para ambas líneas celulares, en medio completo durante 10 minutos, agregamos medio RPMI o DMEM sin suero, y estos complejos fueron

agregados a las células luego de lavarlas 3 veces con PBS. Pasadas las 6 horas, las células fueron lavadas nuevamente con PBS y se les cambió el medio de transfección por medio completo.

Ensayo de reporteros

Las células se sembraron en placas de 6 o 12 pocillos y se transfectaron con 0,1 ug de vectores reporteros de luciferasa y vectores que expresan constitutivamente la enzima β -galactosidasa. Luego, se lisaron las células en *buffer* de lisis (Promega), transcurrido el tiempo correspondiente a cada tratamiento. Los lisados celulares se incubaron con luciferina del *Luciferase Reporter system* (Promega). Los resultados se normalizaron para la eficiencia de transfección por medio de un ensayo de betagalactosidasa.

Estudios morfológicos e histológicos

Montaje completo de Glándula mamaria - Whole mount

Se fijaron las glándulas con fijador de Carnoy (Etanol:Cloroformo:Ácido Acético Glacial en proporciones 6:3:1, respectivamente) no menos de 4h. Se hidrató el tejido, y se lo dejó teñiendo por 18h con Carmin (1 gr de Carmin, 2,5 gr de Alumbre de Potasio en 500ml de H₂O destilada), en ebullición durante 20 minutos y luego es filtrado para su almacenamiento y uso). Se deshidrató el tejido, se lo sumigió en Xilol y se lo montó con solución de montaje (¿cuál?)

Inmunohistoquímica (IHQ)

Los fragmentos de glándulas mamarias y tumores fijados en 10% de formalina neutra fueron embebidos en parafina. El taco de parafina fue posteriormente seccionado, en láminas de aproximadamente 4 micrones de espesor, utilizando un micrótopo, y fijados a un porta-objetos utilizando procedimientos estándar. Los estudios morfológicos se realizaron por microscopía óptica sobre cortes teñidos con hematoxilina-eosina (H&E).

Tanto el análisis morfológico como inmunohistoquímico fue realizado con la ayuda y supervisión del Dr. Roberto Meiss, médico patólogo de la sección IIHEMAIEO de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

IHQ de TTP, pSTAT3 y CC3

Luego del desparafinado de los tejidos, se procedió al bloqueo de la actividad de las peroxidases endógenas por incubación durante 10' en una solución al 3% de H₂O₂. Para la recuperación antigénica, los preparados fueron incubados en microondas durante 10' en solución tampón EDTA 1.0 mM pH 8.0. Para la inmunodetección, se emplearon los anticuerpos primarios: anti-TTP (Santa Cruz, sc-14030, en dilución 1:200), anti-Caspasa 3 Activa (*Cell Signaling*, D175-cleaved caspase 3 9661, 1:100) y anti-pSTAT3 (*Cell Signaling*, pY705Stat3 9145 pStat3, 1:100). La inmunodetección de los anticuerpos primarios se efectuó mediante el empleo

del kit DakoCytomation LSAB + System-HRP (Dako, Alemania). Posteriormente, los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina (BIOPUR, Argentina). El patrón de inmunotinción para TTP fue registrado de manera semicuantitativa según la siguiente graduación: negativa (-), baja (+), moderada (++) y fuerte (+++). El patrón de inmunodetección para pSTAT3 se realizó en imágenes a 400X de aumento, contando un total de 1000 células por preparado, indicando la proporción de células marcadas.

Muestras de tejido mamario murino y humano normal y canceroso

Se analizó la expresión del ARNm de TTP en un grupo de 17 muestras de tejido mamario humano, comprendiendo muestras normales derivadas de mamoplastias cosméticas (n=7), muestras normales adyacente al tumor (n=4) y biopsias de carcinomas ductales invasores (n=6) preservado en RNAlater (Ambion, TX – EEUU) a -20°C. Además se analizó la expresión proteica de TTP en 64 muestras de tejido mamario humano (17 muestras de tejido mamario normal / lesiones benignas y 47 carcinomas ductales infiltrantes). Dichas muestras fueron obtenidas del Hospital Dr. Leónidas Lucero (Bahía Blanca, Buenos Aires) bajo aprobación del Comité de Bioética de la Institución. Brevemente, luego del desparafinado de los tejidos se procedió al bloqueo de la actividad de las peroxidases endógenas por incubación durante 10' en una solución al 3% de H₂O₂. Para la recuperación antigénica los preparados fueron incubados en microondas durante 10' en solución tampón EDTA 1.0 mM pH 8.0. Para la inmunodetección TTP se empleó el anticuerpo primario: anti-TTP (Santa Cruz, sc-14030) en dilución 1:200. La inmunodetección del anticuerpos primarios se efectuó mediante el empleo del kit DakoCytomation LSAB + System-HRP (Dako, Alemania). Posteriormente, los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina (BIOPUR, Argentina). El patrón de inmunotinción fue registrado de manera semicuantitativa según la siguiente graduación: negativa (-), baja (+), moderada (++) y fuerte (+++). Además, se evaluará el patrón de la inmunotinción (citoplasma, membrana plasmática y/o núcleo). Las muestras de tejido de ratón fueron previamente descriptas por Curino y colaboradores (Curino et al., 2005) y por Buggiano y colaboradores (Buggiano et al., 2002).

Análisis Bioinformáticos

En primer lugar, se creó una base de datos con los perfiles de expresión de 46 librerías de *SAGE* de muestras normales (n=4), carcinomas ductales in situ (n=7) y carcinomas infiltrantes de mama (n=35). Para lo cual, se combinaron 29 librerías de *SAGE* previamente descriptas por Abba et al. 2004, con 17 librerías de *SAGE* generadas en el Laboratorio de Polyak (*Dana-Farber Cancer Institute*, Boston, MA, EE.UU) descargadas de *SAGE Genie* (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/>). Todas las librerías fueron normalizadas a 100.000 tag. El manejo de la base de datos y el mapeo de los *SAGE tags* con los genes de referencia: TTP

(ATGGTGGGGG), fueron realizados con una aplicación web desarrollada por el grupo de trabajo (<http://sciencepark.mdanderson.org/labs/ggeg/>). Se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics versión 17.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EE.UU) para efectuar la prueba de ANOVA en función de los valores absolutos de *Tags* identificados en cada uno de los grupos analizados.

Además, se analizaron los perfiles de expresión de TTP, PRL, PRLR, GR, STAT3 y STAT5, en un estudio del desarrollo de la glándula mamaria de ratón (GSE8191) (Anderson SM, 2007) mediante los recursos bioinformáticos provistos por *Gene Expression Omnibus (GEO, NCBI-NIH)*. Este estudio se encuentra conformado por los perfiles de expresión de 40 *Affymetrix GeneChips* provenientes muestras de glándulas mamarias en diferentes estadios de desarrollo de ratones FVB.

RESULTADOS

Análisis de la expresión de TTP en tejido mamario normal y muestras tumorales

Análisis de la expresión de TTP en tejido mamario humano

En primer lugar, nos propusimos hacer un análisis más completo del previamente reportado (Brennan et al., 2009) en cuanto al patrón de expresión de TTP en tumores mamarios humanos. Para ello, en colaboración con el Dr. Martín Abba (Universidad Nacional de la Plata), trabajamos con dos bases de datos de perfiles de expresión génica que se encuentran a disposición del público. Por un lado, analizamos la expresión del mensajero de TTP en datos provenientes de una librería de *SAGE* (*Serial Analysis of Gene Expression*) en la que se incluyeron el perfil de expresión génica de 46 muestras de glándula mamaria humana normal y tumoral (Abba et al., 2007). Brevemente, el Análisis en Serie de la Expresión Génica (*SAGE*) es una técnica de Biología Molecular que permite conocer y cuantificar la expresión de los genes en la célula, mediante la secuenciación y posterior medición de secuencias características de los ARNm que están presentes en ésta en un momento determinado (Velculescu et al., 1995). En esta librería encontramos que el ARNm de TTP estaba significativamente expresado en epitelio de mama normal comparado con carcinomas *in situ* e invasivos ($p < 0.0001$) (Figura R 1 A). Estas observaciones fueron validadas por RT-qPCR en un set independiente de muestras de tejido mamario humano (Figura R 1B). En concordancia con lo observado en el análisis bioinformático, encontramos que la glándula mamaria normal presentaba una mayor expresión de TTP en comparación con carcinomas invasivos ($p = 0.017$). Por otro lado, analizamos la expresión del ARNm de TTP en datos provenientes de microarreglos de ADN copia (*cDNA*) de 295 carcinomas primarios de mama invasivos, clasificados de acuerdo a los 5 subtipos genómicos propuestos para esta enfermedad. Encontramos que la expresión de TTP era significativamente más alta en carcinomas mamarios del subtipo *Normal Like* en comparación de los otros subtipos, ($p < 0.001$) (Figura R 1 C).

Posteriormente, se determinaron los niveles de expresión de TTP en las líneas celulares de cáncer de mama humano: MCF7, T47D, ZR75 y MDAMB231. Estas líneas celulares, se caracterizan por poseer diferentes características fenotípicas relacionadas con el grado de diferenciación y la clasificación genómica, según los subtipos intrínsecos del cáncer de mama humano. El análisis estadístico nos permitió identificar altos niveles de expresión de TTP en las líneas celulares MCF7 y T47D (pertenecientes al subtipo luminal con alto-moderado grado de diferenciación), niveles intermedios de expresión en la línea celular ZR75 y niveles no detectables de expresión en la línea celular MDAMB231 (perteneciente al subtipo basal, indiferenciado) (Figura R 1 D).

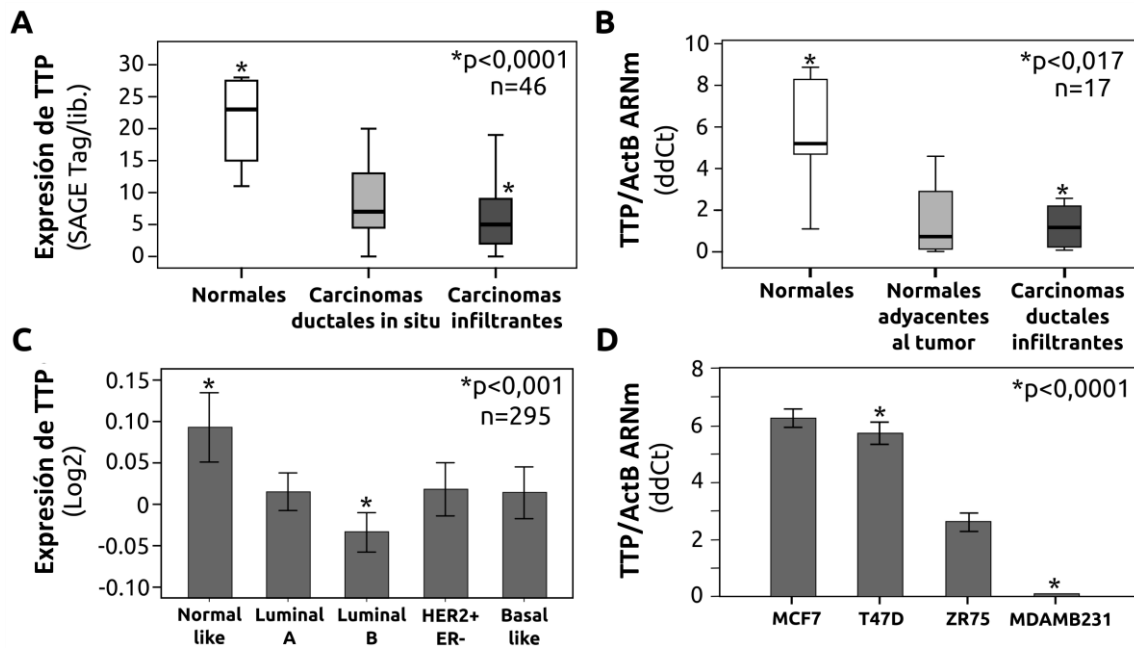


Figura R 1:

Análisis de los niveles de expresión génica de TTP en muestras de tejido mamario y en líneas celulares humanas. **(A)** Diagramas de caja del perfil de expresión de TTP, obtenidos mediante el empleo de la metodología *SAGE*. El nivel de expresión de cada transcrito se expresa en valores absolutos de ARNm. **(B)** Análisis de la expresión de TTP por *RT-qPCR* en tejido mamario normal y tumoral humano. **(C)** Análisis *in silico* de la expresión de TTP en 295 carcinomas ductales infiltrantes, agrupados según los 5 subtipos intrínsecos. **(D)** Análisis por *RT-qPCR* de la expresión de TTP, en líneas celulares de cáncer de mama humano.

Analizamos también la expresión de TTP en 64 muestras de mama humanas por inmunohistoquímica (IHQ). La expresión de la proteína TTP fue detectada en el 82% (n=52) de las mamas normales y/o lesiones benignas analizadas. En contraste, 63% (n=29) de los carcinomas ductales mostraron expresión débil o negativa (Figura R 2 A-D). De esta manera hallamos una diferencia en la expresión de la proteína TTP que resultó estadísticamente significativa entre los grupos mencionados ($p=0,02$) (Figura R 2 E). Además, en las muestras tumorales, la disminución de la expresión de TTP correlacionó con el grado tumoral ($p=0,001$) (Figura R 2 F).

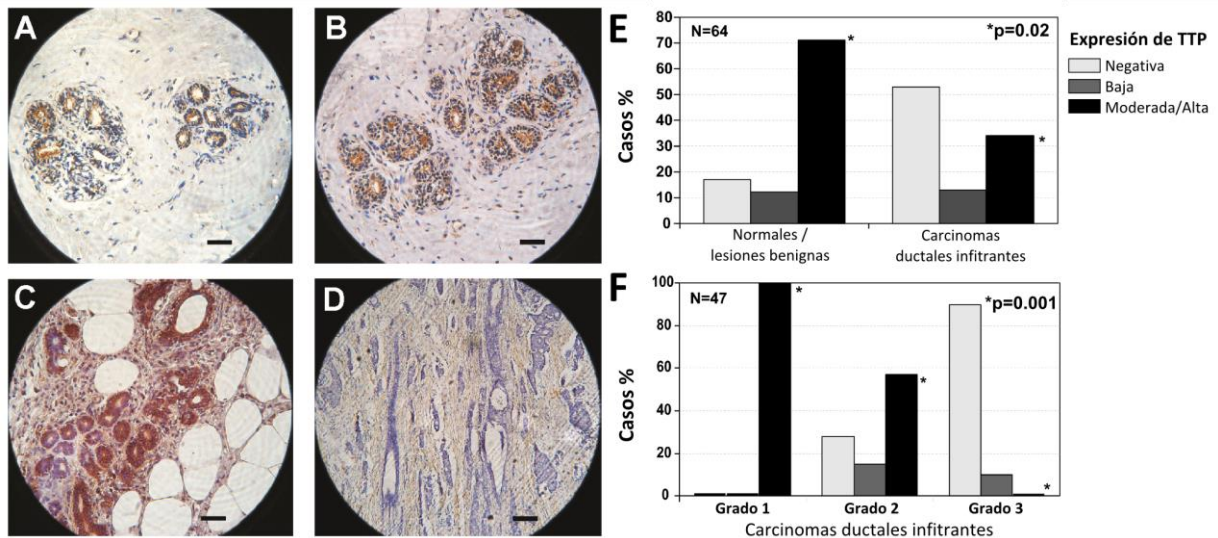


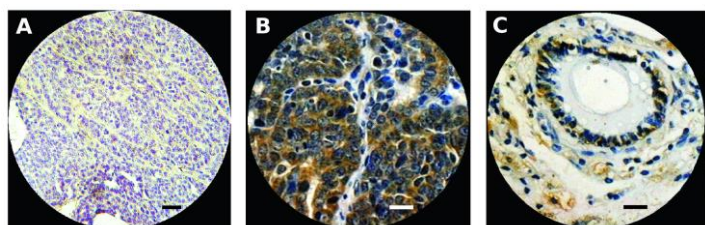
Figura R 2:

Análisis de la expresión proteica de TTP en tejidos mamarios humanos. (A y B) Inmunohistoquímica de TTP en tejido mamario normal (400X), (C) en lesión benigna, (hiperplasia atípica (400X), (D) y en un carcinoma mamario infiltrante indiferenciado (100X). Se identificó alta expresión de TTP con un patrón predominantemente citoplasmático en muestras normales y lesiones benignas. (E) Distribución total de casos (n=64) agrupados en tejidos normales y lesiones benignas (n=17) y en muestras tumorales (carcinomas ductales infiltrantes, n=47) en función de la expresión de TTP. (F) Distribución de los carcinomas ductales infiltrantes en función de la expresión de TTP y el grado histológico tumoral.

Análisis de la expresión de TTP en tejido mamario normal y tumoral de ratón

En el tejido de ratón, el análisis de IHQ también reveló que los tumores mamarios indiferenciados derivados de ratones transgénicos que sobre-expresan el antígeno PymT (Curino et al., 2005) presentaban menores niveles de expresión de TTP (Figura R 3 A) comparados con tumores inducidos por *MMTV* (Buggiano et al., 2002) y glándula mamaria no neoplásica. (Figura R 3 B y C. Escala de barra: 10µm). De esta manera, en glándula mamaria murina, también podría asociarse la expresión de TTP a un estadio normal no neoplásico o a tumores con baja capacidad invasiva y alto grado de diferenciación como serían aquellos inducidos por *MMTV*.

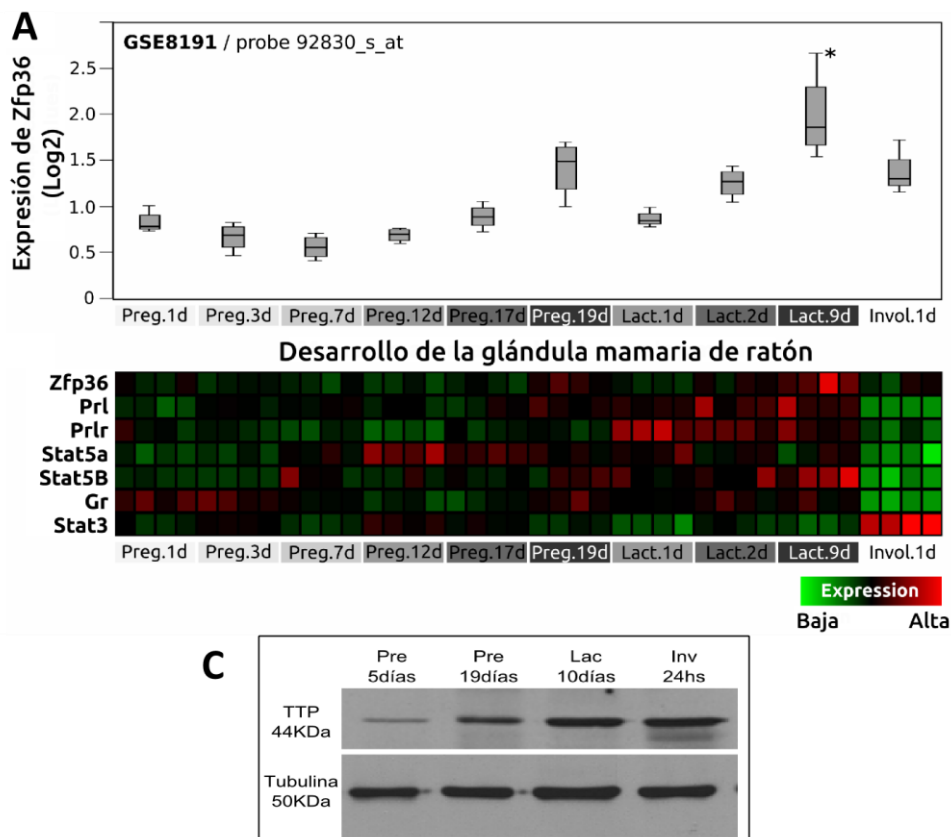
Figura R 3: Expresión de TTP en muestras de glándula mamaria de ratón. (A) Tumor de mama indiferenciado (400X); (B) Tumor de mama diferenciado (600X). (C). Glándula mamaria no neoplásica. .



Para determinar si TTP se expresa en la glándula mamaria normal del ratón y, de ser así, si existe una modulación dependiente del desarrollo de este tejido, se analizó un conjunto de datos -públicamente disponibles (GSE8191)- de expresión génica de ratones FVB. Observamos que el pico de ARNm de TTP se alcanza durante la lactancia (día 9, Figura R 4 A) (*Affymetrix* sonda ID 92830_s_at), y el análisis de co-expresión demostró una correlación positiva significativa con el ARNm de proteínas que cumplen roles relevantes en la diferenciación mamaria, tales como prolactina (PRL, $r = 0.614$; $p < 0.0001$), receptor de prolactina (PRLR, $r = 0.683$; $p < 0.0001$), y STAT5b ($r = 0.697$; $p < 0.0001$) Cada tiempo fue realizado por cuadruplicado (40 muestras de microarreglos) (Figura R 4 B). La expresión de TTP pudo ser confirmada por un ensayo de *Western Blot* realizado con proteínas purificadas a partir de glándula mamaria de ratonas Balb/c, donde puede observarse un aumento de la expresión de TTP al finalizar la preñez, siendo su máximo pico de expresión durante la lactancia (Figura R 4 C).

Figura R 4:

(A) Gráficos de caja de los niveles de expresión de TTP durante la preñez, lactancia e involución de glándulas mamarias de ratones FVB. **(B)** Análisis de co-expresión de TTP con *PRL*, *PRLR*, *GR*, *STAT5* y *STAT3* a nivel de ARNm. **(C)** Patrón de expresión proteica de TTP durante la preñez (Pre), lactancia (Lac) e involución (Inv) de glándulas mamarias de ratones BALB/c.



Lo anteriormente descrito coincide por lo reportado por la Dra. Victoria Slomiansky en el marco de su Tesis de Licenciatura, realizada en nuestro laboratorio y dirigida por la Dra. Edith Kordon, quien con el objetivo particular de estudiar la expresión de distintas AUBPs durante el desarrollo de la glándula mamaria de ratón encontró, por *RT-qPCR* e IHQ, una fuerte inducción de TTP durante el período de lactancia de la glándula en hembras BALB/c (Figura R 5 A y B, C y D). La Dra. Slomiansky también utilizó la línea celular HC11 con el fin de determinar la asociación entre diferenciación mamaria y expresión de TTP. Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, la línea celular HC11 es una línea epitelial no-neoplásicas de mama murina ampliamente utilizada para estudios de diferenciación y mecanismos de expresión génica del epitelio mamario por poseer la característica de responder al estímulo de hormonas lactogénicas luego de alcanzado el estado de competencia (Faulds et al., 2004; Nagaoka et al., 2007). En la mencionada Tesis se reportó que en esas células el agregado de prolactina (PRL), junto con el de glucocorticoide sintético Dexametason (Dexa) inducían la expresión del ARNm de TTP (Figura R 5 E).

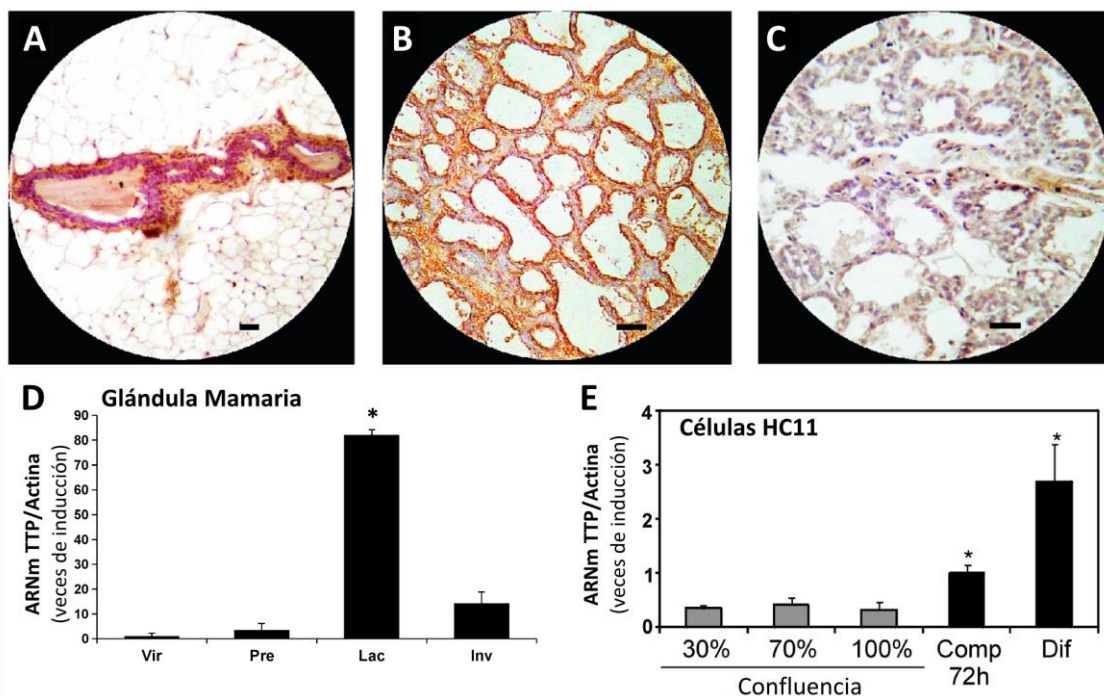


Figura R 5:

Antecedentes. Expresión de TTP en muestras de glándula mamaria normal de ratón. (A) hembra virgen (100X). (B) lactancia (400X) y (C) 48h de involución (400X). Escala de barra: 10 μ m en A, y 40 μ m en B y C. (D) Análisis por *RT-qPCR* de la expresión de TTP durante los distintos estadios de la glándula mamaria de ratón (Vir: virgen; Pre: preñada; Lac: lactando; Inv: involución 48h) (E) Expresión del ARNm de TTP en la línea celular HC11 durante Proliferación (distintos % de confluencia), Competencia (Comp) y Diferenciación (Dif) (* $p=0.005$).

Regulación de la expresión de TTP en un modelo de diferenciación mamaria de ratón

Con el objetivo de ampliar el análisis de la asociación entre la diferenciación mamaria y la expresión de TTP, estudiamos el efecto de las hormonas lactogénicas sobre la actividad del promotor murino de TTP. Para esto, utilizamos la secuencia promotora de dicho gen que fue clonada en el laboratorio de nuestro colaborador el Dr. Jonathan LaMarre de la Universidad de Guelph, Canadá. En nuestro laboratorio colocamos esa secuencia río arriba del gen reportero luciferasa en un vector de expresión (*pGL3-basi*), tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Con este plásmido realizamos transfecciones transitorias en células HC11 en un 80% de confluencia. Tras 48 horas de competencia, las estimulamos con PRL, Dexa o con ambas hormonas a la vez, por 24 horas. Los resultados muestran que el tratamiento con PRL indujo la actividad luciferasa con o sin el agregado de Dexa (Figura R 6 A). Además hallamos que la transfección con un dominante negativo de STAT5a (STAT5a-DN) bloqueó totalmente esta inducción (Figura R 7 A). Por su parte, el tratamiento con Dexa como única hormona fue incapaz de inducir la expresión de Luciferasa. Hallamos resultados similares al medir la expresión endógena de TTP en células HC11 competentes. Al estimular por 8h con las hormonas por separado o en conjunto, y también encontramos que la PRL sola fue capaz de inducir la expresión de TTP aunque en menor medida que ambas hormonas juntas (Figura R 6 B). Estos resultados sugieren que en células mamarias murinas la PRL induce la expresión de TTP por

activación del promotor y que esta activación es mediada por STAT5a.

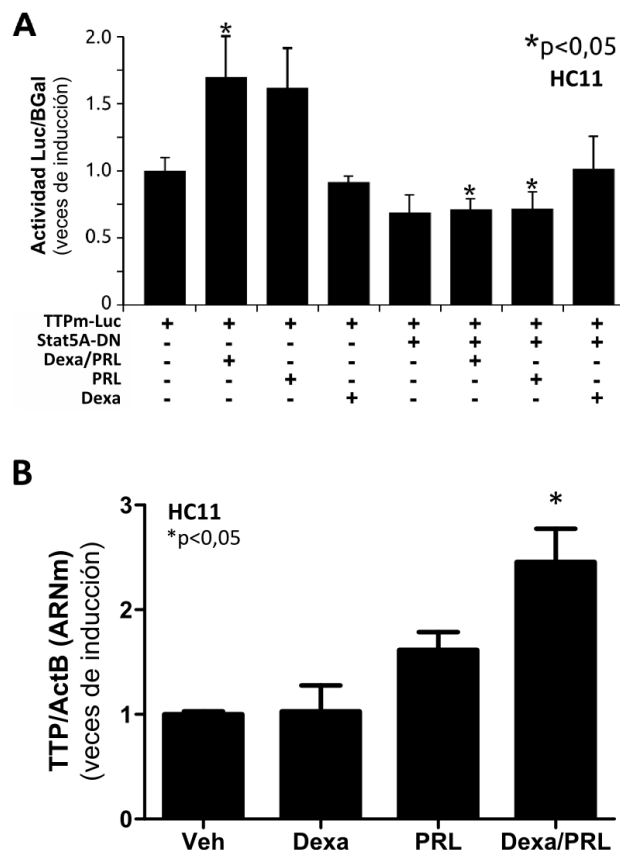


Figura R 6: Efecto de hormonas lactogénicas sobre la expresión de TTP en células mamarias murinas. **(A)** Células HC11 transfectadas con el constructo mTTP-Luc con y sin el plásmido Stat5A-DN. Se midió la actividad de la luciferasa ante el tratamiento con prolactina (PRL), Dexametasona (Dexa), ambas hormonas (Dex/PRL) o con vehículo (Veh y plásmido vacío) durante 24 horas, en medio libre de suero. **(B)** Expresión endógena del ARNm de TTP en células HC11 competentes tratadas o no con las hormonas lactogénicas.

Regulación de la expresión de TTP en células tumorales epiteliales humanas

Por otro lado, a diferencia de lo observado en células no-neoplásicas murinas, al tratar con PRL la línea tumoral mamaria humana T47D sólo se indujo la expresión del ARNm y de la proteína de TTP de manera transitoria en tiempos menores o iguales a 1h (Figura R 7 A y B). En esta línea celular también realizamos ensayos de transfección con el constructo hTTP-Luc, donde se encuentra clonado el promotor humano de TTP río arriba del gen de Luciferasa. El constructo hTTP-Luc fue cotransfectado con STAT5a-DN y luego de 24h las células fueron tratadas con PRL por otras 24h más. Contrario a lo observado en las células murinas, encontramos, que la vía PRL-STAT5a no era capaz de activar al promotor de TTP humano (Figura R 7 C).

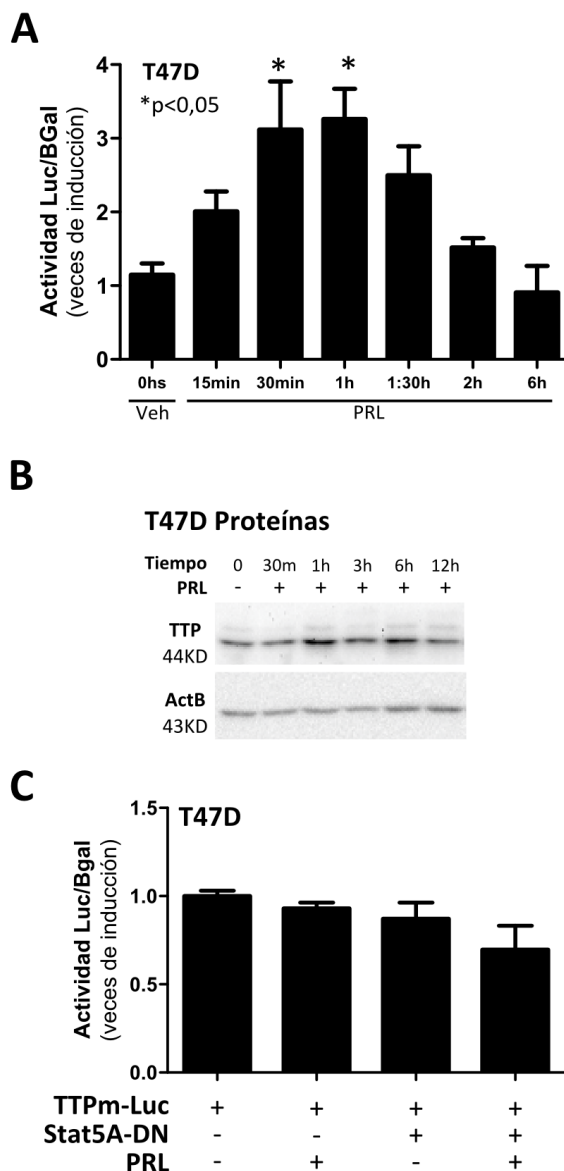


Figura R 7:

Efecto de hormonas lactogénicas sobre la expresión de TTP en células mamarias humanas. (A) Expresión del ARNm de TTP en la línea celular T47D sub-confluentes tratadas con PRL durante diferentes tiempos. (B) *Western blot* en el que se observa la expresión de TTP en células T47D tratadas con PRL en diferentes tiempos. (C) Células T47D transfectadas con el constructo hTTP-Luc con y sin el plásmido Stat5A-DN fueron tratadas o no con PRL durante 24 h.

El conjunto de estos resultados indican que además de su reportado rol como supresor tumoral, TTP se expresa de manera regulada en el epitelio mamario, y esta modulación es diferente a la observada en células tumorales. Nuestros datos también indican que en el epitelio mamario normal, las hormonas juegan un rol importante en la expresión de TTP, generando una inducción que se mantiene en el tiempo, a diferencia de lo observado en células que participan de la respuesta inflamatoria. A partir de esto nos planteamos los experimentos correspondientes a la segunda parte de esta tesis, que intenta dilucidar el rol fisiológico de la presencia de TTP en distintos estadios del desarrollo mamario normal.

Análisis de la función de TTP durante el desarrollo normal de la glándula mamaria murina.

Rol fisiológico de TTP en las glándulas mamarias de hembras vírgenes.

Con el objetivo de determinar si la delección de TTP afecta el desarrollo de la glándula mamaria durante los estadios tempranos del desarrollo mamario (formación de conductos) y durante la preñez (formación de conductos secundarios y alvéolos mamarios), trasplantamos epitelio mamario proveniente de ratones *KO* totales para TTP (TTP-*KO*) en la almohadilla de grasa subcutánea inguinal de ratones singénicos (C57BL/6) de 3 semanas de edad. De esta manera, se tiene la seguridad que el fenotipo se debe a la ausencia de dicha proteína en las células epiteliales, manteniendo el estroma la capacidad de expresar TTP.

A las 3 semanas de edad el crecimiento del árbol de conductos de la glándula está confinado al pezón y una red muy incipiente que, en la mama inguinal no alcanza a traspasar el ganglio local y es fácilmente removible quirúrgicamente. De esta manera se realiza el “clareado” de la almohadilla de grasa (*fat pad clearing*) del epitelio endógeno y puede trasplantarse otro epitelio singénico en el estroma despoblado de conductos que, durante la pubertad y adultez del ratón, se extienden e invaden toda la almohadilla. Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado para identificar células *stem* mamarias, caracterizar el desarrollo de nódulos hiperplásicos y estudiar el rol de diversos genes de expresión epitelial y el ambiente de desarrollo de la glándula

mamaria, entre otros factores (Jerry et al., 2000; Kordon and Smith, 1998; Medina, 1976; Shackleton et al., 2006)

Para este ensayo, entonces, se extirpó el par N°4 de la glándula mamaria a hembras donantes C57-BL/6 TTP-KO homocigotas y a hembras C57BL/6 salvajes (Controles), y luego de cortarlas en pequeños trozos se los implantó en las almohadillas inguinales "clareadas" de hembras receptoras de entre 18 y 20 días de edad (hembras C57-BL/6 salvajes). Transcurridos 2 meses desde el implante un grupo fue sacrificado (grupo de estudio "Virgenes", controles y experimentales), mientras que el otro grupo fue colocado con machos para que queden preñadas (grupo de estudio "Preñadas", controles y experimentales) y en este caso las hembras fueron sacrificadas aproximadamente a los 10 y 15 días de preñez. En todos los casos, luego de sacrificar las hembras se les extrajeron las mamas implantadas y, utilizando la técnica de *whole mount* (montaje total de la glándula mamaria) se analizó el desarrollo de conductos y alvéolos.

Al ser implantadas en la almohadilla de hembras vírgenes "salvajes", las glándulas TTP-KO mostraron un crecimiento y desarrollo de menor complejidad al ser comparado con aquellas provenientes de hembras controles (Figura R 8:). Si bien los conductos principales, en general alcanzaron los límites del *fat pad*, se observó una menor frecuencia y densidad de ramificaciones secundarias en las mamas de los animales TTP-KO. Esto indicaría que aunque el nivel de expresión de TTP en hembras vírgenes es significativamente menor que durante la lactancia, la presencia de esta proteína es relevante para el normal desarrollo del árbol de conductos que se produce durante la pubertad de las hembras. Por otro lado, no encontramos diferencias significativas, en el desarrollo lóbulo-alveolar de las mamas provenientes de ratones controles y experimentales, implantadas en hembras que luego fueron subsecuentemente preñadas (Figura R 9:). Esto indicaría que la presencia de TTP sería más relevante en la formación de un adecuado árbol de conductos mamarios que se produce en la hembra virgen, que en el desarrollo y diferenciación correspondiente los primeros 15 días de preñez.

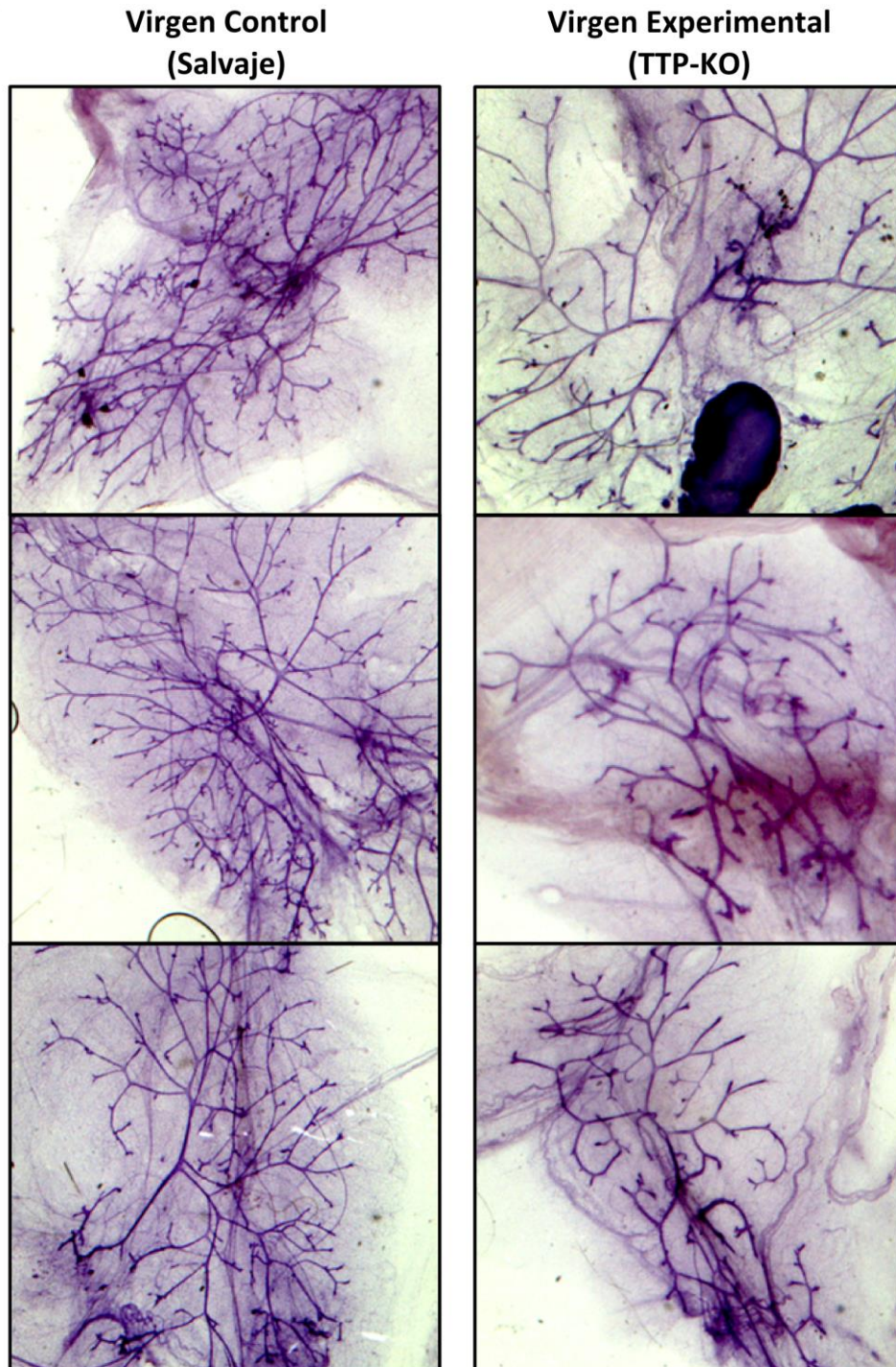


Figura R 8:
Desarrollo de la glándula mamaria en hembras vírgenes en ausencia de TTP. Montaje total de la glándula mamaria trasplantada; conductos teñidos con Carmín. Observación en Lupa; aumento 10X. Se muestran 3 experimentos independientes por categoría, Control y Experimental TTP-KO

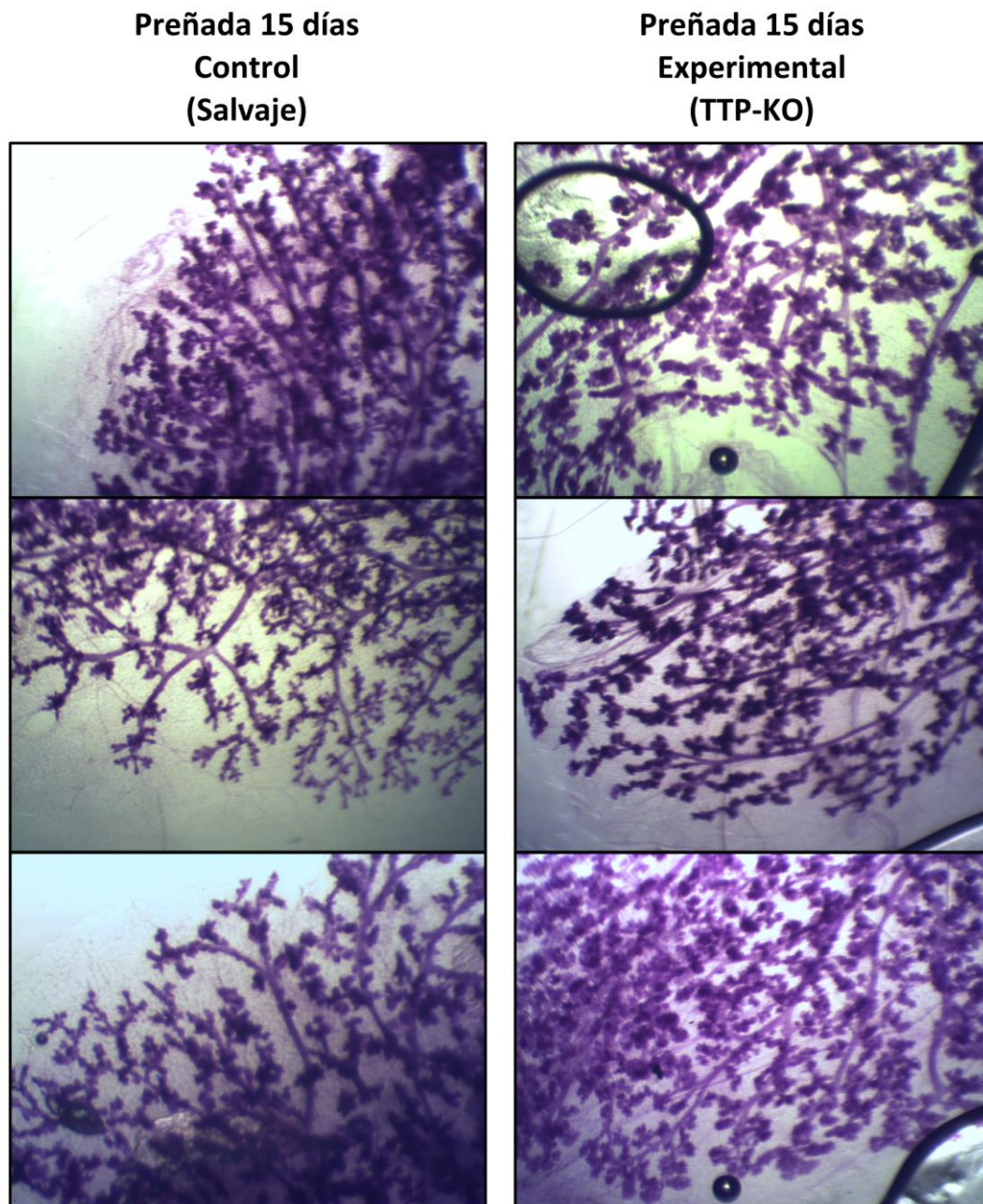


Figura R 9:

Desarrollo de la glándula mamaria en hembras con 15 días de lactancia en ausencia de TTP. Montaje total de la glándula mamaria trasplantada; conductos teñidos con Carmín. Observación en Lupa; aumento 20X. Se muestran 3 experimentos independientes por categoría, Control y Experimental TTP-KO.

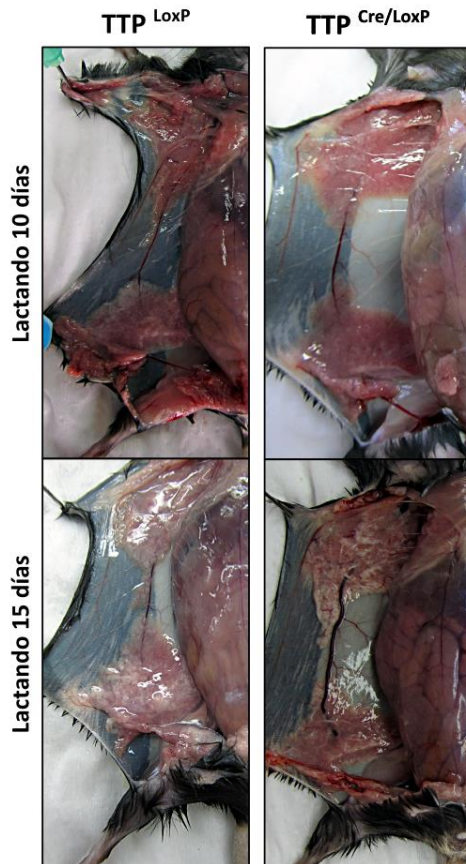
Análisis de la función de TTP durante la lactancia e involución de la glándula mamaria murina

Los ratones hembras que se utilizaron a partir de este punto del trabajo, salvo que se exprese lo contrario, son las siguientes:

✓ Experimentales: Wap-Cre^{+/-}/TTP^{LoxP/LoxP}. Estos ratones son hemicigotas para la Cre-recombinasa bajo el promotor WAP y homocigotas para el gen de TTP rodeado de secuencias LoxP. Por comodidad estos ratones serán llamados TTP^{Cre/LoxP}.

✓ Controles: Wap-Cre^{-/-}/TTP^{LoxP/LoxP}. Estos ratones no poseen el gen Cre-recombinasa y son homocigotas para el gen de TTP rodeado de secuencias LoxP. Por comodidad estos ratones serán llamados TTP^{LoxP}.

Se tomaron muestras de glándula mamaria de ratones hembras TTP^{Cre/LoxP} y TTP^{LoxP} a diferentes tiempos luego del parto (10 y 15 días de lactancia) y durante la involución (24h, 48h y 72h posteriores al retiro de las crías). Se consideraron 3 ratones Control y Experimental para cada tiempo seleccionado. En primer lugar, se verificó la recombinación y consecuente delección del gen de TTP por actividad de la Cre-recombinasa en las mamas de hembras experimentales luego del parto por PCR a tiempo final, tal como se muestra en la Figura MyM 1 de la Sección de Materiales y Métodos. El análisis macroscópico de las glándulas mamarias al momento de la



toma de muestras reveló que las provenientes de hembras TTP^{Cre/LoxP} que amamantaron durante 15 días eran de tamaño menor comparado con aquellas provenientes de controles en el mismo estadio (Figura R 10). Se realizó entonces un seguimiento del peso de las crías para determinar si este menor desarrollo afectaba el crecimiento de las mismas. Encontramos que en la tercera semana de vida (al momento del destete), aquellas crías amamantadas por hembras experimentales eran aproximadamente un 30% más livianas que las alimentadas por los ratones control (Figura R 11).

Figura R 10:

Glándula mamaria de ratonas TTP^{LoxP} y TTP^{Cre/LoxP}. Tiempos: Lactancia 10 días (L10d), Lactancia 15 días (L15d). Imagen macroscópica de las glándulas mamarias axilar y abdominal derechas durante los tiempos mencionados.

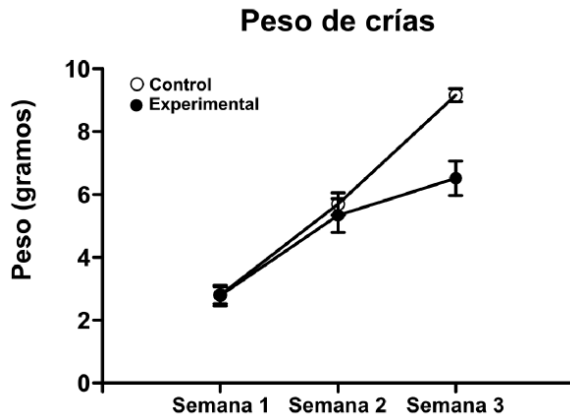


Figura R 11:

Pesaje de crías nacidas de ratonas TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$. Peso de ratones crías provenientes de hembras TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$

Para verificar la disminución de la expresión de TTP en las mamas de hembras experimentales luego del parto, se midieron los niveles endógenos del ARNm de TTP por *RT-qPCR* en tiempo real. Se observó que los ratones $TTP^{Cre/LoxP}$ presentaban una disminución en los niveles de expresión de este gen a partir del día 10 de lactancia, la cual se hace significativa a partir del día 15 (Figura R 12 A), con respecto a los ratones control en los mismos tiempos ($p=0,045$). Por otro lado, ni los ratones experimentales, ni los controles expresaban TTP a partir de las 48h luego del retiro de las crías (Figura R 12 B). Además, para determinar si estas glándulas mamarias mostraban alteraciones en la diferenciación lactogénica, se midieron por *RT-qPCR* los niveles de expresión de β caseína y *WAP*, proteínas de la leche materna del ratón (Figura R 13 A y B). Los resultados determinaron que las muestras provenientes de ratones experimentales no mostraron diferencias significativas en los niveles de β caseína, pero sí de *WAP* que a los 15 días de lactancia con respecto a los ratones control ($p=0,0097$), por lo que se puede inferir que la ausencia de TTP no afectaría en gran medida la producción de leche de la glándula.

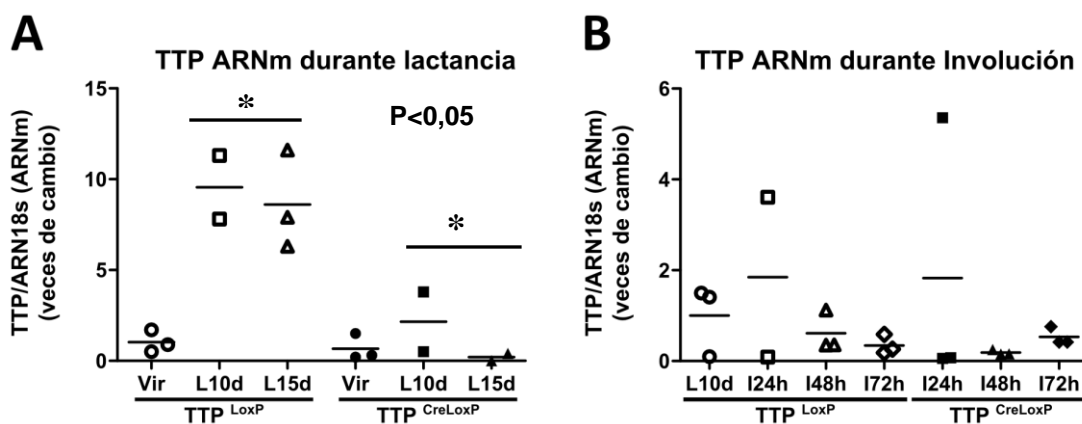


Figura R 12:

Expresión del ARNm de TTP en ratones *KO* condicionales para TTP. (A) Expresión de TTP durante la lactancia en ratones TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$; valores relativizados a Vir TTP^{LoxP} . (B) Expresión de TTP durante la lactancia en ratones TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$; valores relativizados a L10d TTP^{LoxP} . Vir: Virgen; L10d: Lactando 10 días; L15d: Lactando 15 días; I24h: Involución 24 horas; I48h: Involución 48 horas; I72h: Involución 72 horas. (* $p < 0.05$)

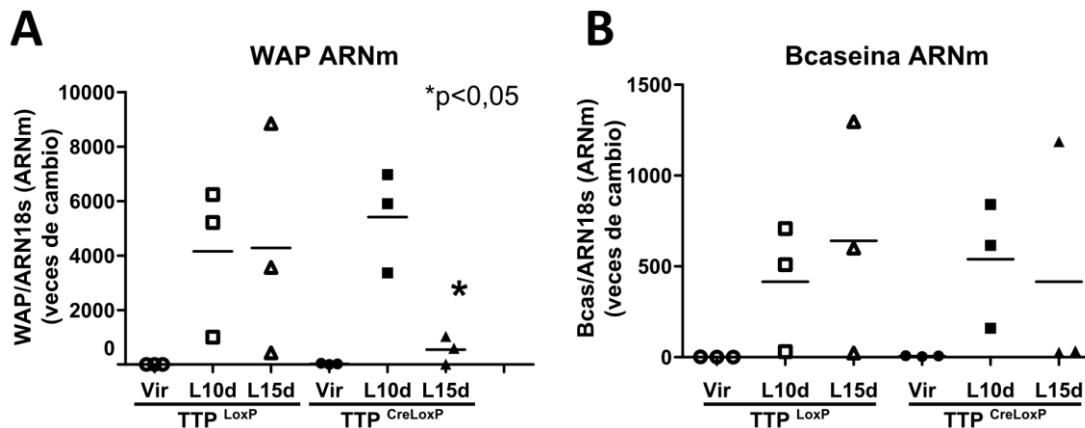


Figura R 13:

Expresión del ARNm de proteínas de la leche en ratones *KO* condicionales para *TTP*.

(A y B) Expresión de WAP y β -caseína durante la lactancia en ratones TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$; valores relativizados a Vir TTP^{LoxP} . Vir: Virgen; L10d: Lactando 10 días; L15d: Lactando 15 días. (*p < 0.05)

Efecto de la ausencia de TTP en la evolución de la glándula mamaria post-destete

Al producirse el destete, se inicia el proceso de involución mamaria que, como se mencionó previamente, comprende la muerte del epitelio secretorio y el remodelado de la glándula. Como modelo experimental para el estudio de este estadio, se utilizan hembras a las que se les retiran las crías luego de 5-10 días de lactancia. En este modelo, el retiro abrupto de las crías, genera una involución sincronizada en la que ocurren los mismos eventos que en la involución natural (Quarrie et al., 1996).

Trabajos previos han demostrado que durante las etapas tempranas del inicio de la involución comienzan a expresarse citoquinas proinflamatorias que serían, en parte, las encargadas de iniciar las cascadas de señalización que desencadenarían la remodelación de la glándula. Debido a que *TTP* regula la expresión de algunas de estas citoquinas en otros modelos de estudio (Carballo et al., 1998; Van Tubergen et al., 2011), nos preguntamos si la expresión de *TTP* durante la lactancia previene una involución acelerada del tejido y si aquellas glándulas que no expresan *TTP* tendrían el proceso de involución acelerado. Para responder estas preguntas, estudiamos glándulas mamarias provenientes de hembras TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$ durante distintos tiempos del proceso de involución. Los tiempos considerados fueron: 24 horas (I24h), 48 horas (I48h) y 72 horas (I72h).

Cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina

El análisis histológico realizado a partir de cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina de estas glándulas determinó que, luego de 24 horas del retiro de las crías los alvéolos de ambos grupos, experimentales y controles, se encontraban expandidos y las células epiteliales con aspecto aplanado, como consecuencia de la acumulación de la leche. Se pudo observar la presencia de algunas células muertas en el lumen de los alvéolos de las glándulas $TTP^{Cre/LoxP}$. Estas células presentaban características apoptóticas, como la forma redondeadas, núcleo picnótico (cromatina extremadamente condensada) y citoplasma teñido de manera homogénea (Figura R 14 A y B, flechas), indicando un pequeño aceleramiento en la involución de estos ratones. Por otro lado, aunque, a las 48 horas de involución se observó un aumento de células muertas en el lumen alveolar tanto de las glándulas $TTP^{Cre/LoxP}$ como de las controles TTP^{LoxP} (Figura R 14 C y D), encontramos una mayor presencia de tejido adiposo entre los alvéolos en las glándulas $TTP^{Cre/LoxP}$ (Figura R 14 C y D asterisco). Por lo tanto, considerando los tiempos de 24 y 48 horas, las evidencias histológicas indican una aceleración en el proceso de involución de la glándula en las ratonas $TTP^{Cre/LoxP}$. Sin embargo, a las 72 horas del retiro de las crías las ratonas $TTP^{Cre/LoxP}$ y TTP^{LoxP} mostraron similares características de remodelación del tejido, como por ejemplo mayor presencia de alvéolos colapsados, casi cerrados (Figura R 14 E y F, “X”), mayor cantidad de tejido adiposo entre alvéolos y mayor número de células muertas en el lumen de alveolar. Esto indica que luego de 3 días, la ausencia de TTP ya no afecta el desarrollo del proceso de remodelado tisular asociado al destete.

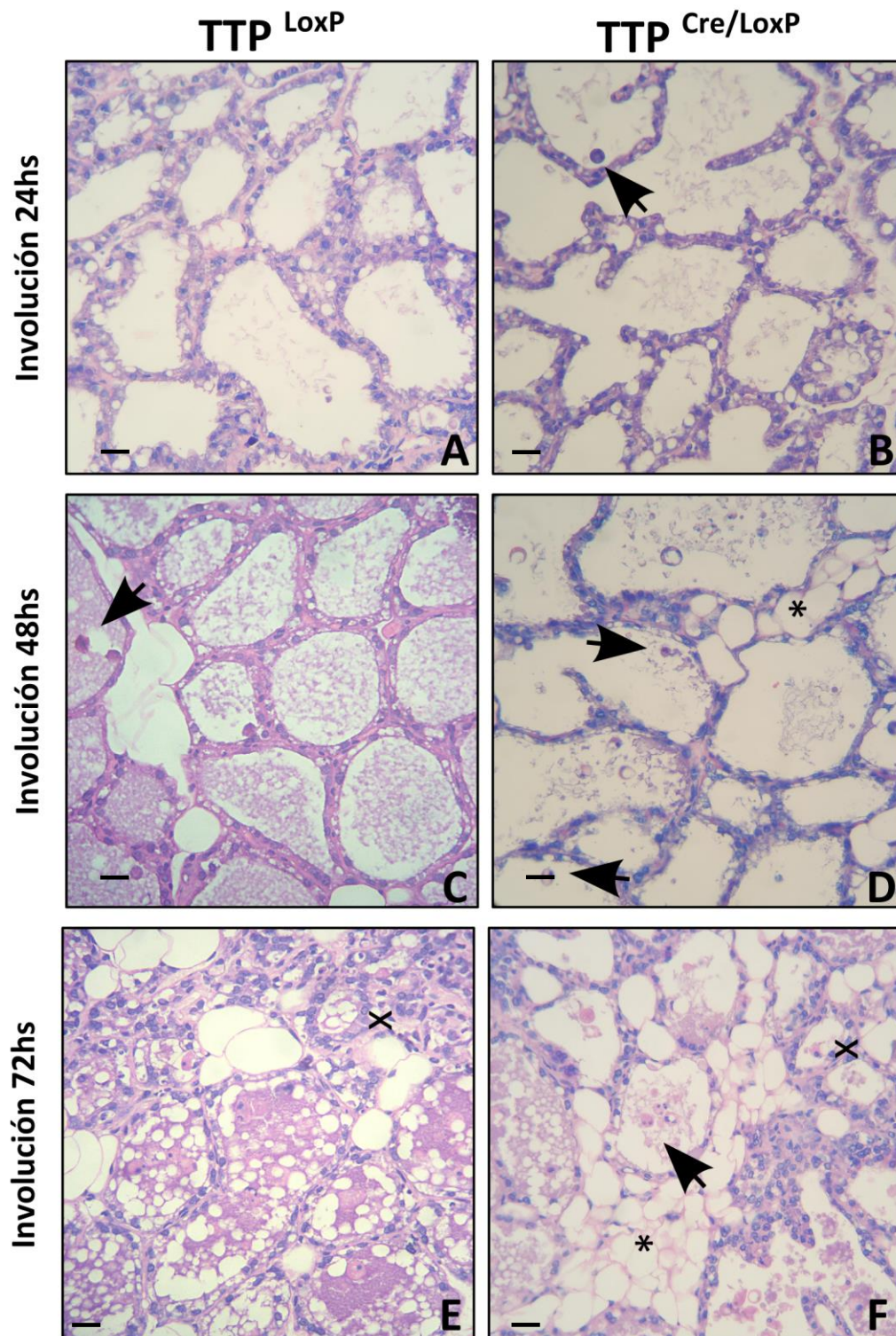


Figura R 14:

Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina provenientes de glándulas mamarias de ratonas **TTP^{LoxP}** y **TTP^{Cre/LoxP}**. (A y B) Involución 24 horas (I24h), (C y D) Involución 48 horas (I48h) y (E y F) involución 72 horas (I72h). Ampliación: 400X. Escala de barra: 20μm, aprox.

Activación del factor de transcripción STAT3

Como mencionamos en la introducción, el inicio de la involución mamaria se caracteriza por un cambio en el patrón de fosforilación y activación de miembros específicos de la familia STAT: una disminución en los niveles de pSTAT5a y pSTAT5b y sus formas sin fosforilar y el marcado aumento de pSTAT3. Por esto, decidimos evaluar los niveles del factor de transcripción STAT3 fosforilado en glándulas mamarias 24h luego del destete, por medio de ensayos de inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de la proteína. En la Figura R 15 (A y B flechas) se exponen fotografías representativas de los cortes, donde se puede observar que la localización de la marca del anticuerpo es nuclear, lo que se condice con el estado fosforilado y activo del factor de transcripción. Esta marca fue cuantificada, contando aproximadamente 1000 células totales de las cuales se tuvo en cuenta la proporción de núcleos marcados respecto a los que no presentaban marca (Figura R 15 C). A partir de esto, pudimos determinar que 24h luego del destete las glándulas $TTP^{Cre/LoxP}$ presentan mayor porcentaje de núcleos marcados con pSTAT3, lo que nos estaría indicando que las glándulas doble transgénicas comienzan el proceso de involución antes que las glándulas controles.

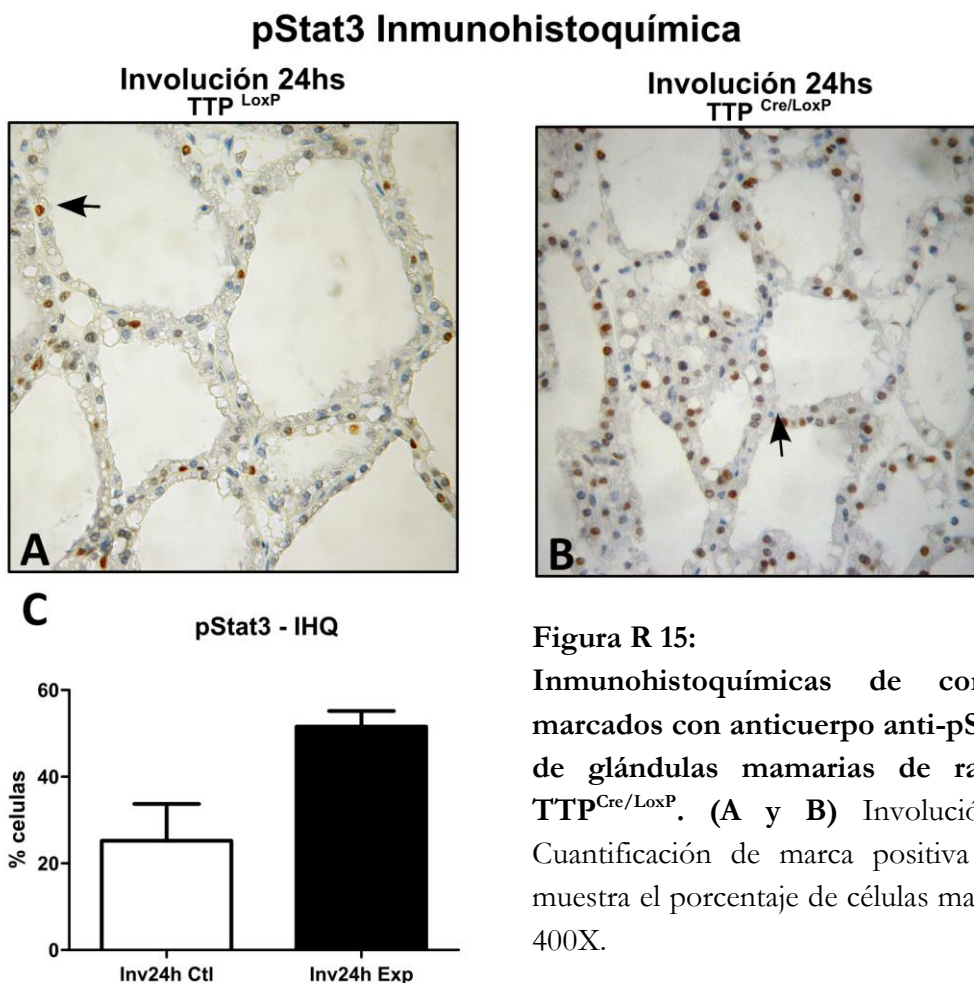


Figura R 15:

Inmunohistoquímicas de cortes histológicos marcados con anticuerpo anti-pStat3, provenientes de glándulas mamarias de ratonas TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$. (A y B) Involución 24 horas. (C) Cuantificación de marca positiva de anticuerpo; se muestra el porcentaje de células marcadas. Ampliación: 400X.

Caspasa 3 Clivada

Con el propósito de evaluar el efecto biológico que tendría una mayor fosforilación de STAT3 en las glándulas mamarias $TTP^{Cre/LoxP}$ al inicio de la involución, decidimos analizar la actividad de Caspasa 3 a las 24 horas del retiro de las crías mediante IHQ, utilizando un anticuerpo que reconoce la forma clivada de dicha Caspasa. Según puede observarse en la Figura R 16 (A y B), no se encontraron diferencias en la marcación entre los ratones TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$ a las 24 horas del destete en los distintos campos observados. Este mismo resultado fue observado 48 horas más tarde (3er día luego del destete) (Figura R 16 C y D).

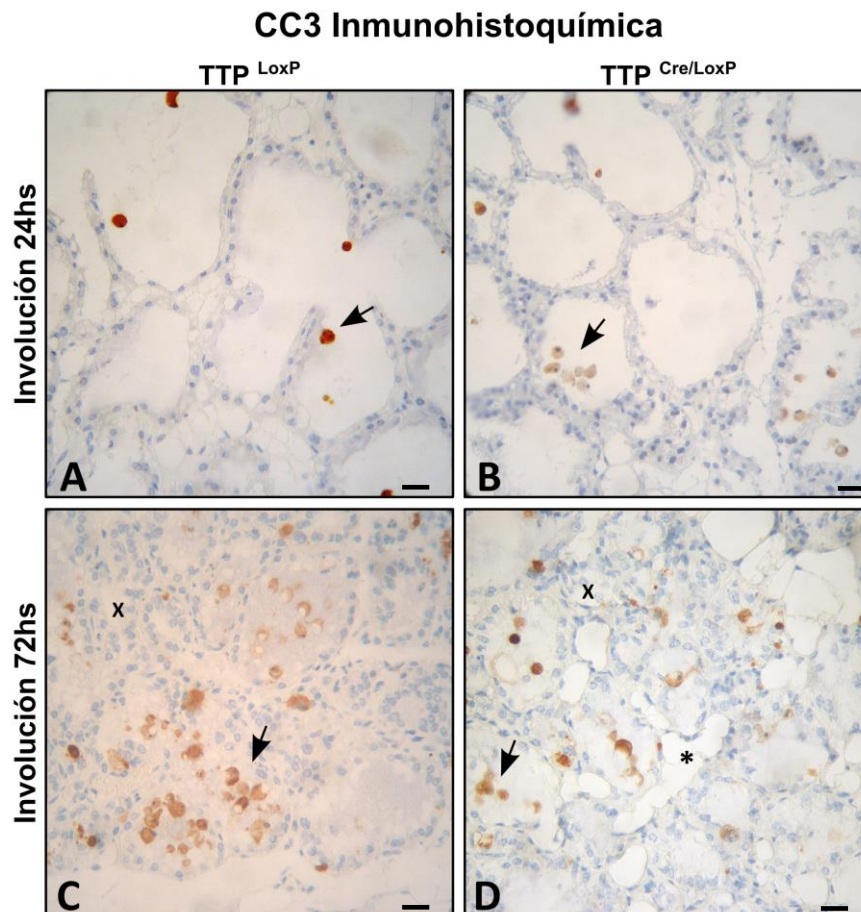


Figura R 16:

Inmunohistoquímicas de cortes histológicos marcados con anticuerpo anti-Caspasa 3 clivada, provenientes de glándulas mamarias de ratonas TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$. (A y B) Involución 24 horas. (C y D) Involución 72 horas. Flecha: marcaje positivo de anticuerpo. Asterisco (*): tejido adiposo. Equis (X): alvéolo colapsado. Ampliación: 400X. Escala de barra: 20 μ m, aprox.

Metaloproteasas

Durante la segunda fase de la involución mamaria se produce la mayor cantidad de muerte del epitelio secretorio debido, en parte, al aumento de la actividad de metaloproteinasas de matriz específicas (*MMPs*) que llevan a cabo el remodelado de la glándula (Lund et al., 1996). Se ha reportado que la expresión de algunas de las *MMP* es regulada por TTP. Para evaluar si la expresión de *MMPs* se encontraba alterada durante la involución se midió por *RT-qPCR* la expresión de las metaloproteinasas 2, 3, 9 y 12, los tiempos considerados de involución fueron, nuevamente 24, 48 y 72 horas. Se eligieron esas *MMP* porque *MMP2* y *MMP9* son blancos de TTP (Van Tubergen et al., 2011) y porque las cuatro se expresan durante la involución de la glándula, siendo *MMP3* y *MMP9* las más importantes durante este proceso (Lund et al., 1996; Van Tubergen et al., 2011). El análisis global de la expresión de las distintas *MMPs* consideradas en el estudio no evidenció que existieran diferencias significativas luego del destete por la ausencia de TTP durante la lactancia (Figura R 17).

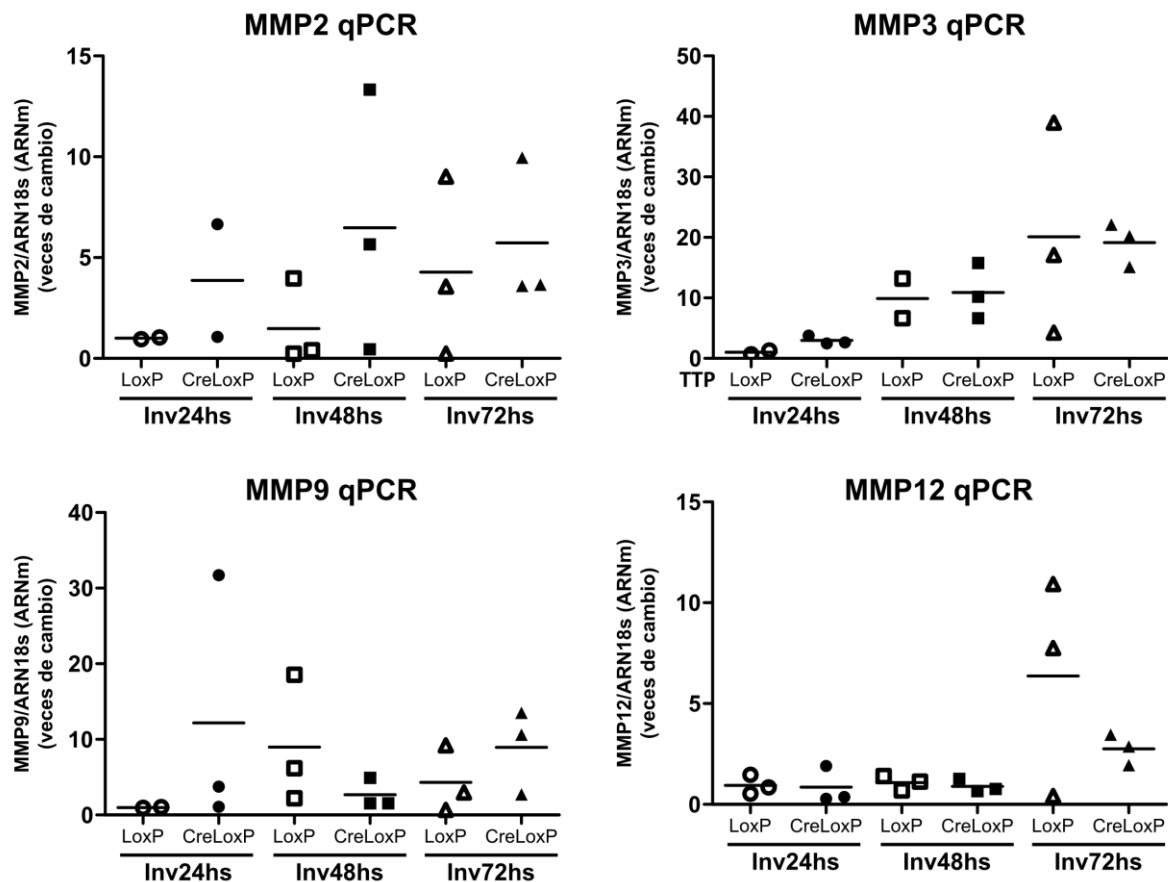


Figura R 17:

Expresión del ARNm de las *MMPs* 2, 3, 9 y 12 durante involución de la glándula mamaria en ratones *KO* condicionales para TTP. Valores relativizados a Involución 24 horas TTP^{LoxP}. Involución 24 horas (Inv24h), Involución 48 horas (Inv48h) e Involución 72 horas (Inv72h).

En síntesis, las muestras de glándulas mamarias obtenidas de hembras luego del destete indican que la ausencia de TTP durante la lactancia genera un pequeño adelanto en algunos procesos asociados a la muerte celular y al remodelado de la glándula mamaria. Sin embargo, a los 3 días luego del destete estas diferencias desaparecen y la involución progresa sin evidentes alteraciones en ratones experimentales y controles.

Efecto de la ausencia de TTP en la glándula mamaria durante la lactancia

El período de lactancia es el estadio de máxima diferenciación de la glándula mamaria y, en ratones, perdura por 3 semanas. Cuando se produce la falta prolongada de succión, debido a que las crías ya ingieren alimento sólido, la glándula comienza a involucionar. Los ratones bi-transgénicos que desarrollamos en el transcurso de esta tesis presentan la característica de que la enzima Cre-recombinasa comienza a expresarse hacia el final de la preñez y continúa durante toda la lactancia, ya que se expresa bajo dirección del promotor de la proteína de la leche WAP. Debido a esto, consideramos que los tiempos de lactancia que suelen tenerse en cuenta en la mayoría de los estudios en esta temática (7 a 10 días) podrían no ser suficientes para la expresión y actividad de dicha enzima. Por lo tanto, analizamos los efectos de la ausencia de TTP a lo largo de los 21 días de lactancia.

Cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina

Para evaluar cómo la delección de TTP afecta a la estructura histológica de la glándula mamaria durante la lactancia se analizaron cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina. En la Figura R 18 se puede observar que las glándulas de las hembras control (TTP^{LoxP}) presentan, durante lactancia, un desarrollo normal y completo. Particularmente, en las muestras tomadas a los 10 y 15 días luego del parto pudo observarse una alta densidad de estructuras alveolares en las cuales las células epiteliales que las revisten poseen forma irregular, moderadamente aplanadas con el núcleo en la región basal (Figura R 18 A y B). En las mamas provenientes de ratones hembras bi-transgénicas, partir del día 15, en la luz alveolar comenzaron a aparecer células muertas con características apoptóticas (Figura R 18 C y D, flecha). En cambio, a los 21 días de lactancia esta diferencia se pierde ya que tanto las glándulas TTP^{LoxP} como las TTP^{Cre/LoxP} muestran indicios del inicio de la involución: la densidad alveolar disminuye en ambos grupos, y se observa una mayor presencia de tejido graso entre alvéolos (Figura R 18 E y F).

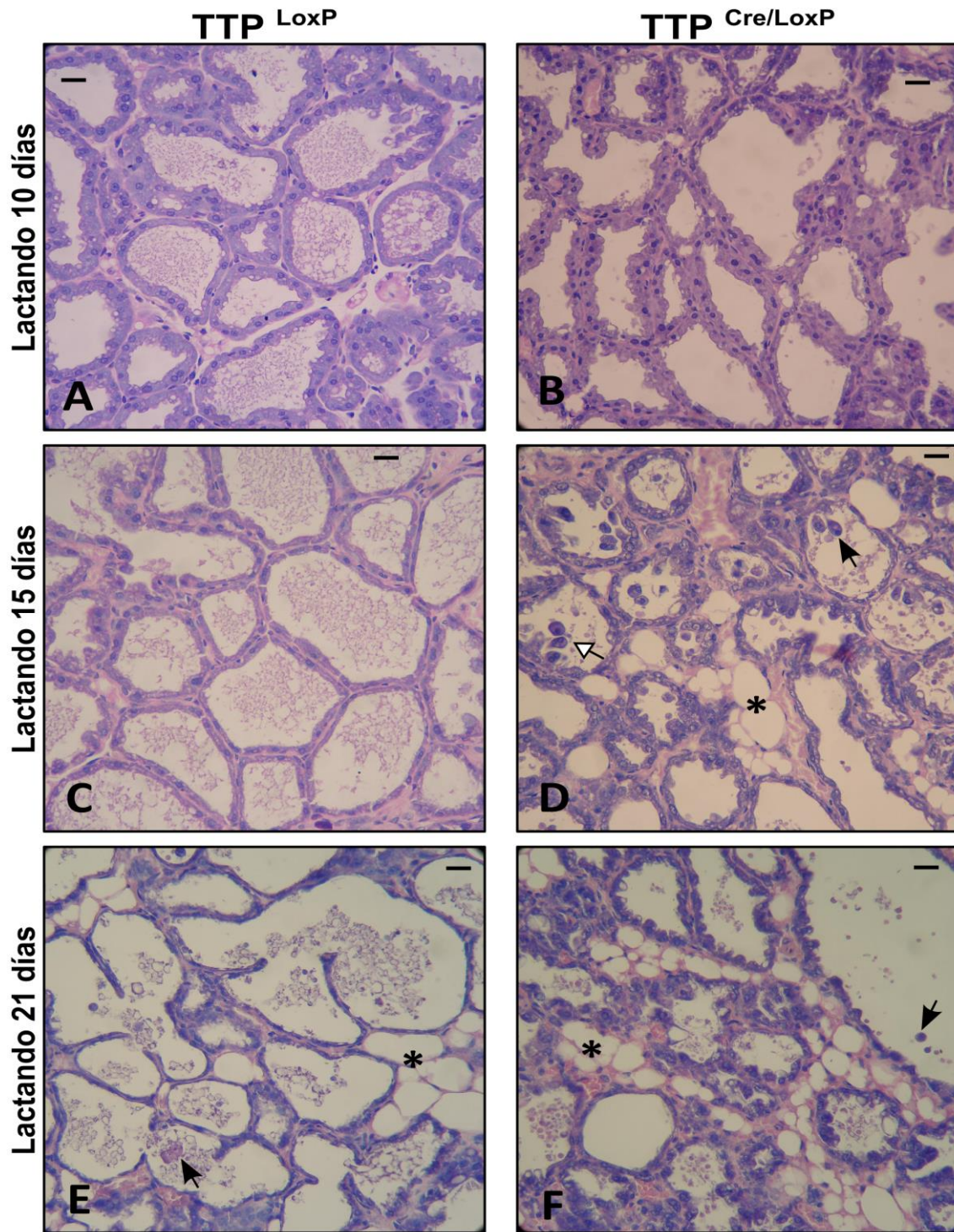


Figura R 18:

Cortes histológicos de Glándulas mamarias de ratonas TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$ durante lactancia teñidos con Hematoxilina y Eosina (A y B) Lactancia 10 días (L10d), (C y D) Lactancia 15 días (L15d) y (E y F) Lactancia 21 días (L21d). Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina. Ampliación: 400X. Escala de barra: 20 μ m, aprox.

Dado que las diferencias más evidentes entre las mamas de las hembras control y experimentales las hallamos a los 15 días de lactancia, nos enfocamos en analizar las muestras provenientes de ese tiempo con mayor profundidad (Figura R 19 B, C y D). En los animales experimentales, las células epiteliales que forman el revestimiento alveolar son menos aplanadas que en los controles, con aspecto festoneado y, en algunos casos, se observa el núcleo en posición central. Lo más llamativo en estas muestras resultó ser la tendencia a la descamación celular en la luz de los alvéolos (Figura R 19 B y C, flecha blanca). Se cuantificó la presencia de células descamadas y apoptóticas, contándose aproximadamente 1000 células totales de las cuales se tuvo en cuenta la proporción de células descamadas (células en lumen con tinción de núcleo heterogéneo) y células apoptóticas (núcleo hiper-picnótico y citoplasma con tinción homogénea), encontrándose que las glándulas provenientes de ratonas $TTP^{Cre/LoxP}$ presentan significativamente un mayor porcentaje de células descamadas ($p=0.0005$) y de células apoptóticas ($p=0.0258$) en comparación con las glándulas TTP^{LoxP} (Figura R 20). Estas observaciones indican que estas glándulas entraron en proceso de involución una semana antes de producirse el destete de las crías (a los 21 días).

Lactando 15 días

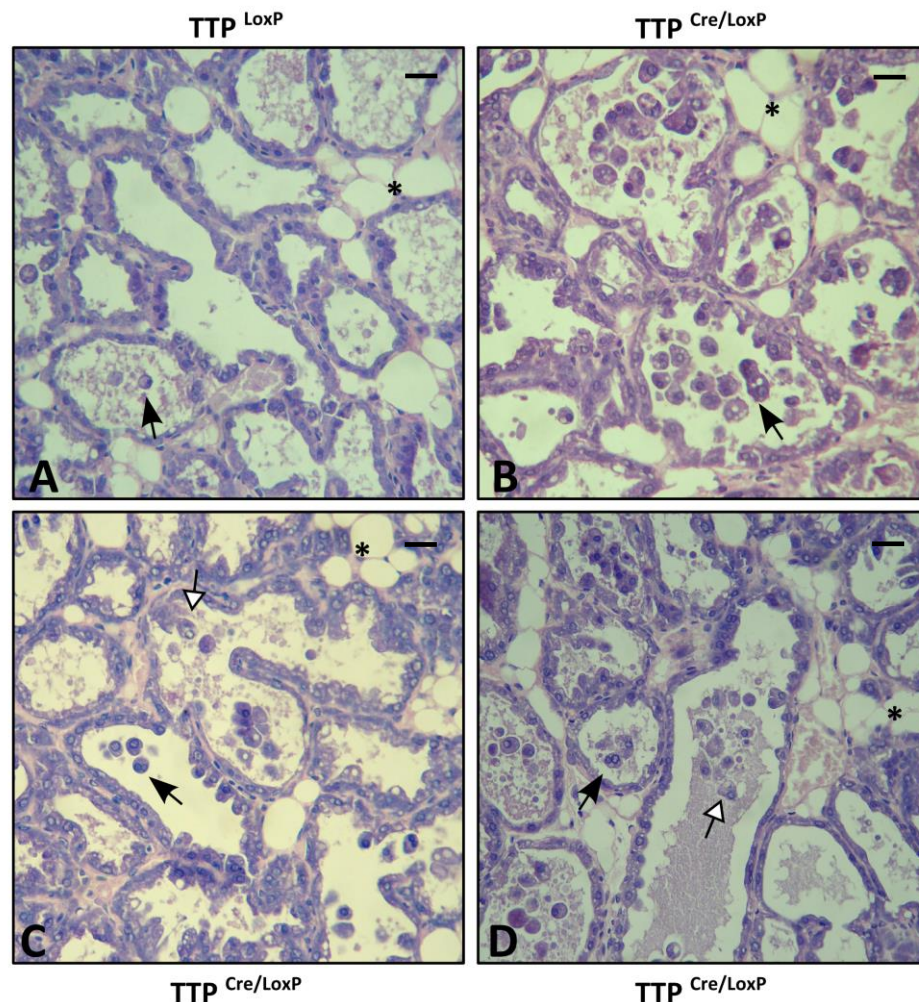


Figura R 19:
Cortes histológicos de
Glándulas mamarias
de ratonas TTP^{LoxP} y
 $TTP^{Cre/LoxP}$ durante
lactancia 15 días,
teñidos con H y E
(A) Glándula mamaria
 TTP^{LoxP} . (B, C y D)
Glándula mamaria
 $TTP^{Cre/LoxP}$.
 Ampliación: 400X.
 Flecha indica célula
 apoptótica; flecha con
 punta blanca indica
 células descamadas;
 asterisco (*) indica
 tejido adiposo.
(B) Escala de barra:
 20 μ m, aprox.

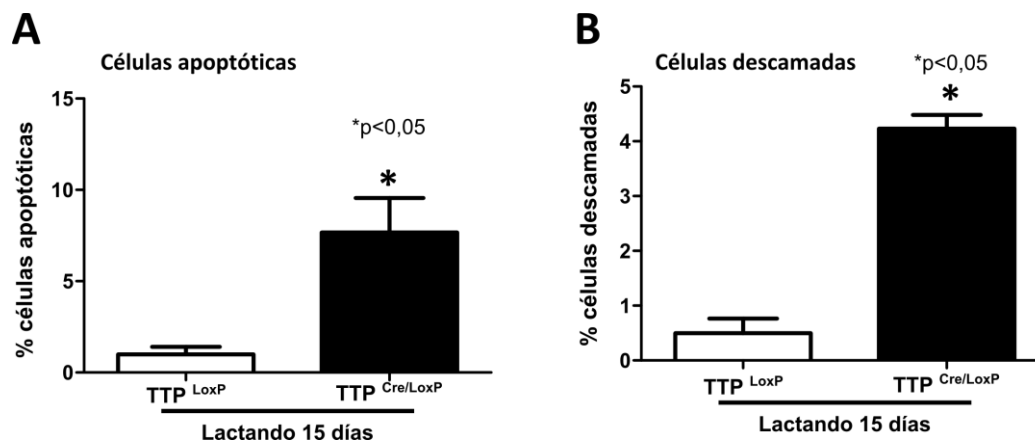


Figura R 20:

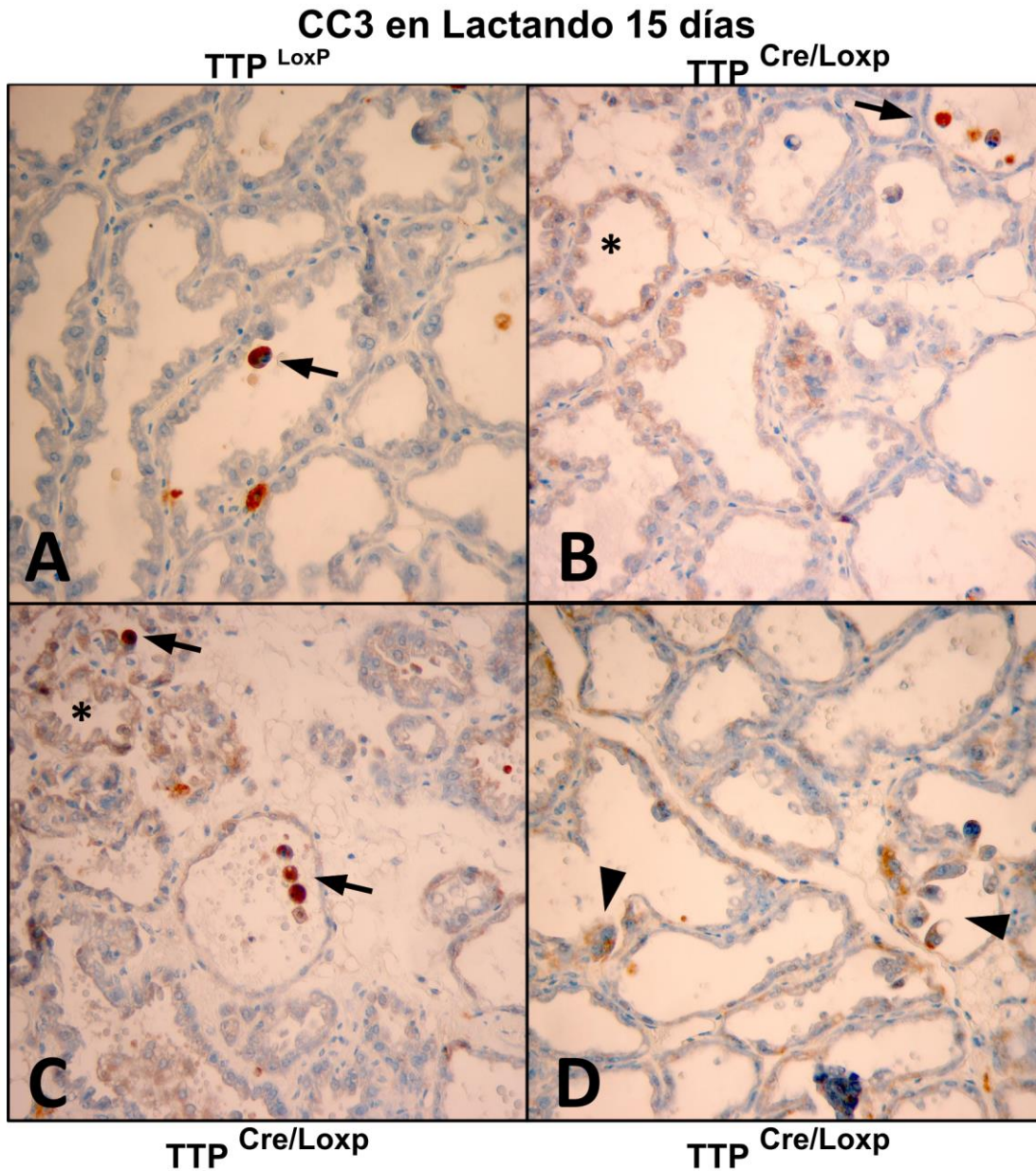
Cuantificación de células con morfología apoptótica y en proceso de descamación. **(A)** Porcentaje de células apoptóticas. **(B)** Porcentaje de células descamadas.

Caspasa 3 Clivada

Para confirmar que la glándula de las hembras bi-transgénicas se encontraban involucionando antes del destete, y que las células estaban muriendo por apoptosis, realizamos IHQ utilizando un anticuerpo anti Caspasa 3 clivada en cortes provenientes de hembras en estadio de lactancia de 10 o 15 días. Se observó que todos los cortes provenientes de glándulas TTP^{Cre/LoxP} presentaban marca positiva para CC3 (Figura R 21). La marca pudo observarse en el núcleo y citoplasma de las células que aún se encontraban adheridas a las paredes del alvéolo (Figura R 21 B y C, alvéolo marcado con una “X”), en el citoplasma de células con características morfológicas de apoptosis (Figura R 21 A, B y C, flecha), y en aquellas células que se estaban descamando (Figura R 21 C y D, cabeza de flecha). De esta forma, confirmamos que aquellas células que consideramos apoptóticas por sus características morfológicas se encontraban en proceso de muerte, al igual que las células descamadas o en proceso de descamación.

Figura R 21:

Inmunohistoquímicas de cortes histológicos marcados con anticuerpo anti-Caspasa 3 clivada, provenientes de glándulas mamarias de ratonas TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$ durante Lactancia 15 días. (A) Glándula mamaria de ratonas TTP^{LoxP} . (B, C y D) Glándula mamaria de ratonas $TTP^{Cre/LoxP}$. Flecha indica marcaje positivo de anticuerpo en células que presentaron morfología apoptótica; asterisco (*) señala células epiteliales aún pegadas al alvéolo, marcadas positivamente; cabeza de flecha indica células descamadas con marcaje positivo. Ampliación: 400X.



Activación del factor de transcripción STAT3

Al analizar el marcador de involución pSTAT3 por IHQ a los 10 y 15 días de lactancia no encontramos marca positiva en las glándulas de hembras TTP^{LoxP} (Figura R 22 A y B, y Figura R 23 A). Sin embargo, a los 10 días de lactancia pueden observarse algunos alvéolos con marca en las glándulas $TTP^{Cre/LoxP}$ (Figura R 22 C y D, flecha). La proporción de células teñidas aumenta a los 15 días de lactancia de manera drástica (Figura R 23 B, C y D, flecha). Se cuantificó la marca utilizando el método anteriormente mencionado y se encontró que aproximadamente el 30% de las células presentaron marcación positiva en las glándulas $TTP^{Cre/LoxP}$ con respecto a las TTP^{LoxP} (Figura R 24). Este resultado nos indica, entonces, que la muerte celular observada en el epitelio alveolar de las ratonas bi-transgénicas podría estar siendo desencadenada por el incremento de STAT3 fosforilado, tal como ocurre en las mamas de hembras salvajes luego del destete.

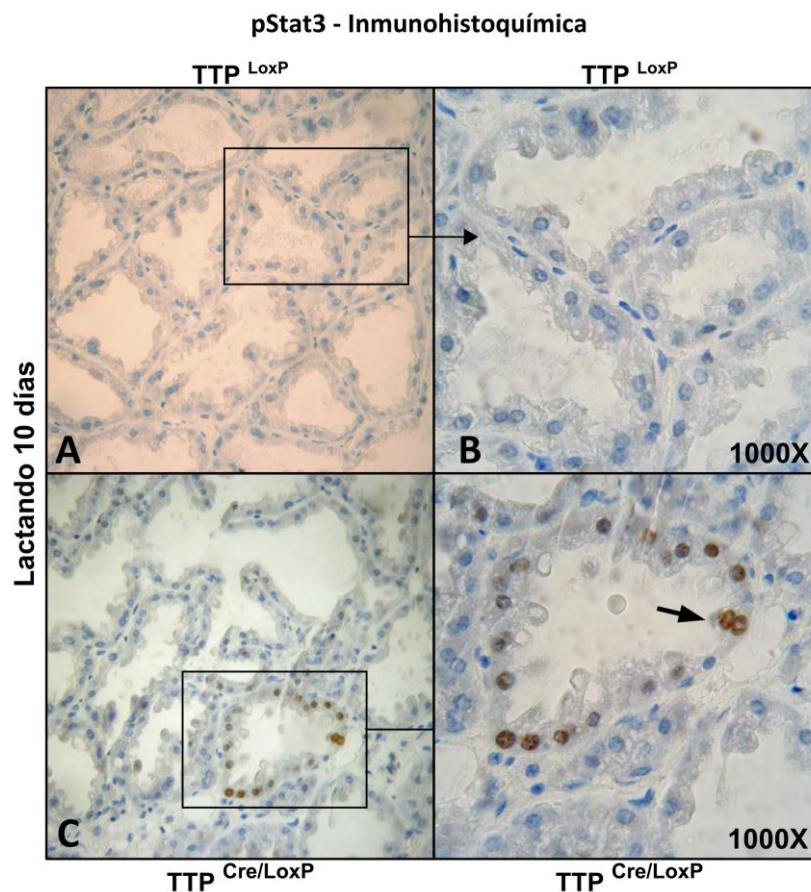


Figura R 22:

IHQ de cortes histológicos marcados con anticuerpo anti-pStat3, provenientes de glándulas mamarias de ratonas TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$ (A) lactancia 10 días de hembra TTP^{LoxP} , ampliación: 400X. (B) Ampliación: 1000X de sección recuadrada de (A). (C) Lactancia 10 días de hembra $TTP^{Cre/LoxP}$, ampliación: 400X. (D) Ampliación: 1000X de sección recuadrada de (C).

Figura R 23:

IHQ de cortes histológicos marcados con anticuerpo anti-pStat3, provenientes de glándulas mamarias de ratonas TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$. (A) lactancia 15 días de hembra TTP^{LoxP} , ampliación: 400X. (B y C) Lactancia 15 días de hembra $TTP^{Cre/LoxP}$, ampliación: 400X. (D) Ampliación: 1000X de sección recuadrada de (C). Flecha indica marca nuclear positiva para el anticuerpo.

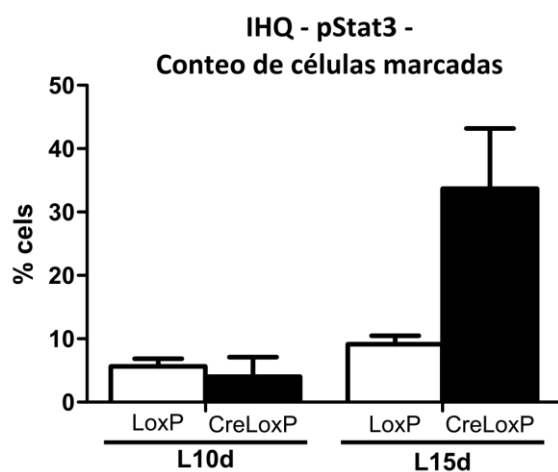
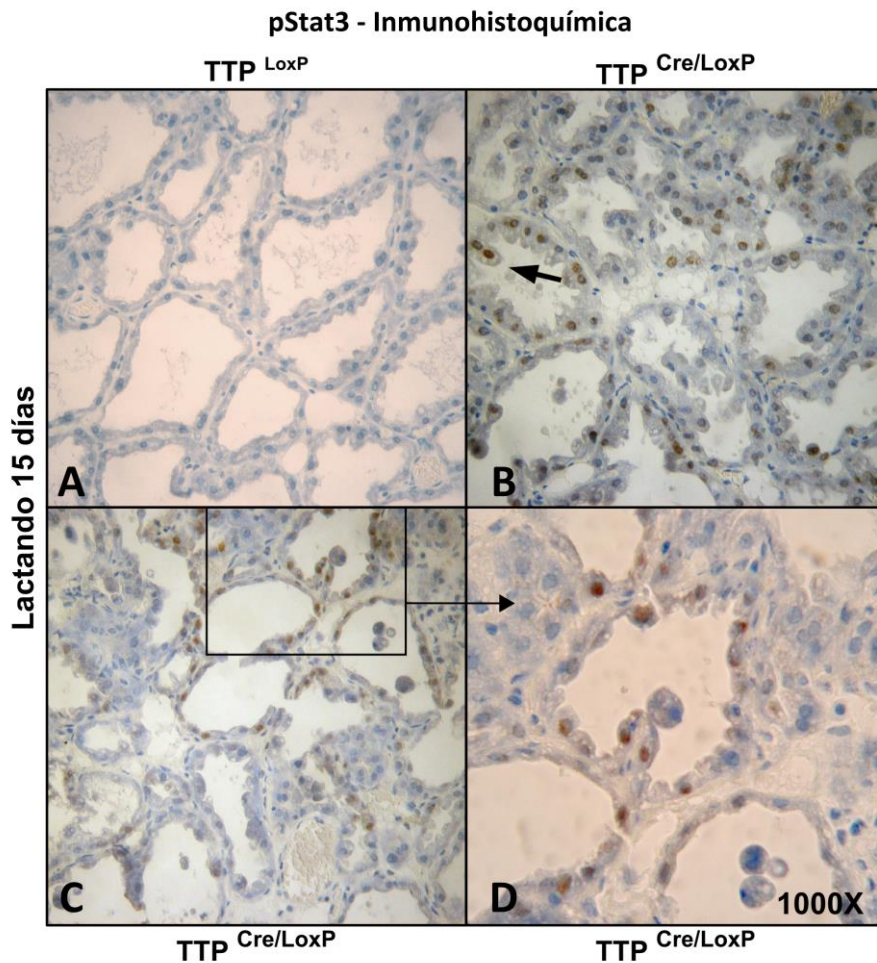


Figura R 24:

Cuantificación de marca positiva en las IHQ de pStat3 en glándulas mamarias de ratonas TTP^{LoxP} y $TTP^{Cre/LoxP}$ a los 10 y 15 días de lactancia; se muestra en porcentaje de células marcadas.

Citoquinas pro-Inflamatorias

En ratones normales, el aumento de pSTAT3 se debe fundamentalmente a la expresión local de la citoquina LIF (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003). Además de ésta, otras citoquinas inflamatorias, como TNF α son marcadores tempranos de involución (Clarkson et al. 2007). Por otro lado, el ARNm de TNF α es blanco preferencial de la actividad de TTP (Lai et al., 1999), así como los de Interleuquina 6 (Il6) (Grivennikov and Karin, 2011; Zhao et al., 2002). La citoquina Oncostatina M (OSM), en cambio, se expresa a partir de las 48 horas post-destete y su transcripción es regulada por pSTAT3 (Tiffen et al., 2008). Por lo tanto, teniendo todo esto en cuenta, analizamos por *RT-qPCR* si los niveles de expresión de las citoquinas mencionadas se veían afectados por la ausencia de TTP en la mama durante la lactancia. Los resultados indican que en el caso de OSM se observó un incremento de expresión a los 10 días de amantamiento en las hembras experimentales, comparadas con las controles. En el resto de los casos (TNF α , LIF e IL6) se produjo un aumento significativo (respectivamente: $p=0,0401$ – $p=0,0344$ – $p=0,0315$), aunque más tardío (15 días), en las mamas de las hembras bi-transgénicas comparadas con glándulas controles en los mismos tiempos (Figura R 25).

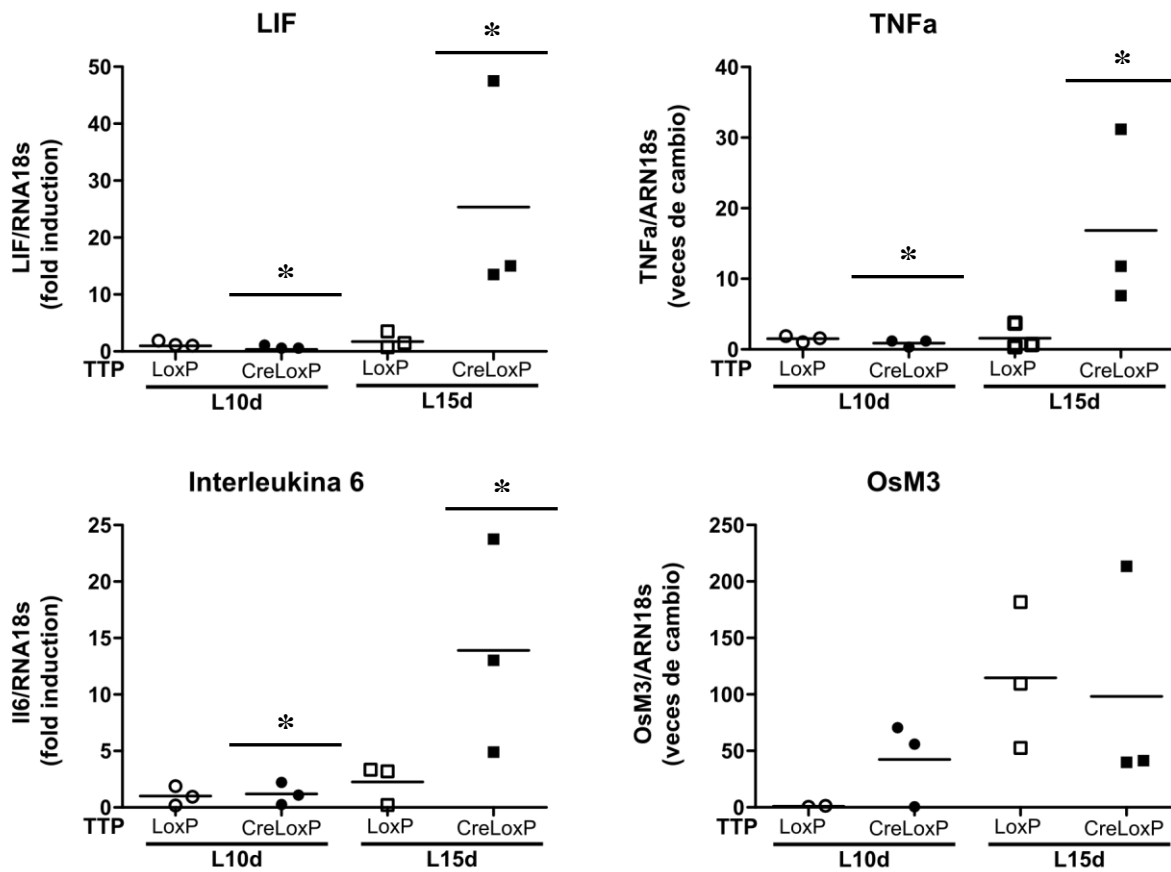


Figura R 25:

Expresión de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias en glándulas mamarias en ratones *KO* condicionales para TTP durante el período de lactancia. Valores relativizados a lactancia 10 días de TTP^{LoxP}. (*p<0,05)

En conjunto, estos resultados nos indican que, durante la lactancia, en las glándulas provenientes de ratonas TTP^{Cre/LoxP} se genera espontáneamente la secuencia de eventos asociada a la involución temprana que normalmente se desencadena luego del destete esto es: expresión de citoquinas inflamatorias, activación de Stat3 y muerte celular.

DISCUSIÓN

Tristetraprolina es una proteína de dedos de Zinc que reconoce secuencias ricas en uracilo y adenina presentes en la región 3' no traducible de algunos ARNm provocando primero la deadenilación de los transcriptos y luego su degradación. Desde su aislamiento y caracterización la mayoría de los estudios de funcionalidad de TTP se han llevado a cabo en macrófagos activados durante la respuesta inmune primaria. Es por esto que, en principio, se denominó a este gen como un gen de respuesta temprana ya que comenzaba a expresarse poco tiempo después de iniciada la respuesta inmune primaria. Se determinó así que la función primaria de esta proteína era la de suprimir la expresión de la citoquina TNF α para evitar una respuesta inmune exacerbada (Taylor et al., 1996).

En los últimos años se ha demostrado que la expresión de TTP se suprime en muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama (Brennan et al., 2009). Estudios recientes de expresión de TTP en tumores humanos y líneas celulares tumorales sugieren que esta proteína puede funcionar como un supresor tumoral en diversos contextos neoplásicos (Brennan et al., 2009; Carrick and Blackshear, 2007). En la primera parte de este trabajo nos enfocamos en caracterizar el patrón y posibles mecanismos de regulación de la expresión de TTP en células mamarias humanas normales y tumorales. En la segunda parte, en cambio, nos enfocamos en estudiar el rol biológico de TTP durante el desarrollo y funcionamiento de la glándula mamaria normal.

Análisis de la expresión de TTP en tumores de mama

La bibliografía sugiere que la disminución de la expresión de TTP es un buen indicador de mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, aún está en discusión si medir la expresión del ARNm de TTP es o no una buena técnica diagnóstica para determinar la malignidad de un tumor. El análisis de los resultados obtenidos durante esta Tesis sugiere que el valor de este factor como marcador pronóstico parecería depender de que el análisis se lleve a cabo en función de los niveles de su ARNm o de la proteína (Figura R 1). Griseri et al. indicaron que es el nivel de la segunda y no del primero lo que permite predecir la agresividad de un cáncer mamario (Griseri et al., 2011). Nuestros resultados apoyarían esa postura. El análisis de los datos de microarreglos, derivados de tumores clasificados de acuerdo a los cinco subtipos genómicos intrínsecos, muestra que niveles más altos de ARNm de TTP se encuentran en carcinomas "Normal-like". Este subtipo se caracteriza por una expresión relativamente alta de muchos genes expresados en el epitelio mamario normal. Sin embargo, la supervivencia y el tiempo libre de recaída son menores en esta categoría que en el subtipo Luminal A. Además, tumores clasificados como Luminales A y Basales mostraron niveles similares de ARNm de *Zfp36* (TTP)

aunque el pronóstico de los primeros es mucho mejor que el de los segundos (Lonning et al., 2001; Sorlie et al., 2003).

Nuestro análisis de librerías de SAGE, que incluye muestras de mamas normales, muestra una correlación negativa entre los niveles de ARNm de TTP y el fenotipo tumoral. Sin embargo, corroborando que los niveles bajos de ARNm de TTP no son necesariamente indicativos de comportamiento tumoral maligno, no hubo diferencias significativas entre carcinomas *in situ* y carcinomas invasivos. Además, el análisis por *RT-qPCR* del tejido normal adyacente a los carcinomas mostró menores niveles en el ARNm de TTP que en las mamas sanas, lo cual sugiere que factores secretados por un tumor pueden inhibir la expresión de este gen aún en células mamarias no-neoplásicas (Figura R 1).

Brennan et al. mostraron una correlación negativa significativa entre el grado tumoral y el nivel de ARNm de TTP (Brennan et al., 2009), lo cual parecería contradecir las afirmaciones de los párrafos anteriores. Sin embargo, hay que considerar que el grado tumoral sólo clasifica carcinomas invasivos y no incluye otro tipo de lesiones mamarias (Elston and Ellis, 1991). Por lo tanto, es posible que entre los carcinomas invasivos, los de Grado 1, más benignos, expresen niveles de ARNm de TTP más altos que las lesiones más agresivas de Grado 3. De manera similar, nuestros resultados muestran que utilizando la clasificación de “fenotipo intrínseco”, encontramos que los tumores Luminales B, que tienen peor pronóstico que los clasificados como Luminales A (Sorlie et al., 2001), expresan menores cantidades de ARNm de TTP (Figura R 2)

Se ha reportado que los subtipos más agresivos de cáncer de mama podrían tener una baja eficiencia de traducción de TTP por la presencia de ciertas variantes alélicas del gen (Griseri et al., 2011). Esto explicaría la mayor correlación del nivel proteico, que del ARNm, de TTP con el mejor pronóstico del tumor. Sin embargo, puede plantearse que en ausencia de estas variantes alélicas, la malignidad del tumor podría correlacionar negativamente con los niveles de ARNm transcritos a partir de este gen.

Los datos obtenidos muestran que es posible detectar la presencia de TTP por inmunohistoquímica en biopsias de tumores mamarios humanos. Dado que el análisis de marcadores tumorales por esta técnica es uno de los abordajes más comunes para pronosticar la evolución de la enfermedad, y teniendo en cuenta la correlación negativa de la expresión de esta proteína con la agresividad del cáncer mamario, proponemos que esta forma de detección de TTP podría ser útil para un pronóstico más acertado de esta enfermedad.

Nuestros resultados indican que la asociación entre la diferenciación y la expresión mamaria de TTP no se limita a las células neoplásicas y normales de mama humanas. Una

relación similar se encontró en la glándula mamaria de ratón (Figuras R 3 y R 4), en base a esto, proponemos que la función de TTP en la glándula podría estar conservada en ambas especies, permitiéndonos estudiar su rol biológico en el modelo de ratón.

Análisis de la expresión de TTP en la glándula mamaria normal murina

La glándula mamaria es un órgano especializado en la síntesis y secreción de leche necesaria para la supervivencia de las crías. Esta glándula resulta un sistema muy conveniente para el estudio de la organogénesis debido a que su desarrollo es gradual y ocurre principalmente durante la pubertad y la preñez. Además, es de fácil manipulación, es un órgano no-vital y tiene la capacidad única de involucionar y regenerarse durante sucesivos ciclos de preñez y lactancia (Masso-Welch et al., 2000).

Las células epiteliales mamarias experimentan ciclos periódicos de crecimiento y desarrollo, diferenciación y apoptosis correspondientes a los estadios fisiológicos de preñez, lactancia e involución. Varias hormonas y factores de crecimiento ejercen efectos positivos y negativos para regular finamente estas transiciones. Durante la diferenciación de la glándula mamaria, las hormonas lactogénicas y los factores locales activan proteínas específicas de diversas cascadas de transducción de señales que llevan a alteraciones de los perfiles de expresión génica. Estos estímulos inducen el arresto de la proliferación celular, por reducción de la expresión de genes que codifican para proto-oncogenes y genes del ciclo celular, y la producción de proteínas de la leche.

Los resultados de la Tesis de Licenciatura de la Dra. Victoria Slomiansky muestran un significativo aumento en la expresión de TTP en la mama durante el período de lactancia con respecto a los estadios de hembra virgen, preñada o durante la involución que se produce luego del destete (Figura R 5).

En base a estos resultados nos propusimos estudiar la función de TTP durante los diferentes estadios de la glándula mamaria y para esto utilizamos como modelo experimental la glándula mamaria de ratón.

Efecto de la delección de TTP durante el desarrollo puberal de la glándula mamaria (formación de red de conductos)

Como se mencionó en la introducción, durante la pubertad comienza el desarrollo del árbol de conductos de la glándula. Para que este proceso se lleve a cabo son de fundamental importancia las interacciones que ocurren entre el epitelio de la glándula con las células que

componen el estroma (Gouon-Evans et al., 2002; Van Nguyen and Pollard, 2002). Se ha observado que macrófagos y eosinófilos juegan un papel fundamental durante la invasión de los conductos en la almohadilla de grasa.

Para estudiar la influencia de la expresión de genes en el epitelio durante esta etapa existen diferentes abordajes, siendo las más utilizadas aquellas técnicas de ingeniería genética donde se suprime la expresión del gen de interés en todo el cuerpo del animal (*KO-Total*) o de manera tejido específica (*KO-Condiciona*l). Una técnica alternativa para estudiar el impacto de la delección de genes en la glándula durante el desarrollo de los conductos en un microambiente salvaje/normal es la de trasplante de mama. Esta técnica se basa en que el órgano mamario puede reconstituirse a partir del trasplante de una porción de glándula proveniente de un ratón donante dentro la almohadillas de grasa mamaria de un ratón huésped. El éxito de esta técnica se debe a varias características del desarrollo del órgano. En primer lugar, la glándula mamaria se desarrolla después del nacimiento en un tejido que es muy accesible a la intervención quirúrgica. En segundo lugar, la glándula pre-puberl (antes de la 3era semana de vida) está confinada dentro de una pequeña porción de la almohadilla de grasa mamaria que se remueve fácilmente para establecer una "almohadilla de grasa libre de glándula mamaria del hospedador", que acepta fácilmente el tejido exógeno singeneico. Por último, la glándula mamaria contiene una población de células madre adultas altamente regenerativas que puede reconstituir el órgano entero luego del trasplante.

Para el estudio del desarrollo de la glándula mamaria durante la pubertad en ausencia de TTP contábamos con ratones *KO-Total*. La característica principal de este animal es que presenta un síndrome serio de inflamación y autoinmunidad que afecta su correcto desarrollo y en consecuencia la posibilidad de preñez y del completo desarrollo de la glándula mamaria (Taylor et al., 1996). Por lo tanto, nos valimos de la técnica de trasplante de mama para evaluar el efecto de la delección de TTP durante el desarrollo de la red de ductos y las estructuras alveolares de la mama y así descartar posibles efectos del estroma en el desarrollo de la glándula. Los resultados obtenidos indican que la ausencia de TTP en el epitelio, ante un estroma normal, afecta la formación de los conductos de la glándula mamaria (Figura R8).

Es interesante destacar que el desarrollo de la glándula mamaria proveniente de los ratones TTP-*KO* es similar a aquellas obtenidas de ratones criados en un ambiente más restrictivo en cuanto a espacio y estímulos comportamentales, aunque nuestro modelo presenta anomalías más notorias (Nachat-Kappes et al., 2012). El grupo de investigación de Nachat-Kappes estudió las influencias de un hábitat de cría enriquecido (jaulas amplias complementadas con rueda para correr, túneles y diferentes juguetes) o pobre sobre el desarrollo de la glándula

mamaria. Estos autores proponen que el ambiente en el que viven los animales influencia el desarrollo de la glándula mamaria. Las condiciones de vida más estresantes generarían un microambiente tisular inflamatorio (evidenciado por la sobreexpresión de Cox-2) y esto provocaría un pobre desarrollo en la red de conductos mamarios. En este sentido, es posible que el déficit de TTP en las mamas de hembras vírgenes genere un fenotipo similar al favorecer un aumento en los niveles de Cox2 y otros factores pro-inflamatorios

El ARNm del gen Cox-2 es un blanco conocido de TTP. En tumores el aumento de la expresión de Cox-2 correlaciona negativamente con la expresión de TTP (Boutaud et al., 2003). En nuestro modelo de estudio, la ausencia de TTP podría estar contribuyendo a la formación de un microambiente pro-inflamatorio al permitir la expresión de Cox-2 y de otros mensajeros blanco correspondientes a citoquinas pro-inflamatorias como TNF α e Il6 (Carballo et al., 1998; Van Tubergen et al., 2011).

El microambiente en el que se desarrolla el epitelio mamario es un componente fundamental para el correcto desarrollo de la glándula. Existen distintas evidencias que indican que un ambiente pro-inflamatorio no permitiría el correcto desarrollo de los conductos. La interacción entre estroma y conductos es un proceso dinámico, donde ambos componentes pueden contribuir en la formación del microambiente pro-inflamatorio (Kamikawa et al., 2009; Subbaramaiah et al., 2011). El trabajo realizado por el grupo de Nachat-Kappes es un claro ejemplo de cómo el estroma puede ser influenciado por los conductos de la glándula mamaria. Es por esto que sería necesario llevar a cabo más estudios de las glándulas mamarias de los ratones TTP-KO, para poder comprender mejor cuál sería el aporte del TTP de origen epitelial en la morfogénesis del órgano.

Regulación de la transcripción de TTP en la diferenciación mamaria

La conspicua presencia de TTP en el epitelio de la glándula mamaria durante la lactancia, nos sugirió que la expresión de esta proteína podría estar modulada por factores mamarios específicos. Para poner a prueba esta hipótesis, comenzamos a trabajar con la línea celular epitelial mamaria normal HC11 que responde a las hormonas lactogénicas prolactina (PRL) y glucocorticoides, y en consecuencia presenta diferenciación lactogénica (Ball et al., 1988; Danielson et al., 1984).

Se ha reportado que los glucocorticoides inducen aumento en la expresión de TTP en células epiteliales de pulmón (Smoak and Cidlowski, 2006). Es interesante destacar que nuestro grupo encontró previamente (Tesis de Licenciatura de Victoria Slomianski) que el glucocorticoide sintético dexametasona (Dex) produce también este efecto en células mamarias

HC11 proliferando, mientras que cuando las mismas llegan a confluencia y se hacen competentes para desarrollar el programa lactogénico, la PRL resultó más relevante que los glucocorticoides para la inducción estable de TTP (Figura R 5) (Goddio et al., 2012).

En la mama normal, la PRL induce diferenciación terminal de células epiteliales mamarias y síntesis de componentes de la leche durante la lactancia a través de la activación de la cascada de Jak2/STAT5 (Ormandy et al., 2003; Watson and Burdon, 1996). Nuestros resultados muestran que esta hormona, con o sin Dex, indujo la activación del promotor de TTP en células HC11 competentes y esta actividad fue bloqueada por el agregado de un mutante dominante negativo de STAT5a (Figura R6). Por lo tanto, al menos parte de la actividad de la PRL sobre la expresión endógena de TTP en células mamarias diferenciadas se debería probablemente a la interacción de STAT5a con secuencias del promotor murino de TTP. Curiosamente, en mastocitos, STAT5 media la represión de TTP (Barnstein et al., 2006), lo cual contrasta con la capacidad de STAT6 o STAT3 de inducir su expresión (Joe et al., 2011; Suzuki et al., 2003). Por lo tanto, los factores de transcripción de la familia STAT podrían reclutar co-activadores o co-represores al promotor de TTP, dependiendo del tipo celular y/o del estadio fisiológico, lo cual permitiría la generación de una respuesta celular apropiada en situaciones tisulares específicas.

La capacidad de la PRL de inducir una expresión estable de TTP parece esencialmente asociada con la diferenciación lactogénica. De hecho, PRL no fue capaz de inducir la transcripción de TTP en células HC11 proliferando y en células cancerosas como T47D lo hizo sólo de manera momentánea, independientemente de la cascada JAK2-STAT5 (Figura R7). La rápida inducción observada en esta línea celular es consistente con reportes previos que describen a TTP como el producto de un gen de respuesta temprana inmediata (ZFP36) que se induce rápidamente en distintos tipos celulares por varios estímulos diferentes, después de la cual los niveles de ARNm de TTP retornan a los niveles basales rápidamente (DuBois et al., 1990; Lai et al., 1990; Mittelstadt and Ashwell, 2003; Ogawa et al., 2003). Por lo tanto, concluimos que en el epitelio mamario normal la expresión de TTP es regulada de manera específica y diferencial.

Efecto de la delección de TTP durante la lactancia. Ratones TTP-KO condicionales

La glándula mamaria debe sintetizar cantidades muy elevadas de proteínas específicas en un lapso determinado: el período de amamantamiento; por lo tanto, resulta necesario que en este tejido existan mecanismos para encender y apagar la expresión de los ARNm que codifican para las proteínas de la leche en respuesta a cambios a nivel tanto de hormonas circulantes como en el microambiente tisular. Un ejemplo clave es la regulación de β -caseína: luego del agregado de prolactina, los niveles de ARNm de β -caseína se elevan 70 veces, mientras que la tasa de

transcripción sólo se incrementa de 2 a 4 veces (Guyette et al., 1979). Esto sugiere que el ARNm de β -caseína debe ser estabilizado para que el amamantamiento sea exitoso.

Nagaoka y colaboradores han demostrado que la estabilidad del ARNm de β -caseína está regulada por un complejo ribonucleoproteico. Durante la lactancia, bajo regulación hormonal, se sintetizan moléculas del mensajero de este gen con largas colas de poli-A. PABP se asocia con las moléculas de HuR ancladas en la región 3'-UTR, resultando en una estructura protectora del sistema de degradación de transcritos (Nagaoka et al., 2006). Estos hallazgos demostraron que existen mecanismos post-transcripcionales para el mantenimiento de altos niveles del ARNm de β -caseína durante la lactancia.

Otro reporte también vincula el control post-transcripcional mediado por AUBPs con la diferenciación de la glándula mamaria (Nagaoka et al., 2007). En este caso, se encontró que en células epiteliales mamarias HC11, la estimulación con hormonas lactogénicas disminuye el nivel de AUF1 citoplasmático y aumenta el nivel de AUF1 nuclear, sugiriendo una participación de dicha proteína en el proceso de diferenciación de la glándula mamaria bajo el control de las hormonas lactogénicas.

Efecto de la delección de TTP durante la lactancia en la involución forzada de la glándula mamaria

Al producirse el destete, se inicia el proceso de involución mamaria que, como se mencionó previamente, comprende la muerte del epitelio secretorio por apoptosis y el remodelado de la glándula. Como modelo experimental para el estudio de este estadio, se utilizan hembras a las que se les retiran las crías luego de 7-10 días de lactancia, lo que genera una involución sincronizada donde se postula que ocurren los mismos eventos que en la involución natural (Quarrie et al., 1996).

Los ligandos de receptores de muerte que pertenecen a la familia del TNF α (incluyendo él mismo) son inducidos en las mamas de ratones hembras en las primeras 12 horas del destete y son relevantes en el proceso de involución (Baxter et al., 2006; Clarkson et al., 2004). Nuestro grupo ha demostrado que TNF α es capaz de inducir LIF, una de las principales citoquinas durante el proceso de involución post-lactancia, en células epiteliales mamarias (Schere-Levy et al., 2003). Con la inducción de LIF se activa la vía JAK/STAT3, siendo éste el principal responsable de la señalización durante la involución.

Debido a que TTP regula principalmente la expresión de TNF α , nos preguntamos si la expresión de TTP durante la lactancia previene una involución prematura de la glándula del

tejido. De ser así, las glándulas que no expresen TTP tendrían el proceso de involución adelantado luego del destete, con respecto a las glándulas que lo expresan normalmente. Para responder esta hipótesis estudiamos glándulas mamarias provenientes de hembras TTP^{LoxP} y TTP^{Cre/LoxP} a distintos tiempos luego del retiro de las crías: 24 horas (I24h), 48 horas (I48h) y 72 horas (I72h).

Analizamos distintos marcadores de involución para determinar si el proceso se encontraba adelantado en el tiempo en aquellas mamas provenientes de ratonas TTP-KO-condicional. La fosforilación del factor de transcripción STAT3 por distintos factores locales determina el inicio del proceso de involución (Chapman et al., 1999). Luego comienza la muerte celular del epitelio mamario principalmente a través del proceso de apoptosis, por reclutamiento y activación de la Caspasa iniciadora 8 y finalmente la activación de las Caspasas efectoras 3 y 9 (Hengartner, 2000). Por último, aproximadamente a partir de las 72h de involución, se inicia el remodelado de la glándula debido al aumento de la actividad de metaloproteasas específicas de matriz (MMPs) (Lund et al., 1996).

Los resultados muestran el análisis por inmunohistoquímica de la fosforilación de STAT3 a las 24 horas de retiradas las crías. Se observa que las glándulas mamarias provenientes de ratones TTP-KO-condicional presentaban mayor proporción de células marcadas con respecto a los controles (Figura R 15). En consecuencia, estas glándulas podrían estar adelantadas en el proceso de involución. Sin embargo, cuando observamos muerte celular por apoptosis, también por inmunohistoquímica y utilizando un anticuerpo anti-Caspasa 3 clivada, se observó marca positiva para el anticuerpo pero no se encontraron diferencias entre los grupos muestrales (Figura R17). Esta divergencia entre los niveles de pSTAT3 y los de caspasa 3 clivada podrían explicarse por estudios recientes que indican que la muerte celular en los estadios tempranos de la involución requieren de la activación de dicho factor de transcripción, pero no necesariamente de la cascada clásica de apoptosis. Estos autores indican que la fosforilación de STAT3 favorecería el cambio de permeabilidad de lisosomas que llevaría a la muerte celular sin involucramiento de las caspasas efectoras (Kreuzaler et al., 2011).

Al comparar la expresión por ARNm de distintas MMPs de las mamas de controles con aquellas provenientes de hembras TTP-KO-condicional no se observaron diferencias relevantes (Figura R 17). Ambos grupos muestran la tendencia a aumentar la expresión de las distintas proteasas hacia las 72h con respecto a las 24h de involución. La capacidad de TTP de inhibir los niveles de diversas proteínas involucradas en el remodelado del tejido mamario y en la invasividad del cáncer de mama humano como uPA, uPA-R y MMP-1, ha sido previamente reportada, correlacionando con los bajos niveles de esta proteína hallados en carcinomas

mamarios invasivos (Al-Souhibani et al., 2010) así como también la de promover la degradación de los mensajeros de MMP2 y MMP9 en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Van Tubergen et al., 2011). Sin embargo, la ausencia de TTP durante la lactancia no parece ejercer un efecto relevante en el perfil de expresión de estas proteasas que normalmente ocurre durante el proceso de remodelado mamario post-destete.

También el análisis de la morfología mamaria luego del destete en los ratones experimentales y controles no reveló diferencias significativas atribuibles a la disminución de TTP durante la lactancia. Particularmente a las 72h de involución se observaron variaciones histológicas tanto dentro del grupo control como entre las muestras del grupo TTP-KO-condicional. Es necesario destacar que el aspecto de una glándula normal no es homogéneo; dependiendo de la porción que se observe pueden encontrarse pequeñas, pero notables, variaciones estructurales. Es la observación global de diferentes cortes provenientes de distintas regiones del órgano lo que va a determinar las características histológicas del mismo. Es por esto que el análisis histológico global incluyó no solo cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina, sino también aquellos cortes que se probaron con distintos anticuerpos.

El modelo de involución de glándula mamaria que utilizamos hasta aquí es un modelo de involución forzada, cuyo principal objetivo es el de sincronizar el inicio del proceso de involución con el retiro de las crías para obtener una similitud inicial de condiciones entre los grupos de prueba. Según Quarrie y colaboradores, en este modelo ocurren los mismos eventos que en la involución natural (Quarrie et al., 1996). Nuestras observaciones histológicas y los resultados moleculares obtenidos en los ratones TTP-KO condicional indican que la delección de TTP en las células epiteliales mamarias durante la lactancia no contribuye a la aceleración del proceso de involución forzada.

La ausencia de un efecto significativo en el TTP-KO condicional sobre la involución forzada puede ser atribuible a dos factores no excluyentes. En primer lugar, aunque la ausencia de TTP favorezca el inicio de la involución aún en presencia de las crías, el destete forzado posiblemente generó en ambos grupos (control y experimental) un estímulo mucho más intenso que la ausencia de TTP. Por lo tanto un posible inicio adelantado de la involución en los ratones experimentales, pudo haber sido rápidamente igualado, por las cascadas inducidas por el propio destete, en el grupo control. En segundo lugar, estos experimentos fueron diseñados antes de conocer el perfil de acción de la Cre-recombinasa en la mama lactante y sus efectos sobre la expresión de TTP. A la luz de nuestros resultados actuales, es posible que a los 7 días del parto (cuando se realizó el destete forzado) la actividad de esta enzima y/o las diferencias en los niveles

de TTP entre hembras experimentales y controles no hayan sido lo suficientemente relevantes para generar diferencias tisulares significativas luego del destete.

Efecto de la delección de TTP en la glándula mamaria durante la lactancia

La involución natural es desencadenada por la disminución paulatina en la frecuencia de ingesta de leche por parte de las crías, ya que éstas luego de aproximadamente 18 días de lactancia comienzan a ingerir alimento sólido además de la leche materna, provocando una disminución del volumen de leche producida acompañado del remodelado progresivo de la glándula (Quarrie et al., 1996). Nuestra hipótesis para los estudios que ahora vamos a discutir es que si TTP es relevante para el mantenimiento de la lactancia, su ausencia debería adelantar el proceso de involución, antes del destete. Por esto, los estudios fueron realizados tomando las muestras a 10, 15 y 21 días luego del parto, sin retiro de las crías.

Como observación inicial encontramos que luego de 21 días de lactancia, las crías nacidas de hembras doble transgénicas, que no expresan TTP durante la lactancia, presentaban un menor peso comparadas con aquellas nacidas de las hembras controles (Figura R 11). Esto sugiere que las hembras experimentales producen leche en menor cantidad o calidad nutritiva. El menor tamaño de las mamas de este grupo apoyaría la primera opción. Por otro lado, los niveles de ARNm de β -caseína en glándulas provenientes de ratonas controles y TTP KO-condicional no presentaron diferencias significativas entre ellas aunque puede observarse una tendencia a la disminución de la expresión en las mamas TTP-KO a partir de los 15 días. Al contrario de lo observado para *WAP* donde sí se observaron diferencias significativas (Figura R 13). Esto sugiere que es posible que la calidad de la leche también haya sido afectada por los bajos niveles de TTP.

Llama poderosamente la atención la morfología de las células luminales de las mamas lactantes de las hembras KO condicionales de TTP. Se observa que éstas tienden a “desprenderse” de los contactos con las células vecinas y la membrana basal. Este efecto podría deberse a un incremento de la muerte celular. Sin embargo, las imágenes sugieren que este fenómeno se encuentra en células que aún no muestran típicas características apoptóticas (Figura R19). Debido a esto, creemos que es posible que la disminución de la expresión de TTP genere falta de adhesividad celular. Aunque desconocemos los posibles mecanismos subyacentes a este fenómeno, pueden proponerse algunas proteínas involucradas en adhesión celular cuya expresión podría ser regulada por TTP. Por ejemplo otro trabajo de nuestro laboratorio ha demostrado que el ARNm de la integrina b1 es blanco de HuR (Naipauer et al., 2013), una AUBP cuya expresión puede ser modulada por TTP (Al-Ahmadi et al., 2013), por lo cual el déficit de TTP podría estar alterando la expresión de esta proteína de adhesión.

En las células epiteliales mamarias de los ratones TTP *KO*-condicional puede observarse la fosforilación del factor de transcripción STAT3 a partir de los 10 días luego del parto que aumenta a los 15 días con respecto a los controles (Figura R 22, R 23 y R 24). Además, al analizar la presencia del marcador de apoptosis Caspasa 3 clivada en estas glándulas, encontramos tinción positiva a los 10 y 15 días de lactancia (Figura R 21). Lo que correlaciona positivamente con el aumento de células apoptóticas en el lumen alveolar observado en cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina (Figura R 19y R 20).

La fase temprana de la involución post-lactancia, se caracteriza por la expresión de factores locales que inducen la apoptosis del epitelio secretorio. Como se ha mencionado en la Introducción, la expresión de estos factores locales (LIF, Il6 y TNF α) es independiente de los niveles de hormonas lactogénicas circulantes por lo que se cree que es el estrés mecánico, producido por la acumulación de leche en los alvéolos, el estímulo inicial que dispara su expresión y secreción (Chapman et al., 1999; Quaglino et al., 2009). En trabajos anteriores se ha demostrado que LIF es el responsable fisiológico de la activación de la vía JAK/STAT3 en el epitelio mamario al inicio de la involución mamaria post-lactancia (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003). Asimismo, nuestro laboratorio también reportó que el estrés mecánico en células epiteliales mamarias provoca la síntesis y liberación de LIF (Quaglino et al., 2009) y de TNF α (Lic. Ana Romarowski, Tesis de Licenciatura) y además nuestro grupo demostró que este último induce la expresión de LIF en células epiteliales mamarias (Levy et al., 2010). Por lo tanto procedimos a analizar la expresión de estas citoquinas en el modelo aquí descrito. En las glándulas mamarias de ratonas TTP *KO*-condicional encontramos que tanto TNF α como LIF e Il6 se encontraban sobre-expresadas a los 15 días de lactancia con respecto al mismo tiempo en las mamas controles (Figura R 25). Esto nos estaría indicando que la ausencia de TTP provoca la formación de un microambiente pro-inflamatorio. Este mismo fenotipo, pero a nivel sistémico es lo que se observa en los ratones *KO*-total para TTP (Taylor et al., 1996). En estos ratones se observó la importancia de la expresión de TTP para el control de TNF α . A partir de los resultados de nuestro grupo que muestran que esta citoquina es capaz de inducir LIF en células epiteliales mamarias (Levy et al., 2010), podría postularse que es el incremento en TNF α el responsable del aumento de LIF y el consecuente incremento en pSTAT3 que lleva a la muerte de gran parte del epitelio secretorio en las mamas de los ratones TTP-*KO* condicionales. Necesitamos más experimentos para probar esta cadena de eventos.

Relevancia de los resultados obtenidos en el ratón TTP-KO condicional para el desarrollo del cáncer de mama

La involución luego de la lactancia es un proceso muy controlado, donde ocurre una rápida y extensa remodelación del tejido y que no está exento de riesgo. Los perfiles de expresión de citoquinas y *MMPs* durante la remodelación son similares a los observados durante el desarrollo de tumores de mama (Almholt et al., 2007; Clarkson and Watson, 2003; Clarkson et al., 2004; Stein et al., 2004). Si bien la involución post-lactancia se desarrolla sin consecuencias patológicas, la desregulación de la estructura del tejido y la formación de un microambiente pro-inflamatorio tumoral puede ayudar a facilitar el escape de células pre-malignas presentes en la glándula mamaria (Schedin, 2006). Esta posibilidad ha sido validada por experimentos donde se aísla la matriz extracelular (*ECM*) de las glándulas mamarias de hembras nulíparas o post-lactantes. Las *ECMs* provenientes de glándulas que habían sufrido procesos de remodelación (post-lactantes) facilitaban el desarrollo del fenotipo invasivo en células mamarias en cultivo e *in vivo* (Bemis and Schedin, 2000; McDaniel et al., 2006). A partir de estos experimentos se sugirió que el aumento de incidencia de cáncer de mama observada en mujeres poco después de su embarazo, se debería en realidad a procesos de remodelado que ocurren por la involución mamaria (Schedin, 2006). Esta ocurre indefectiblemente en las mamas de todas las mujeres que tienen un hijo, luego del parto (si no hay amamantamiento) o al finalizar la lactancia.

La inflamación durante la homeostasis normal protege el cuerpo contra patógenos, heridas y, en algunos casos, tumores. Sin embargo, las funciones llevadas a cabo por las células inflamatorias y los factores que secretan pueden también beneficiar la progresión tumoral. La exposición por largo tiempo a los mecanismos inflamatorios pueden alterar los patrones de expresión génica en las células, resultando en cambios del fenotipo celular que lleven a la displasia y luego al cáncer. Aproximadamente el 25% de todos los cánceres humanos son atribuidos a infecciones crónicas que causan inflamación y otros síndromes inflamatorios (Hussain and Harris, 2007). Cuando se habla de inflamación relacionada con el cáncer se hace referencia principalmente a macrófagos asociados al tumor, la presencia de factores inflamatorios (citoquinas: $TNF\alpha$, $IL1$, $IL6$; quemoquinas: $CCL2$ y $CXCL8$), remodelación de tejido y angiogénesis. En conjunto, aportan a la formación de un microambiente que puede ayudar en la transformación neoplásica y en la progresión tumoral (Colotta et al., 2009). En la asociación de la involución mamaria con el desarrollo tumoral, el aporte de citoquinas inflamatorias iniciales, luego del destete, sería de las mismas células epiteliales mamarias. Luego se daría el reclutamiento de macrófagos que colaborarían del proceso invasivo de existir células tumorales en la glándula (Schedin, 2006).

Los primeros estudios de TTP revelan su importancia en el mantenimiento del balance de los mecanismos de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la expresión de TTP puede ser inducida en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio, como los lipopolisacáridos, y por estímulos anti-inflamatorios como por ejemplo glucocorticoides (Carballo et al., 1998; Smoak and Cidlowski, 2006), apoyando la función de TTP de controlar la respuesta inflamatoria. Estudios recientes donde identifican nuevos blancos de TTP apoyan este modelo, postulando a TTP como una proteína central en el control de la inflamación y otros procesos tumorigénicos.

TNF α , es una importante citoquina pro-inflamatoria y el principal blanco de TTP estudiado. Se expresa en macrófagos activados, pero también se ha reportado que puede ser sintetizado por otros tipos celulares, transformados o normales, en particular es expresado durante la involución de la mama. TNF α es el principal mediador de la inflamación asociada a cáncer y actúa como un factor promotor tumoral (Wu and Zhou, 2010). Su expresión y secreción constitutiva es característica de muchos tumores malignos y está frecuentemente asociada con un mal pronóstico (Leek et al., 1998). La expresión de TNF α se encuentra estrictamente regulada. En el sistema inmune, el principal mecanismo de modulación de su expresión es a través de la desestabilización de su mensajero por parte de TTP (Carballo et al., 1998; Lai et al., 1999). Es probable que la inhibición de la expresión de TTP en muchos cánceres favorezca la progresión tumoral al elevarse la expresión de TNF α , favoreciendo un estado inflamatorio en el microambiente local tumoral.

Interleuquina 6 (Il6) es una citoquina secretada por las células T y macrófagos que estimulan la inflamación y la maduración de las células B. Al igual que otras citoquinas, Il6 actúa como un factor de crecimiento y supervivencia en células pre-malignas y mantiene un estado inflamatorio pro-tumorigénico. Se puede detectar expresión de Il6 en suero de pacientes con carcinomas colo-rectales y está relacionado a un incremento en el riesgo de desarrollo de adenoma colon-rectal (Kim et al., 2008). Consistente con estos hallazgos, la inhibición de la expresión de TTP en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello aumentan significativamente la invasión vía secreción de MMP9/2 e Il6 (Van Tubergen et al., 2011). La expresión de Il6 en suero o tejidos ha sido observada en muchos tumores con base inflamatoria, y generalmente correlaciona con pacientes de mal pronóstico (Grivennikov and Karin, 2011). La expresión de Il6 fue verificada también en ratones KO de TTP y fibroblastos embrionarios de estos ratones, hallando en ambos casos elevadas cantidades de Il6 en relación a los modelos salvajes (Zhao et al., 2011).

Oncostatina-M (OSM) es una citoquina miembro de la familia de Il6 que presenta cercana homología con LIF y que interviene en distintos procesos, principalmente inflamatorios, pero

también relacionados al desarrollo, hematopoyesis, neurogénesis y homeostasis de hueso (recopilado en Heinrich et al., 2003). En líneas tumorales mamarias, OSM inhibe el crecimiento celular (Hutt and DeWille, 2002) pero también promueve la movilidad y desprendimiento de células (Holzer et al., 2004; Jorcyk et al., 2006; Underhill-Day and Heath, 2006). En la glándula mamaria murina normal, los niveles proteicos de OSM y su receptor son inducidos a partir de las 48h de involución en respuesta a pSTAT3. Como resultado, se reprime la expresión de genes específicos de diferenciación de epitelio, se incrementa la apoptosis epitelial y se promueve la remodelación de la glándula (Tiffen et al., 2008). Si bien el ARNm de OSM presenta sitios posibles de reconocimiento de TTP (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/AREsite.cgi>), hasta la fecha no existen reportes de si la estabilidad de esta citoquina estaría o no regulada por TTP.

Nuestras observaciones indican, contrario a lo esperado, que se induce la expresión del mensajero de OSM a los 15 días de lactancia en los animales controles. Es la primera vez que se reporta esto en el desarrollo de la glándula mamaria normal y probablemente se deba a que las mediciones de expresión reportadas hasta el momento correspondían a 10 días de lactancia en vez de a 15 días (Tiffen et al., 2008). También observamos que existe un aumento de expresión de OSM a los 10 días de lactancia en las mamas de los ratones TTP KO-condicional con respecto a los controles y que a los 15 días se mantiene constante. Podemos destacar que la expresión de OSM en este contexto no es consecuencia de la fosforilación de STAT3 ya que a los 15 días de lactancia de los animales controles o a los 10 días de los animales TTP^{Cre/LoxP} aún STAT3 no se encuentra fosforilado, por lo que la expresión de OSM es consecuencia de una vía de señalización alternativa y a determinar.

CONCLUSIONES

Conclusiones

TTP está presente en el epitelio mamario normal humano y murino, mientras que sus niveles son significativamente menores en neoplasias mamarias de ambas especies.

En la glándula mamaria de ratones hembras la expresión de TTP se incrementa significativamente durante la lactancia, posiblemente por acción de la prolactina mediada por el factor de transcripción STAT5A.

La ausencia de TTP en el epitelio mamario durante el desarrollo puberal afecta la formación de conductos secundarios.

La expresión de TTP en la mama lactante es relevante en el mantenimiento de la estructura funcional de la glándula. Su déficit genera un microambiente pro-inflamatorio que desencadena el inicio de la involución mamaria mucho antes del destete. Estos resultados indicarían que los factores pro-inflamatorios deben ser activamente reprimidos en la glándula para evitar la involución prematura de la mama.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Canamero, M., Rayon, T., Ors, I., Grana, O., Megias, D., Dominguez, O., Martinez, D., et al. (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502, 340-345.
- Abba MC, Drake JA, Hawkins KA, Hu Y, Sun H, Notcovich C, et al. Transcriptomic changes in human breast cancer progression as determined by serial analysis of gene expression. 2004. *Breast Cancer Res.*;6(5):R499–513.
- Abba, M.C., Sun, H., Hawkins, K.A., Drake, J.A., Hu, Y., Nunez, M.I., Gaddis, S., Shi, T., Horvath, S., Sahin, A., et al. (2007). Breast cancer molecular signatures as determined by SAGE: correlation with lymph node status. *Molecular cancer research : MCR* 5, 881-890.
- Al-Ahmadi, W., Al-Ghamdi, M., Al-Souhibani, N., and Khabar, K.S. (2013). miR-29a inhibition normalizes HuR over-expression and aberrant AU-rich mRNA stability in invasive cancer. *The Journal of pathology* 230, 28-38.
- Al-Souhibani, N., Al-Ghamdi, M., Al-Ahmadi, W., and Khabar, K.S. (2014). Posttranscriptional control of the chemokine receptor CXCR4 expression in cancer cells. *Carcinogenesis* 35, 1983-1992.
- Al-Souhibani, N., Al-Ahmadi, W., Hesketh, J.E., Blackshear, P.J., and Khabar, K.S. (2010). The RNA-binding zinc-finger protein tristetrapirolin regulates AU-rich mRNAs involved in breast cancer-related processes. *Oncogene* 29, 4205-4215.
- Almholt, K., Green, K.A., Juncker-Jensen, A., Nielsen, B.S., Lund, L.R., and Romer, J. (2007). Extracellular proteolysis in transgenic mouse models of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12, 83-97.
- Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *The EMBO journal* 17, 1497-1506.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2006). RNA granules. *The Journal of cell biology* 172, 803-808.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in biochemical sciences* 33, 141-150.
- Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! 2007. *Breast Cancer Res* 9:204
- Andrechek, E.R., Mori, S., Rempel, R.E., Chang, J.T., and Nevins, J.R. (2008). Patterns of cell signaling pathway activation that characterize mammary development. *Development* 135, 2403-2413.
- Arao, Y., Kikuchi, A., Ikeda, K., Nomoto, S., Horiguchi, H., and Kayama, F. (2002). A+U-rich-element RNA-binding factor 1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D gene expression is regulated by oestrogen in the rat uterus. *The Biochemical journal* 361, 125-132.

- Arao, Y., Kikuchi, A., Kishida, M., Yonekura, M., Inoue, A., Yasuda, S., Wada, S., Ikeda, K., and Kayama, F. (2004). Stability of A+U-rich element binding factor 1 (AUF1)-binding messenger ribonucleic acid correlates with the subcellular relocalization of AUF1 in the rat uterus upon estrogen treatment. *Mol Endocrinol* 18, 2255-2267.
- Bakheet, T., Williams, B.R., and Khabar, K.S. (2006). ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic acids research* 34, D111-114.
- Ball, R.K., Friis, R.R., Schoenenberger, C.A., Doppler, W., and Groner, B. (1988). Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *The EMBO journal* 7, 2089-2095.
- Barnstein, B.O., Li, G., Wang, Z., Kennedy, S., Chalfant, C., Nakajima, H., Bunting, K.D., and Ryan, J.J. (2006). Stat5 expression is required for IgE-mediated mast cell function. *J Immunol* 177, 3421-3426.
- Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H.B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic acids research* 33, 7138-7150.
- Baxter, F.O., Came, P.J., Abell, K., Kedjouar, B., Huth, M., Rajewsky, K., Pasparakis, M., and Watson, C.J. (2006). IKKbeta/2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells. *Development* 133, 3485-3494.
- Beelman, C.A., and Parker, R. (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 81, 179-183.
- Bemis, L.T., and Schedin, P. (2000). Reproductive state of rat mammary gland stroma modulates human breast cancer cell migration and invasion. *Cancer research* 60, 3414-3418.
- Bernstein, P., and Ross, J. (1989). Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends in biochemical sciences* 14, 373-377.
- Beuvink, I., Hess, D., Flotow, H., Hofsteenge, J., Groner, B., and Hynes, N.E. (2000). Stat5a serine phosphorylation. Serine 779 is constitutively phosphorylated in the mammary gland, and serine 725 phosphorylation influences prolactin-stimulated in vitro DNA binding activity. *The Journal of biological chemistry* 275, 10247-10255.
- Boutaud, O., Dixon, D.A., Oates, J.A., and Sawaoka, H. (2003). Tristetraprolin binds to the COX-2 mRNA 3' untranslated region in cancer cells. *Advances in experimental medicine and biology* 525, 157-160.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brennan, C.M., and Steitz, J.A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58, 266-277.

- Brennan, S.E., Kuwano, Y., Alkharouf, N., Blackshear, P.J., Gorospe, M., and Wilson, G.M. (2009). The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer research* 69, 5168-5176.
- Bresciani, F. (1965). Effect of Ovarian Hormones on Duration of DNA Synthesis in Cells of the C3h Mouse Mammary Gland. *Experimental cell research* 38, 13-32.
- Brewer, G. (1998). Characterization of c-myc 3' to 5' mRNA decay activities in an in vitro system. *The Journal of biological chemistry* 273, 34770-34774.
- Buggiano, V., Levy, C.S., Gattelli, A., Cirio, M.C., Marfil, M., Nepomnaschy, I., Piazzon, I., Helguero, L., Vanzulli, S., and Kordon, E.C. (2002). Origin and progression of pregnancy-dependent mammary tumors induced by new mouse mammary tumor virus variants. *Breast cancer research and treatment* 75, 191-202.
- Cao, H., Dzineku, F., and Blackshear, P.J. (2003). Expression and purification of recombinant tristetraprolin that can bind to tumor necrosis factor-alpha mRNA and serve as a substrate for mitogen-activated protein kinases. *Archives of biochemistry and biophysics* 412, 106-120.
- Cao, H. (2004). Expression, purification, and biochemical characterization of the antiinflammatory tristetraprolin: a zinc-dependent mRNA binding protein affected by posttranslational modifications. *Biochemistry* 43, 13724-13738.
- Cao, H., Deterding, L.J., Venable, J.D., Kennington, E.A., Yates, J.R., 3rd, Tomer, K.B., and Blackshear, P.J. (2006). Identification of the anti-inflammatory protein tristetraprolin as a hyperphosphorylated protein by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *The Biochemical journal* 394, 285-297.
- Carballo, E., Gilkeson, G.S., and Blackshear, P.J. (1997). Bone marrow transplantation reproduces the tristetraprolin-deficiency syndrome in recombination activating gene-2 (-/-) mice. Evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNFalpha overproduction. *The Journal of clinical investigation* 100, 986-995.
- Carballo, E., Lai, W.S., and Blackshear, P.J. (1998). Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 281, 1001-1005.
- Carballo, E., Lai, W.S., and Blackshear, P.J. (2000). Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* 95, 1891-1899.
- Carballo, E., Cao, H., Lai, W.S., Kennington, E.A., Campbell, D., and Blackshear, P.J. (2001). Decreased sensitivity of tristetraprolin-deficient cells to p38 inhibitors suggests the involvement of tristetraprolin in the p38 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 276, 42580-42587.

- Carrick, D.M., Chulada, P., Donn, R., Fabris, M., McNicholl, J., Whitworth, W., and Blackshear, P.J. (2006). Genetic variations in ZFP36 and their possible relationship to autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* 26, 182-196.
- Carrick, D.M., and Blackshear, P.J. (2007). Comparative expression of tristetraprolin (TTP) family member transcripts in normal human tissues and cancer cell lines. *Archives of biochemistry and biophysics* 462, 278-285.
- Chapman, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R., and Watson, C.J. (1999). Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* 13, 2604-2616.
- Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in biochemical sciences* 20, 465-470.
- Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Raijmakers, R., Pruijn, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451-464.
- Chrestensen, C.A., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pelo, J.W., Worthington, M.T., and Sturgill, T.W. (2004). MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *The Journal of biological chemistry* 279, 10176-10184.
- Clarkson, R.W., and Watson, C.J. (2003). Microarray analysis of the involution switch. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8, 309-319.
- Clarkson, R.W., Wayland, M.T., Lee, J., Freeman, T., and Watson, C.J. (2004). Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast cancer research : BCR* 6, R92-109.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073-1081.
- Cuadrado, A., Navarro-Yubero, C., Furneaux, H., and Munoz, A. (2003). Neuronal HuD gene encoding a mRNA stability regulator is transcriptionally repressed by thyroid hormone. *Journal of neurochemistry* 86, 763-773.
- Curino, A.C., Engelholm, L.H., Yamada, S.S., Holmbeck, K., Lund, L.R., Molinolo, A.A., Behrendt, N., Nielsen, B.S., and Bugge, T.H. (2005). Intracellular collagen degradation mediated by uPARAP/Endo180 is a major pathway of extracellular matrix turnover during malignancy. *The Journal of cell biology* 169, 977-985.

- Danielson, K.G., Oborn, C.J., Durban, E.M., Butel, J.S., and Medina, D. (1984). Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis in vivo and functional differentiation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 3756-3760.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- Deleault, K.M., Skinner, S.J., and Brooks, S.A. (2008). Tristetraprolin regulates TNF mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. *Molecular immunology* 45, 13-24.
- Douni, E., Akassoglou, K., Alexopoulou, L., Georgopoulos, S., Haralambous, S., Hill, S., Kassiotis, G., Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Plows, D., et al. (1995). Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *Journal of inflammation* 47, 27-38.
- DuBois, R.N., McLane, M.W., Ryder, K., Lau, L.F., and Nathans, D. (1990). A growth factor-inducible nuclear protein with a novel cysteine/histidine repetitive sequence. *The Journal of biological chemistry* 265, 19185-19191.
- Earnshaw, W.C. (1999). Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature* 397, 387, 389.
- Elston, C.W., and Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403-410.
- Faulds, M.H., Olsen, H., Helguero, L.A., Gustafsson, J.A., and Haldosen, L.A. (2004). Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 18, 412-421.
- Faulkin, L.J., Jr., and Deome, K.B. (1960). Regulation of growth and spacing of gland elements in the mammary fat pad of the C3H mouse. *Journal of the National Cancer Institute* 24, 953-969.
- Franks, T.M., and Lykke-Andersen, J. (2007). TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev* 21, 719-735.
- Gao, M., Wilusz, C.J., Peltz, S.W., and Wilusz, J. (2001). A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *The EMBO journal* 20, 1134-1143.
- Gearing, D.P., Gough, N.M., King, J.A., Hilton, D.J., Nicola, N.A., Simpson, R.J., Nice, E.C., Kelso, A., and Metcalf, D. (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *The EMBO journal* 6, 3995-4002.
- Gewies, A. (2003). Introduction to apoptosis. *ApoReviews*.

- Goddio, M.V., Gattelli, A., Slomiansky, V., Lacunza, E., Gingerich, T., Tocci, J.M., Facchinetti, M.M., Curino, A.C., LaMarre, J., Abba, M.C., et al. (2012). Mammary differentiation induces expression of Tristetraprolin, a tumor suppressor AU-rich mRNA-binding protein. *Breast cancer research and treatment* 135, 749-758.
- Gouon-Evans, V., Lin, E.Y., and Pollard, J.W. (2002). Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast cancer research : BCR* 4, 155-164.
- Grenon, S.M., Jeanne, M., Aguado-Zuniga, J., Conte, M.S., and Hughes-Fulford, M. (2013). Effects of gravitational mechanical unloading in endothelial cells: association between caveolins, inflammation and adhesion molecules. *Scientific reports* 3, 1494.
- Griseri, P., Bourcier, C., Hieblot, C., Essafi-Benkhadir, K., Chamorey, E., Touriol, C., and Pages, G. (2011). A synonymous polymorphism of the Tristetraprolin (TTP) gene, an AU-rich mRNA-binding protein, affects translation efficiency and response to Herceptin treatment in breast cancer patients. *Human molecular genetics* 20, 4556-4568.
- Grivennikov, S.I., and Karin, M. (2011). Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Annals of the rheumatic diseases* 70 Suppl 1, i104-108.
- Gueders, M.M., Balbin, M., Rocks, N., Foidart, J.M., Gosset, P., Louis, R., Shapiro, S., Lopez-Otin, C., Noel, A., and Cataldo, D.D. (2005). Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocytic allergen-induced airway inflammation. *J Immunol* 175, 2589-2597.
- Guhaniyogi, J., and Brewer, G. (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265, 11-23.
- Guyette, W.A., Matusik, R.J., and Rosen, J.M. (1979). Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell* 17, 1013-1023.
- Halees, A.S., El-Badrawi, R., and Khabar, K.S. (2008). ARED Organism: expansion of ARED reveals AU-rich element cluster variations between human and mouse. *Nucleic acids research* 36, D137-140.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hargrove, J.L., and Schmidt, F.H. (1989). The role of mRNA and protein stability in gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3, 2360-2370.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 374, 1-20.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

- Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (1998). Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev* 12, 449-455.
- Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A.D., Radzioch, D., Clark, A.R., Blackshear, P.J., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2006). Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Molecular and cellular biology* 26, 2399-2407.
- Hogg, N.A., Harrison, C.J., and Tickle, C. (1983). Lumen formation in the developing mouse mammary gland. *Journal of embryology and experimental morphology* 73, 39-57.
- Holzer, R.G., Ryan, R.E., Tommack, M., Schlekeway, E., and Jorcyk, C.L. (2004). Oncostatin M stimulates the detachment of a reservoir of invasive mammary carcinoma cells: role of cyclooxygenase-2. *Clinical & experimental metastasis* 21, 167-176.
- Humphreys, R.C., Bierie, B., Zhao, L., Raz, R., Levy, D., and Hennighausen, L. (2002). Deletion of Stat3 blocks mammary gland involution and extends functional competence of the secretory epithelium in the absence of lactogenic stimuli. *Endocrinology* 143, 3641-3650.
- Hussain, S.P., and Harris, C.C. (2007). Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 121, 2373-2380.
- Hutt, J.A., and DeWille, J.W. (2002). Oncostatin M induces growth arrest of mammary epithelium via a CCAAT/enhancer-binding protein delta-dependent pathway. *Molecular cancer therapeutics* 1, 601-610.
- Ihle, J.N., and Kerr, I.M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in genetics* : TIG 11, 69-74.
- Jacobson, A., and Peltz, S.W. (1996). Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry* 65, 693-739.
- Jarrousse, A.S., Petit, F., Kreutzer-Schmid, C., Gaedigk, R., and Schmid, H.P. (1999). Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay. *The Journal of biological chemistry* 274, 5925-5930.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., and Thun, M.J. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians* 59, 225-249.
- Jerry, D.J., Kittrell, F.S., Kuperwasser, C., Laucirica, R., Dickinson, E.S., Bonilla, P.J., Butel, J.S., and Medina, D. (2000). A mammary-specific model demonstrates the role of the p53 tumor suppressor gene in tumor development. *Oncogene* 19, 1052-1058.

- Joe, Y., Kim, H.J., Kim, S., Chung, J., Ko, M.S., Lee, W.H., Chang, K.C., Park, J.W., and Chung, H.T. (2011). Tristetraprolin mediates anti-inflammatory effects of nicotine in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *The Journal of biological chemistry* 286, 24735-24742.
- Jorcyk, C.L., Holzer, R.G., and Ryan, R.E. (2006). Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells. *Cytokine* 33, 323-336.
- Kamikawa, A., Ichii, O., Yamaji, D., Imao, T., Suzuki, C., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., Kon, Y., and Kimura, K. (2009). Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant mice. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238, 1092-1099.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology* 169, 871-884.
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslari, E., Kioussis, D., and Kollias, G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The EMBO journal* 10, 4025-4031.
- Kim, S., Keku, T.O., Martin, C., Galanko, J., Woosley, J.T., Schroeder, J.C., Satia, J.A., Halabi, S., and Sandler, R.S. (2008). Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer research* 68, 323-328.
- Kordon, E.C., McKnight, R.A., Jhappan, C., Hennighausen, L., Merlino, G., and Smith, G.H. (1995). Ectopic TGF beta 1 expression in the secretory mammary epithelium induces early senescence of the epithelial stem cell population. *Developmental biology* 168, 47-61.
- Kordon, E.C., and Smith, G.H. (1998). An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* 125, 1921-1930.
- Kreuzaler, P.A., Staniszewska, A.D., Li, W., Omidvar, N., Kedjouar, B., Turkson, J., Poli, V., Flavell, R.A., Clarkson, R.W., and Watson, C.J. (2011). Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. *Nature cell biology* 13, 303-309.
- Kritikou, E.A., Sharkey, A., Abell, K., Came, P.J., Anderson, E., Clarkson, R.W., and Watson, C.J. (2003). A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development* 130, 3459-3468.
- Lai, W.S., Stumpo, D.J., and Blackshear, P.J. (1990). Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein. *The Journal of biological chemistry* 265, 16556-16563.
- Lai, W.S., Carballo, E., Strum, J.R., Kennington, E.A., Phillips, R.S., and Blackshear, P.J. (1999). Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Molecular and cellular biology* 19, 4311-4323.

- Lai, W.S., and Blackshear, P.J. (2001). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly(A) tail. *The Journal of biological chemistry* 276, 23144-23154.
- Lai, W.S., Kennington, E.A., and Blackshear, P.J. (2002). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. *The Journal of biological chemistry* 277, 9606-9613.
- Lai, W.S., Kennington, E.A., and Blackshear, P.J. (2003). Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Molecular and cellular biology* 23, 3798-3812.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R.J. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 284, 499-502.
- Lee, J.G., Dahi, S., Mahimkar, R., Tulloch, N.L., Alfonso-Jaume, M.A., Lovett, D.H., and Sarkar, R. (2005). Intronic regulation of matrix metalloproteinase-2 revealed by in vivo transcriptional analysis in ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16345-16350.
- Leek, R.D., Landers, R., Fox, S.B., Ng, F., Harris, A.L., and Lewis, C.E. (1998). Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *British journal of cancer* 77, 2246-2251.
- Levy, C.S., Slomiansky, V., Gattelli, A., Nahmod, K., Pelisch, F., Blaustein, M., Srebrow, A., Coso, O.A., and Kordon, E.C. (2010). Tumor necrosis factor alpha induces LIF expression through ERK1/2 activation in mammary epithelial cells. *Journal of cellular biochemistry* 110, 857-865.
- Li, C.I., Uribe, D.J., and Daling, J.R. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British journal of cancer* 93, 1046-1052.
- Li, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K.U., Young, W.S., Hennighausen, L., and Furth, P.A. (1997). Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3425-3430.
- Liu, X., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (1996). Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. *Mol Endocrinol* 10, 1496-1506.
- Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 11, 179-186.

- Lonning, P.E., Sorlie, T., Perou, C.M., Brown, P.O., Botstein, D., and Borresen-Dale, A.L. (2001). Microarrays in primary breast cancer--lessons from chemotherapy studies. *Endocrine-related cancer* 8, 259-263.
- Lozano-Ascencio, R., Gomez-Dantes, H., Lewis, S., Torres-Sanchez, L., and Lopez-Carrillo, L. (2009). [Breast cancer trends in Latin America and the Caribbean]. *Salud publica de Mexico* 51 Suppl 2, s147-156.
- Lu, J.Y., and Schneider, R.J. (2004). Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay. *The Journal of biological chemistry* 279, 12974-12979.
- Lund, L.R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M.J., Dano, K., and Werb, Z. (1996). Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122, 181-193.
- Marchese, F.P., Aubareda, A., Tudor, C., Saklatvala, J., Clark, A.R., and Dean, J.L. (2010). MAPKAP kinase 2 blocks tristetraprolin-directed mRNA decay by inhibiting CAF1 deadenylase recruitment. *The Journal of biological chemistry* 285, 27590-27600.
- Marti, A., Ritter, P.M., Jager, R., Lazar, H., Baltzer, A., Schenkel, J., Declercq, W., Vandenabeele, P., and Jaggi, R. (2001). Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome c release and caspase activation. *Mech Dev* 104, 89-98.
- Masso-Welch, P.A., Darcy, K.M., Stangle-Castor, N.C., and Ip, M.M. (2000). A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 165-185.
- Matos, E.L., Loria, D.I., and Vilensky, M. (1994). Cancer mortality and poverty in Argentina: a geographical correlation study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 3, 213-218.
- McDaniel, S.M., Rumer, K.K., Biroc, S.L., Metz, R.P., Singh, M., Porter, W., and Schedin, P. (2006). Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis. *The American journal of pathology* 168, 608-620.
- Medina, D. (1976). Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. *Cancer research* 36, 2589-2595.
- Mitchell, P., and Tollervey, D. (2000). mRNA stability in eukaryotes. *Current opinion in genetics & development* 10, 193-198.
- Mitchell, P., and Tollervey, D. (2001). mRNA turnover. *Curr Opin Cell Biol* 13, 320-325.
- Mittelstadt, P.R., and Ashwell, J.D. (2003). Disruption of glucocorticoid receptor exon 2 yields a ligand-responsive C-terminal fragment that regulates gene expression. *Mol Endocrinol* 17, 1534-1542.

- Moriggl, R., Gouilleux-Gruart, V., Jahne, R., Berchtold, S., Gartmann, C., Liu, X., Hennighausen, L., Sotiropoulos, A., Groner, B., and Gouilleux, F. (1996). Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Molecular and cellular biology* 16, 5691-5700.
- Muhrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev* 8, 855-866.
- Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J.P., Raijmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C.S., and Wilusz, J. (2002). The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *The EMBO journal* 21, 165-174.
- Munroe, D., and Jacobson, A. (1990). mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Molecular and cellular biology* 10, 3441-3455.
- Murata, T., Morita, N., Hikita, K., Kiuchi, K., and Kaneda, N. (2005). Recruitment of mRNA-destabilizing protein TIS11 to stress granules is mediated by its zinc finger domain. *Experimental cell research* 303, 287-299.
- Nachat-Kappes, R., Pinel, A., Combe, K., Lamas, B., Farges, M.C., Rossary, A., Goncalves-Mendes, N., Caldefie-Chezet, F., Vasson, M.P., and Basu, S. (2012). Effects of enriched environment on COX-2, leptin and eicosanoids in a mouse model of breast cancer. *PloS one* 7, e51525.
- Nagaoka, K., Suzuki, T., Kawano, T., Imakawa, K., and Sakai, S. (2006). Stability of casein mRNA is ensured by structural interactions between the 3'-untranslated region and poly(A) tail via the HuR and poly(A)-binding protein complex. *Biochimica et biophysica acta* 1759, 132-140.
- Nagaoka, K., Tanaka, T., Imakawa, K., and Sakai, S. (2007). Involvement of RNA binding proteins AUF1 in mammary gland differentiation. *Experimental cell research* 313, 2937-2945.
- Naipauer, J., Gattelli, A., Degese, M.S., Slomiansky, V., Wertheimer, E., LaMarre, J., Castilla, L., Abba, M., Kordon, E.C., and Coso, O.A. (2013). The use of alternative polyadenylation sites renders integrin beta1 (Itgb1) mRNA isoforms with differential stability during mammary gland development. *The Biochemical journal* 454, 345-357.
- Nakamura, K., Nonaka, H., Saito, H., Tanaka, M., and Miyajima, A. (2004). Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 39, 635-644.
- Nakasato, M., Shirakura, Y., Ooga, M., Iwatsuki, M., Ito, M., Kageyama, S., Sakai, S., Nagata, M., and Aoki, F. (2006). Involvement of the STAT5 signaling pathway in the regulation of mouse preimplantation development. *Biology of reproduction* 75, 508-517.

- Nishimura, R., and Arima, N. (2008). Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? *Breast Cancer* 15, 303-308.
- Ogawa, K., Chen, F., Kim, Y.J., and Chen, Y. (2003). Transcriptional regulation of tristetraprolin by transforming growth factor-beta in human T cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 30373-30381.
- Orban, P.C., Chui, D., and Marth, J.D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6861-6865.
- Ormandy, C.J., Naylor, M., Harris, J., Robertson, F., Horseman, N.D., Lindeman, G.J., Visvader, J., and Kelly, P.A. (2003). Investigation of the transcriptional changes underlying functional defects in the mammary glands of prolactin receptor knockout mice. *Recent progress in hormone research* 58, 297-323.
- Parise, C.A., Bauer, K.R., and Caggiano, V. (2010). Variation in breast cancer subtypes with age and race/ethnicity. *Critical reviews in oncology/hematology* 76, 44-52.
- Parise, C.A., and Caggiano, V. (2014). Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *Journal of cancer epidemiology* 2014, 469251.
- Parkin, D.M. (2004). International variation. *Oncogene* 23, 6329-6340.
- Petersen, H., and Haldosen, L.A. (1998). EGF modulates expression of STAT5 in mammary epithelial cells. *Experimental cell research* 243, 347-358.
- Qiu, L.Q., Stumpo, D.J., and Blackshear, P.J. (2012). Myeloid-specific tristetraprolin deficiency in mice results in extreme lipopolysaccharide sensitivity in an otherwise minimal phenotype. *J Immunol* 188, 5150-5159.
- Quaglino, A., Salierno, M., Pellegrotti, J., Rubinstein, N., and Kordon, E.C. (2009). Mechanical strain induces involution-associated events in mammary epithelial cells. *BMC cell biology* 10, 55.
- Quarrie, L.H., Addey, C.V., and Wilde, C.J. (1996). Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *Journal of cellular physiology* 168, 559-569.
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M., and Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell science* 117, 1281-1283.
- Reichardt, H.M., Horsch, K., Grone, H.J., Kolbus, A., Beug, H., Hynes, N., and Schutz, G. (2001). Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 145, 519-527.

- Richert, M.M., Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W., and Anderson, S.M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 227-241.
- Sawaoka, H., Dixon, D.A., Oates, J.A., and Boutaud, O. (2003). Tristetraprolin binds to the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 mRNA. A polyadenylation variant in a cancer cell line lacks the binding site. *The Journal of biological chemistry* 278, 13928-13935.
- Schedin, P. (2006). Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nature reviews Cancer* 6, 281-291.
- Schere-Levy, C., Buggiano, V., Quaglino, A., Gattelli, A., Cirio, M.C., Piazzon, I., Vanzulli, S., and Kordon, E.C. (2003). Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Experimental cell research* 282, 35-47.
- Schmittgen, T.D., and Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of biochemical and biophysical methods* 46, 69-81.
- Selbert, S., Bentley, D.J., Melton, D.W., Rannie, D., Lourenco, P., Watson, C.J., and Clarke, A.R. (1998). Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland. *Transgenic research* 7, 387-396.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84-88.
- Shatkin, A.J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9, 645-653.
- Silberstein, G.B., and Daniel, C.W. (1987). Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor-beta. *Science* 237, 291-293.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 344, 783-792.
- Smith, I., Procter, M., Gelber, R.D., Guillaume, S., Feyereislova, A., Dowsett, M., Goldhirsch, A., Untch, M., Mariani, G., Baselga, J., et al. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 369, 29-36.
- Smoak, K., and Cidlowski, J.A. (2006). Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Molecular and cellular biology* 26, 9126-9135.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish

tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10869-10874.

Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8418-8423.

Stein, T., Morris, J.S., Davies, C.R., Weber-Hall, S.J., Duffy, M.A., Heath, V.J., Bell, A.K., Ferrier, R.K., Sandilands, G.P., and Gusterson, B.A. (2004). Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast cancer research : BCR* 6, R75-91.

Stoecklin, G., Hahn, S., and Moroni, C. (1994). Functional hierarchy of AUUUA motifs in mediating rapid interleukin-3 mRNA decay. *The Journal of biological chemistry* 269, 28591-28597.

Stoecklin, G., Stoeckle, P., Lu, M., Muehleemann, O., and Moroni, C. (2001). Cellular mutants define a common mRNA degradation pathway targeting cytokine AU-rich elements. *RNA* 7, 1578-1588.

Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W.F., Blackwell, T.K., and Anderson, P. (2004). MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *The EMBO journal* 23, 1313-1324.

Subbaramaiah, K., Marmo, T.P., Dixon, D.A., and Dannenberg, A.J. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR. *The Journal of biological chemistry* 278, 37637-37647.

Subbaramaiah, K., Howe, L.R., Bhardwaj, P., Du, B., Gravaghi, C., Yantiss, R.K., Zhou, X.K., Blaho, V.A., Hla, T., Yang, P., et al. (2011). Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 329-346.

Suswam, E., Li, Y., Zhang, X., Gillespie, G.Y., Li, X., Shacka, J.J., Lu, L., Zheng, L., and King, P.H. (2008). Tristetraprolin down-regulates interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in malignant glioma cells. *Cancer research* 68, 674-682.

Suzuki, K., Nakajima, H., Ikeda, K., Maezawa, Y., Suto, A., Takatori, H., Saito, Y., and Iwamoto, I. (2003). IL-4-Stat6 signaling induces tristetraprolin expression and inhibits TNF-alpha production in mast cells. *The Journal of experimental medicine* 198, 1717-1727.

Suzuki, T., Tsutsumi, A., Suzuki, H., Suzuki, E., Sugihara, M., Muraki, Y., Hayashi, T., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., et al. (2008). Tristetraprolin (TTP) gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 18, 472-479.

- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3801-3804.
- Taverna, D., Groner, B., and Hynes, N.E. (1991). Epidermal growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor, and c-erbB-2 receptor activation all promote growth but have distinctive effects upon mouse mammary epithelial cell differentiation. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 2, 145-154.
- Taylor, G.A., Carballo, E., Lee, D.M., Lai, W.S., Thompson, M.J., Patel, D.D., Schenkman, D.I., Gilkeson, G.S., Broxmeyer, H.E., Haynes, B.F., et al. (1996). A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraproline (TTP) deficiency. *Immunity* 4, 445-454.
- Taylor, G.A., Lai, W.S., Oakey, R.J., Seldin, M.F., Shows, T.B., Eddy, R.L., Jr., and Blackshear, P.J. (1991). The human TTP protein: sequence, alignment with related proteins, and chromosomal localization of the mouse and human genes. *Nucleic acids research* 19, 3454.
- Tiffen, P.G., Omidvar, N., Marquez-Almuina, N., Croston, D., Watson, C.J., and Clarkson, R.W. (2008). A dual role for oncostatin M signaling in the differentiation and death of mammary epithelial cells in vivo. *Mol Endocrinol* 22, 2677-2688.
- Topper, Y.J., and Freeman, C.S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiological reviews* 60, 1049-1106.
- Tsutsumi, A., Suzuki, E., Adachi, Y., Murata, H., Goto, D., Kojo, S., Matsumoto, I., Zhong, L., Nakamura, H., and Sumida, T. (2004). Expression of tristetraproline (G0S24) mRNA, a regulator of tumor necrosis factor-alpha production, in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 31, 1044-1049.
- Udy, G.B., Towers, R.P., Snell, R.G., Wilkins, R.J., Park, S.H., Ram, P.A., Waxman, D.J., and Davey, H.W. (1997). Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7239-7244.
- Underhill-Day, N., and Heath, J.K. (2006). Oncostatin M (OSM) cytostasis of breast tumor cells: characterization of an OSM receptor beta-specific kernel. *Cancer research* 66, 10891-10901.
- Vafaizadeh, V., Klemmt, P., Brendel, C., Weber, K., Doebele, C., Britt, K., Grez, M., Fehse, B., Desrivieres, S., and Groner, B. (2010). Mammary epithelial reconstitution with gene-modified stem cells assigns roles to Stat5 in luminal alveolar cell fate decisions, differentiation, involution, and mammary tumor formation. *Stem Cells* 28, 928-938.

- Van Nguyen, A., and Pollard, J.W. (2002). Colony stimulating factor-1 is required to recruit macrophages into the mammary gland to facilitate mammary ductal outgrowth. *Developmental biology* 247, 11-25.
- Van Tubergen, E., Vander Broek, R., Lee, J., Wolf, G., Carey, T., Bradford, C., Prince, M., Kirkwood, K.L., and D'Silva, N.J. (2011). Tristetraprolin regulates interleukin-6, which is correlated with tumor progression in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 117, 2677-2689.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-487.
- Wagner, B.J., DeMaria, C.T., Sun, Y., Wilson, G.M., and Brewer, G. (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 48, 195-202.
- Wagner, K.U., Wall, R.J., St-Onge, L., Gruss, P., Wynshaw-Boris, A., Garrett, L., Li, M., Furth, P.A., and Hennighausen, L. (1997). Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic acids research* 25, 4323-4330.
- Watson, C.J., and Burdon, T.G. (1996). Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Reviews of reproduction* 1, 1-5.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., and Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 4, 192-208.
- Wilson, G.M., and Brewer, G. (1999). The search for trans-acting factors controlling messenger RNA decay. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 62, 257-291.
- Worthington, M.T., Pelo, J.W., Sachedina, M.A., Applegate, J.L., Arseneau, K.O., and Pizarro, T.T. (2002). RNA binding properties of the AU-rich element-binding recombinant Nup475/TIS11/tristetraprolin protein. *The Journal of biological chemistry* 277, 48558-48564.
- Wu, Y., and Zhou, B.P. (2010). TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer* 102, 639-644.
- Xu, N., Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (1997). Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Molecular and cellular biology* 17, 4611-4621.
- Zhao, L., Melenhorst, J.J., and Hennighausen, L. (2002). Loss of interleukin 6 results in delayed mammary gland involution: a possible role for mitogen-activated protein kinase and not signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Endocrinol* 16, 2902-2912.
- Zhao, W., Liu, M., D'Silva, N.J., and Kirkwood, K.L. (2011). Tristetraprolin regulates interleukin-6 expression through p38 MAPK-dependent affinity changes with mRNA 3' untranslated region.

Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 31, 629-637.

van Hoof, A., and Parker, R. (2002). Messenger RNA degradation: beginning at the end. Curr B

